

A blurred image of a microscope is centered in the upper half of the cover, set against a light blue background. The microscope is shown from a slightly elevated angle, with its eyepiece, objective lenses, and base visible.

Учебник

Медицинская микробиология,
вирусология, иммунология

Под редакцией академика РАН В.В. Зверева,
профессора М.Н. Бойченко

2-е издание, переработанное и дополненное

Том 1



ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»

Медицинская микробиология, вирусология, иммунология

Под редакцией
академика РАН В.В. Зверева,
профессора М.Н. Бойченко

Учебник
В 2 томах

2-е издание, переработанное и дополненное

Министерство науки и высшего образования РФ

Рекомендовано ФГБУ «Федеральный институт развития образования»
в качестве учебника для использования в учебном процессе
образовательных организаций, реализующих программы высшего
образования по специальностям 31.05.01 «Лечебное дело»,
31.05.02 «Педиатрия», 32.05.01 «Медико-профилактическое дело»



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2021

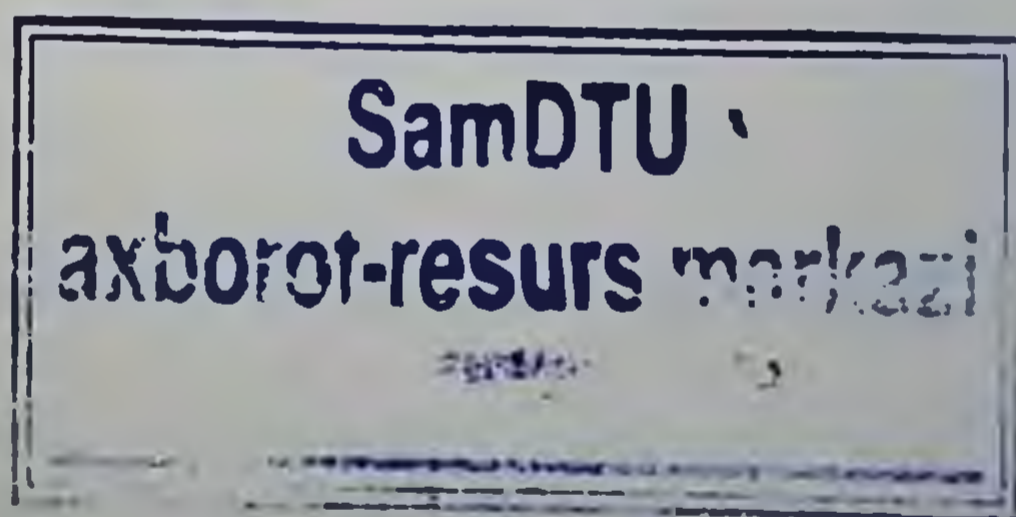
Медицинская микробиология, вирусология, иммунология

Под редакцией
академика РАН В.В. Зверева,
профессора М.Н. Бойченко

Учебник

ТОМ 1

2-е издание, переработанное и дополненное



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2021

УДК [577.27+579](083.4)(084.121)(075.8)
ББК 28.4я73-1+28.707.4я73-1+52.54я73-1+52.64я73-1
М42

01-УЧБ-2899

Рецензент:

И.А. Дятлов — д-р мед. наук, проф., акад. РАН, директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

М42 **Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т. /** под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. — Т. 1. — 448 с. : ил.

ISBN 978-5-9704-5835-8 (т. 1)

ISBN 978-5-9704-5837-2 (общ.)

В создании книги принимали участие сотрудники кафедр микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, государственных медицинских университетов Омска, Оренбурга, Челябинска.

Издание состоит из двух томов, включающих 19 глав, в которых последовательно разбираются вопросы общей и частной микробиологии, вирусологии и иммунологии. Материал, изложенный в обоих томах, значительно переработан согласно современным научным тенденциям и дополнен новыми рисунками, схемами, таблицами.

Учебник написан в соответствии с официально утвержденными программами преподавания микробиологии, вирусологии и иммунологии для студентов лечебного, педиатрического и медико-профилактического факультетов медицинских вузов.

УДК [577.27+579](083.4)(084.121)(075.8)
ББК 28.4я73-1+28.707.4я73-1+52.54я73-1+52.64я73-1

Права на данное издание принадлежат ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа». Воспроизведение и распространение в каком бы то ни было виде части или целого издания не могут быть осуществлены без письменного разрешения ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».

ISBN 978-5-9704-5835-8 (т. 1)
ISBN 978-5-9704-5837-2 (общ.)

© Коллектив авторов, 2017
© ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа», 2021
© ООО Издательская группа
«ГЭОТАР-Медиа», оформление, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	11
Список сокращений и условных обозначений	12
ЧАСТЬ I. ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ	13
Глава 1. Введение в микробиологию и иммунологию (В.Н. Царев).....	15
1.1. Предмет «Медицинская микробиология»	15
1.2. Задачи и методы медицинской микробиологии	17
1.3. Открытие и изучение мира микробов	19
Задания для самоподготовки (самоконтроля).....	24
Глава 2. Морфология и классификация микробов	25
2.1. Систематика и номенклатура микробов (Е.П. Пашков, Л.И. Петрова)	25
2.2. Классификация и морфология бактерий (Е.П. Пашков, А.С. Быков, М.Н. Бойченко).....	25
2.2.1. Морфологические формы бактерий	28
2.2.2. Структура бактериальной клетки	30
2.2.3. Особенности строения спирохет, риккетсий, хламидий, актиномицет и микоплазм	40
2.3. Строение и классификация грибов (А.С. Быков).....	44
2.4. Строение и классификация простейших (А.С. Быков).....	48
2.5. Строение и классификация вирусов (А.С. Быков).....	53
Задания для самоподготовки (самоконтроля).....	59
Глава 3. Физиология микробов	61
3.1. Физиология бактерий (М.Н. Бойченко, В.В. Тец).....	61
3.1.1. Питание бактерий	61
3.1.2. Ферменты бактерий	67
3.1.3. Энергетический метаболизм	68
3.1.4. Конструктивный метаболизм.....	73
3.1.5. Транспорт веществ.....	76
3.1.6. Регуляция метаболизма у бактерий	83
3.1.7. Морфогенез бактерий и их сообществ	84
3.1.8. Вторичный метаболизм.....	85
3.1.9. Отношение к факторам окружающей среды	86
3.1.10. Рост и размножение	91
3.1.11. Условия культивирования бактерий	97
3.1.12. Поведение бактерий в бактериальных сообществах	98

3.2. Физиология вирусов (<i>В.В. Зверев, А.С. Быков</i>)	101
3.2.1. Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой. . .	102
3.2.2. Программируемая клеточная смерть (апоптоз)	108
3.2.3. Непродуктивные инфекции	109
3.3. Культивирование вирусов	111
3.4. Бактериофаги (вирусы бактерий).	116
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	123
Глава 4. Экология микробов — микроэкология.	125
4.1. Распространение микробов (<i>А.С. Быков, Е.П. Пашков</i>)	125
4.1.1. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе	125
4.1.2. Микрофлора почвы	126
4.1.3. Микрофлора воды	127
4.1.4. Микрофлора воздуха	128
4.1.5. Микрофлора бытовых и медицинских объектов	129
4.2. Микрофлора организма человека (<i>Л.И. Кафарская, А.С. Быков</i>) . . .	129
4.3. Уничтожение микробов в окружающей среде (<i>В.Б. Сбойчаков</i>)	143
4.3.1. Дезинфекция.	143
4.3.2. Стерилизация	145
4.3.3. Асептика и антисептика	148
4.4. Санитарная микробиология (<i>В.Б. Сбойчаков</i>)	150
4.4.1. Санитарно-микробиологическое исследование воды . . .	159
4.4.2. Санитарно-микробиологическое исследование почвы. . .	163
4.4.3. Исследование микробной обсемененности воздушной среды	166
4.4.4. Санитарно-микробиологический контроль объектов продовольственного назначения	167
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	178
Глава 5. Генетика микробов (<i>М.Н. Бойченко</i>)	181
5.1. Строение генома бактерий	181
5.1.1. Бактериальная хромосома	181
5.1.2. Плазмиды бактерий	182
5.1.3. Подвижные генетические элементы.	184
5.1.4. Интегроны.	185
5.1.5. Острова патогенности	187
5.1.6. Системы регуляции экспрессии генома. Защита от чужеродной дезоксирибонуклеиновой кислоты	187

5.2. Мутации у бактерий	188
5.3. Рекомбинация у бактерий	190
5.3.1. Гомологичная рекомбинация.	191
5.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация	191
5.3.3. Незаконная, или репликативная, рекомбинация.	191
5.4. Передача генетической информации у бактерий	192
5.4.1. Конъюгация.	192
5.4.2. Трансдукция	194
5.4.3. Трансформация	195
5.5. Особенности генетики вирусов	197
5.6. Применение генетических методов в диагностике инфекционных болезней	198
5.6.1. Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий	198
5.6.2. Методы, используемые для обнаружения микроба без выделения его в чистую культуру	200
5.7. Основы генетической инженерии	204
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	207

Глава 6. Антимикробные химиотерапевтические препараты (Л.И. Кафарская, Н.В. Давыдова, Н.В. Хорошко)	209
6.1. Антимикробные химиотерапевтические препараты.	209
6.1.1. Антибиотики	211
6.1.2. Синтетические антимикробные химиотерапевтические препараты.	218
6.2. Механизмы действия антимикробных химиотерапевтических препаратов, активных в отношении клеточных форм микроорганизмов.	220
6.2.1. Ингибиторы синтеза и функций клеточной стенки бактерий.	221
6.2.2. Ингибиторы синтеза белка у бактерий	222
6.2.3. Ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот	223
6.2.4. Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны.	223
6.2.5. Побочное воздействие на микроорганизмы	224
6.3. Лекарственная устойчивость бактерий	224
6.3.1. Природная устойчивость	224
6.3.2. Приобретенная устойчивость.	224
6.3.3. Генетические основы приобретенной резистентности.	225

6.3.4. Реализация приобретенной устойчивости	226
6.4. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам . . .	228
6.5. Осложнения антимикробной химиотерапии со стороны макроорганизма	229
6.6. Противовирусные химиотерапевтические препараты	231
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	233
Глава 7. Учение об инфекции (О.В. Бухарин)	235
7.1. Инфекция. Формы инфекционного процесса.	235
7.2. Движущие силы инфекционного процесса	241
7.3. Роль возбудителя в инфекционном процессе и его основные биологические характеристики	242
7.3.1. Факторы вирулентности	244
7.3.2. Патогенетические факторы возбудителя при инфекции	248
7.3.3. Генетика вирулентности бактерий	254
7.4. Роль макроорганизма в инфекционном процессе.	257
7.4.1. Анатомо-физиологические барьеры организма при инфекции	260
7.5. Роль внешней среды в инфекционном процессе	263
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	265
ЧАСТЬ II. ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ	267
Глава 8. Учение об иммунитете и факторы врожденного иммунитета (И.И. Долгушин, О.А. Свитич).	269
8.1. Введение в иммунологию	269
8.1.1. Основные этапы развития иммунологии	269
8.1.2. Виды иммунитета	272
8.2. Врожденный иммунитет	276
8.2.1. Факторы врожденного иммунитета	277
8.2.2. Гуморальные факторы врожденного иммунитета	282
8.2.3. Рецепторы врожденного иммунитета	290
8.2.4. Клетки врожденного иммунитета	293
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	301
Глава 9. Антигены и иммунная система человека (Ю.В. Несвижский) . . .	303
9.1. Антигены	303
9.1.1. Общие сведения	303
9.1.2. Свойства антигенов	304
9.1.3. Классификация антигенов	308

9.1.4. Антигены организма человека	311
9.1.5. Антигены микробов	318
9.1.6. Процессы, происходящие с антигеном в макроорганизме . . .	321
9.2. Иммунная система человека	322
9.2.1. Структурно-функциональные элементы иммунной системы	322
9.2.2. Организация функционирования иммунной системы . .	342
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	352
Глава 10. Основные формы иммунного реагирования (Ю.В. Несвижский) . . .	355
10.1. Антитела и антителообразование	355
10.1.1. Природа антител	355
10.1.2. Молекулярное строение антител	356
10.1.3. Структурно-функциональные особенности иммуноглобулинов различных классов	358
10.1.4. Антигенность антител	363
10.1.5. Механизм взаимодействия антитела с антигеном	364
10.1.6. Свойства антител	365
10.1.7. Генетика иммуноглобулинов	367
10.1.8. Динамика антителопродукции	368
10.1.9. Теории разнообразия антител	371
10.2. Иммунный фагоцитоз	373
10.3. Опосредованный клетками киллинг	373
10.3.1. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность	374
10.3.2. Антителонезависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность	375
10.4. Реакции гиперчувствительности	376
10.5. Иммунологическая память	381
10.6. Иммунологическая толерантность	382
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	385
Глава 11. Особенности иммунитета при различных локализациях и состояниях (Ю.В. Несвижский)	387
11.1. Особенности местного иммунитета	387
11.1.1. Иммунитет кожи	387
11.1.2. Иммунитет слизистых оболочек	389
11.2. Особенности иммунитета при различных состояниях	392
11.2.1. Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях	392

11.2.2. Особенности противовирусного иммунитета	393
11.2.3. Особенности противогрибкового иммунитета	394
11.2.4. Особенности иммунитета при протозойных инвазиях . . .	394
11.2.5. Особенности противоглистного иммунитета	394
11.2.6. Трансплантационный иммунитет	395
11.2.7. Иммунитет против новообразований	396
11.2.8. Иммунология беременности	397
11.3. Иммунный статус и его оценка.	397
11.4. Патология иммунной системы	399
11.4.1. Иммунодефициты	399
11.4.2. Аутоиммунные болезни.	402
11.4.3. Аллергические болезни	402
11.4.4. Лимфопролиферативные заболевания	406
11.5. Иммунокоррекция	406
Задания для самоподготовки (самоконтроля).	407
Глава 12. Иммунодиагностические реакции (Ю.В. Несвижский).	409
12.1. Реакции антиген–антитело и их применение	409
12.2. Реакция агглютинации.	410
12.3. Реакция преципитации	412
12.4. Реакции с участием комплемента	414
12.5. Реакции с использованием меченых антител или антигенов	416
12.6. Реакция нейтрализации	419
Глава 13. Иммунопрофилактика и иммунотерапия (В.В. Зверев, Л.И. Петрова)	421
13.1. Сущность и место иммунопрофилактики и иммунотерапии в медицинской практике	421
13.2. Иммунобиологические препараты.	422
13.2.1. Общая характеристика и классификация	422
13.2.2. Вакцины.	423
13.2.3. Бактериофаги	429
13.2.4. Пробиотики.	429
13.2.5. Иммунобиологические препараты на основе специфических антител.	429
Задания для самоподготовки (самоконтроля) (к главам 12, 13). . .	432
Ответы к тестам	434
Предметный указатель	436

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

Зверев Виталий Васильевич — д-р биол. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Бойченко Марина Николаевна — д-р биол. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Быков Анатолий Сергеевич — д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Несвижский Юрий Владимирович — д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Пашков Евгений Петрович — д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Петрова Людмила Ивановна — канд. биол. наук, научный сотрудник НИИ биоорганических соединений им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Давыдова Наталия Владимировна — канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Бухарин Олег Валерьевич — д-р мед. наук, проф., акад. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Оренбургского ГМУ

Долгушин Илья Ильич — д-р мед. наук, проф., чл.-кор. РАН, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Южно-Уральского ГМУ

Кафарская Людмила Ивановна — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии и вирусологии РНИМУ им. Н.И. Пирогова

Сбойчаков Виктор Борисович — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии ВМА им. С.М. Кирова

Свитич Оксана Анатольевна — д-р мед. наук, чл.-кор. РАН, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

Тец Виктор Вениаминович — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова

Царев Виктор Николаевич — д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии МГМСУ им. А.И. Евдокимова

Хорошко Наина Владимировна — канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовского Университета)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

•	— торговое название лекарственного средства
"	— лекарственное средство не зарегистрировано в РФ
Ig	— иммуноглобулины
MHC	— главный комплекс гистосовместимости (от англ. <i>major histocompatibility complex</i>)
AЗКЦТ	— антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность
асРНК	— антисенс рибонуклеиновая кислота
АПК	— антигенпрезентирующие клетки
АТФ	— аденозинтрифосфат
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ГЗТ	— гиперчувствительность замедленного типа
ГНТ	— гиперчувствительность немедленного типа
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИЛ	— интерлейкины
иРНК	— информационная рибонуклеиновая кислота
ИФН	— интерфероны
ЛПС	— липополисахариды
мРНК	— матричная рибонуклеиновая кислота
ОТ	— обратная транскрипция
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РНК	— рибонуклеиновая кислота
рРНК	— рибосомная рибонуклеиновая кислота
тРНК	— транспортная рибонуклеиновая кислота
ТФР	— трансформирующий фактор роста
ФНО	— фактор некроза опухоли

Часть I

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ



Глава 1

ВВЕДЕНИЕ В МИКРОБИОЛОГИЮ И ИММУНОЛОГИЮ

1.1. ПРЕДМЕТ «МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ»

Медицинскую микробиологию (от греч. *micros* — малый, *bios* — жизнь, *logos* — учение) можно определить как науку, которая изучает микробы во всем многообразии их отношений с организмом человека.

Микробы — это микроскопически малые живые существа, как правило, одноклеточные. Увидеть их можно только с помощью специальных приборов — микроскопов.

Микробы поистине вездесущи. Возникнув на нашей планете 3–4 млрд лет назад, то есть задолго до появления растений и животных, они теперь являются самой многочисленной и разнообразной группой живых существ. Микробы можно обнаружить практически везде. Они незримо присутствуют в почве, воздухе, воде, пище, которую мы принимаем, населяют все экологические ниши, начиная ото льдов Антарктиды до гейзеров Камчатки, от соленых вод Мертвого моря до африканских пустынь, выдерживая высокую концентрацию соли и инсоляцию (облучение солнечными лучами). В самых глубоких впадинах на дне Тихого океана обнаружены микробы.

Микробы обладают потрясающей устойчивостью к вредным факторам окружающей среды. Амплитуда колебаний температуры, при которой микробы жизнеспособны, находится в пределах от -270 до 400 °С. Некоторые виды микробов размножаются даже в ядерных реакторах и сохраняются в космосе.

Изучение влияния факторов космического полета и открытого космоса на состояние систем «микроорганизмы — конструкционные материалы орбитальных станций» служит подтверждением способности представителей прокариот и микроскопических эукариот выживать в

условиях открытого космоса в течение 18 мес, что может быть соизмеримо по времени с длительностью полета на Марс и возвращения на Землю.

Подчеркивая исключительную роль микробов, основатель микробиологии, выдающийся французский ученый Луи Пастер писал: «Микробы — бесконечно малые существа, играющие в природе бесконечно большую роль».

Микробы могут заселять наружные покровы и слизистые оболочки других живых организмов, вступая с ними в симбиоз. Сотни видов микробов способны вызывать заболевания у человека и животных, которые называются патогенными.

Для патогенных микробов характерны инфективность, включающая адгезию (прилипание к клеткам) и колонизацию экологических ниш в организме человека; инвазивность — способность микробов перемещаться из первоначально колонизируемой ниши в другие, проникать вглубь тканей и клеток; токсичность — способность нарушать процессы метаболизма или работу жизненно важных центров организма человека.

Условно-патогенные микробы вызывают болезни у человека лишь при определенных условиях. Свыше 400 видов условно-патогенных микробов могут вызвать заболевания у человека. Среди них есть микробы, обитающие в пищевых продуктах, почве, воде, отходах деятельности человека. Они способны существовать в организме человека, но это не является необходимым этапом в их развитии и размножении.

Значительная часть условно-патогенных микробов — это постоянные обитатели различных экологических ниш организма человека, они называются *резидентами*.

Микробы-резиденты состоят в симбиотических отношениях с организмом и приносят ему большую пользу, когда находятся под контролем иммунной системы и механизмов неспецифической резистентности. Однако при определенных условиях они выходят из-под контроля иммунной системы и причиняют вред организму. Заболевания, вызываемые резидентами, называются *оппортунистическими*.

Медицинская микробиология — это прежде всего наука о микробах, способных заселить (колонизировать) организм человека и/или вступить во взаимодействие с ним, а также о методах диагностики, профилактики и лечения инфекционных болезней, вызываемых бактериями и доклеточными инфекционными агентами — вирусами, вириоидами, прионами.

Предметом изучения медицинской микробиологии являются патогенные (болезнетворные) и условно-патогенные (в том числе резидентные виды, населяющие организм здорового человека) микробы.

Каждый раздел медицинской микробиологии позволяет проанализировать изучаемый объект — микроб.

Морфология микробов — это раздел микробиологии, изучающий форму, структуру и строение микробных клеток. Физиология микробов изучает биологические функции: метаболизм, транспорт питательных веществ, питание, дыхание, рост и размножение (репродукцию). Генетика бактерий изучает строение бактериального генома, механизмы наследственности и изменчивости. Таксономия бактерий изучает систематику многообразного микробного мира, деление бактерий на типы, классы, порядки и другие таксономические группы.

1.2. ЗАДАЧИ И МЕТОДЫ МЕДИЦИНСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Важнейшая задача медицинской микробиологии — выявление микробов-возбудителей инфекционных болезней. Поэтому методы микробиологии направлены на изучение свойств микробов, обуславливающих их патогенное действие, и процессы, которые возникают под их влиянием в организме человека и животных.

К основным методам микробиологии относятся:

- микроскопический — изучение морфологии микробов с использованием специальной микроскопической техники;
- бактериологический (культуральный) — получение чистых культур микробов и изучение их биологических свойств, позволяющие провести идентификацию, то есть определение вида микроба;
- серологический — выявление антител к возбудителям в биологических жидкостях организма больного (чаще в сыворотке крови; от лат. *serum* — сыворотка);
- аллергологический — оценка аллергических феноменов, возникающих в организме человека (на коже, слизистых оболочках или в крови) под действием компонентов или цельных клеток микроба-возбудителя;
- биологический — моделирование инфекционных процессов на лабораторных животных или куриных эмбрионах;
- хемотаксономический — идентификация микробов по продуктам их жизнедеятельности непосредственно в организме (без предваритель-

axborof-resurs markaz

ного культивирования на питательных средах). Для этого применяют газовую и газожидкостную хроматографию;

- молекулярно-биологический — изучение состава микробных нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции, секвенирования и гибридизации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

Помимо диагностики инфекционных заболеваний, медицинская микробиология разрабатывает методы создания специфических средств профилактики (получение вакцин) и терапии (иммунные сыворотки) инфекционных болезней. Современная медицинская биотехнология как наука, отделившаяся от микробиологии в XX в., позволяет создать принципиально новые генно-инженерные вакцины, синтетические иммуномодуляторы, диагностикумы и вакцинные препараты.

Это особенно важно в связи с обнаружением возбудителей новых инфекционных болезней. За последние 30–40 лет появилось свыше 50 новых микробов — возбудителей опасных инфекционных болезней: болезни легионеров, геморрагической лихорадки Марбург, Эбол, инфекционного Т-клеточного лейкоза, инфекции вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), гепатитов С, D, E, *ТТВ*, атипичной пневмонии (тяжелый острый респираторный синдром), губчатой энцефалопатии (коровье бешенство), птичьего гриппа и т.д.

С древнейших времен человек использовал процессы, в которых принимают участие микробы, для получения пищевых продуктов: приготовления теста, квашения капусты и овощей, пивоварения, виноделия, получения молочнокислых продуктов, сыра и т.п. В повседневной жизни мы постоянно сталкиваемся с продуктами, получаемыми при непосредственном участии микробов. Это антибиотики, витамины, ферменты, кровезаменители, различные органические кислоты. По скорости производства белка микробы не имеют себе равных среди живых существ.

Какое место занимают микробы на иерархической лестнице живых существ? До открытия микробов все живые существа относили к двум царствам: растений и животных. Микробы были отнесены к третьему царству — протистов (Э. Геккель), которое разделили на высшие протисты (грибы, водоросли и простейшие) и низшие протисты (бактерии и сине-зеленые водоросли).

После того как английский физик Р. Гук с помощью примитивного микроскопа открыл клетку (1665), понадобилось еще более чем полтора столетия, пока в 1839 г. Т. Шванном (1810–1882) и М. Шлейденем

(1804–1881) не была сформулирована клеточная теория строения органического мира.

Оказалось, что все живое на Земле, независимо от того, относится ли оно к царству животных или растений, построено из элементарных единиц — клеток. Клетка является основной структурной единицей любой живой материи, то есть общим знаменателем в конструкции организмов.

Дальнейшее изучение морфологии и анатомии клеток выявило различие в клетках. Р. Мерей в 1968 г., основываясь на принципиальных различиях строения клеток, предложил все клеточные организмы разделить на два царства:

1) прокариотов (от греч. про — «до», карион — «ядро», то есть доядерные);

2) эукариотов (эу — «хорошо», то есть с настоящим, истинным ядром).

Микробы есть в обоих царствах, а бактерии принадлежат только к царству прокариотов.

Принципиальное отличие прокариотов от эукариотов заключается в том, что эукариоты имеют четко дифференцированное ядро, ограниченное от цитоплазмы ядерной мембраной. Такого ядра у прокариотической клетки нет. У нее есть аналог — нуклеоид, представляющий собой двунитевую, ковалентно-замкнутую молекулу ДНК. Ее часто называют хромосомой, хотя, в отличие от хромосом эукариотов, с ней не соединены белки-гистоны.

1.3. ОТКРЫТИЕ И ИЗУЧЕНИЕ МИРА МИКРОБОВ

Удивительный мир микробов открыл голландский коммерсант Антоний Ван Левенгук (1632–1723). Его страстным увлечением было изготовление линз-чечевиц, которые он называл «микроскопии». Эти одинарные двояковыпуклые стекла, отлично отшлифованные и оправленные в серебро или латунь, давали увеличение до 300 раз. В дальнейшем он сконструировал прибор, напоминающий современный микроскоп.

Левенгук знаменит тем, что открыл микробы (1676) — огромный мир мелких «зверушек», как он их называл — «анималькулей». «Сколько чудес таят в себе эти



А. Левенгук (1632–1723)

крохотные создания», — писал он в одном из писем в Лондонское королевское общество, членом которого был избран. Исследуя зубной налет, он отмечал: «В полости моего рта их было, наверное, больше, чем людей в Соединенном Королевстве. Я видел в материале множество простейших животных, весьма оживленно двигавшихся. Они в десятки тысяч раз тоньше волоска из моей бороды».

Левенгук увидел и описал все формы микробов: кокки, палочковидные и извитые. Он повсюду обнаруживал этих маленьких «зверушек»: в дождевой воде, воде каналов, настое корней растений, испражнениях, зубном налете — и пришел к выводу, что окружающий мир густо заселен микробами.

Открытый Левенгуком мир микробов был настолько фантастическим, что на протяжении почти 50 последующих лет вызывал всеобщее изумление.

Однако вначале существование микробов было воспринято научной общественностью только как интересный факт, как курьез, который не имеет существенного практического значения. И только в дальнейшем благодаря развитию микроскопической техники во второй половине XIX в. и работам великого французского химика Луи Пастера (1822–1895) по изучению процессов брожения мир микроскопических существ вновь начинает привлекать к себе внимание исследователей.

В 1856 г. Л. Пастер решает очень важную проблему болезней вина и пива. Во Франции большое количество вина и пива портилось, и страна



Л. Пастер (1822–1895)

несла колоссальные убытки. Пастер установил, что в этих продуктах развивается много посторонней микрофлоры, попадающей из воздуха и используемой аппаратуры. Он предложил прогревать указанные продукты при 50–60 °С, что приводило к гибели вегетативных форм микробов. Этот метод получил название «пастеризация». В целях уничтожения спор микробов Л. Пастер предложил стерилизацию жидкостей при 120 °С, а твердых предметов — при 140 °С.

В 1868 г. Л. Пастер спас промышленность Франции, производящую шелк, показав, что болезни шелковичных червей,

формирующих шелковые нити, вызываются микробами, и предложив меры профилактики.

Открыв микробную природу брожения, гниения и болезни шелковичных червей, Л. Пастер пришел к заключению, что причиной инфекционных заболеваний человека и животных являются живые микробы. Ученый открыл возбудителей куриной холеры, родильной горячки, остеомиелита, септицемии, абсцессов. С 1880 по 1885 г. Пастер разрабатывает и создает метод приготовления вакцин для профилактики заразных болезней. Получив вакцины против куриной холеры, сибирской язвы и бешенства, он делает очень важный вывод, что ослабленные (аттенуированные) микробы, введенные в организм, создают в нем иммунитет против последующих заражений вирулентными микробами.

Отмечая исключительный вклад Л. Пастера в создание вакцины против бешенства, станции, где проводили иммунизацию его вакциной, называли пастеровскими. Первая в России и вторая в мире пастеровская станция была открыта в Одессе в 1886 г. И.И. Мечниковым и Н.Ф. Гамалеей.

Своими гениальными трудами Л. Пастер утвердил в микробиологии физиологический метод исследования, доказал этиологическую роль микробов, разработал научный принцип вакцинации, то есть стал основоположником микробиологии.

Л. Пастер по праву считается отцом микробиологии и иммунологии — с его именем связаны важнейшие открытия, положившие начало этим наукам. В 1885 г. Л. Пастер создал вакцину против бешенства. Антирабическая вакцина (*rabies* — бешенство) была приготовлена из фиксированного вируса бешенства (вирус — от франц. «яд» или «токсин»). Спустя более чем столетие этот термин приобрел новое, современное содержание.

Имя Л. Пастера носит основанный им (в 1888 г. на средства, собранные по международной подписке) институт в Париже. Пастеровский институт стал центром мировой микробиологической науки в XIX в. и удерживает эти позиции до сих пор. Последователями французской школы были работавшие в Пастеровском институте выдающиеся русские ученые И.И. Мечников, С.Н. Виноградский, Н.Ф. Гамалея, В.М. Хавкин, А.М. Безредка и др.

Параллельно со школой Л. Пастера развивалась и достигла больших успехов немецкая школа микробиологов, основоположником которой был Роберт Кох (1843–1910). Ему удалось культивировать и описать возбудителя сибирской язвы (1876), стафилококка (1878), возбудителей



Р. Кох (1843–1910)

раневых инфекций и столбняка (1889), возбудителя туберкулеза (палочка Коха) и туберкулина, который нашел применение в диагностике этой инфекции, холерного вибриона и пути его передачи (1883–1884), открыть возбудителей возвратного тифа, трипаносомоза и других инфекций.

В 1891 г. Р. Кох возглавил основанный им Институт инфекционных болезней в Берлине. Р. Кох создал многие важнейшие методы исследования: ввел в практику анилиновые красители, предложил использовать в микроскопии иммерсионные системы и конденсор, разработал метод культивирования микроорганизмов на биологических жидкостях и плотных питательных средах, ввел в практику метод дробных посевов. В 1905 г. он был удостоен Нобелевской премии по физиологии и медицине за открытие и выделение возбудителя туберкулеза.

Ярким представителем немецкой школы микробиологов был Пауль Эрлих (1854–1915). Начиная с 1891 г. П. Эрлих занимался поисками путей получения химических соединений, способных подавлять жизнедеятельность возбудителей заболеваний. Он ввел в практику лечение четырехдневной малярии красителем метиленовым синим, предложил использовать трипановый красный для лечения трипаносомоза. Особое значение имели работы П. Эрлиха по лечению сифилиса органическими соединениями мышьяка. В 1907 г. П. Эрлих сообщил об открытии арсфенамина (производного арсенобензола) — эффективного средства против сифилиса, которое ученый назвал Сальварсаном⁹ (от лат. *salvatio* — спасение). Вещество



П. Эрлих (1854–1915)

известно также под названием «препарат 606», поскольку было 606-м по счету из опробованных Эрлихом соединений. Вскоре появился и Неосальварсан⁹, или препарат 914.

В 1890–1895 гг. П. Эрлих, работая у Р. Коха в Институте инфекционных болезней в Берлине, разработал метод определения активности антитоксических сывороток и изучения взаимодействия антиген–антитело *in vitro*. Создал теорию боковых цепей, сыгравшую большую роль в развитии иммунологии. В 1896 г. основал

и возглавил Институт по изучению и проверке сывороток (ныне носит имя П. Эрлиха). За создание теории гуморального иммунитета был удостоен Нобелевской премии в 1908 г.

Основываясь на принципах гуморальной иммунной теории, разработанной П. Эрлихом, Э. Беринг в 1890 г. получил антитоксическую сыворотку для лечения дифтерии, а в 1923 г. рамон — дифтерийный анатоксин.

Большой вклад в развитие медицинской микробиологии внесли отечественные ученые. Своими открытиями они способствовали расцвету новых областей микробиологической науки.

С именем И.И. Мечникова связано возникновение современной иммунологии. За открытие фагоцитарной теории иммунитета в 1908 г. И.И. Мечникову была присуждена Нобелевская премия.

Нашему отечественному ученому Д.И. Ивановскому принадлежит честь открытия вирусов. В 1944 г. известный американский вирусолог У. Стенли писал: «Я полагаю, что имя Ивановского в науке о вирусах следует рассматривать почти в том же свете, что и имена Пастера и Коха в микробиологии».

Большой вклад в изучение инфекционного процесса и борьбу с эпидемиями внесли многие отечественные микробиологи. Н.Ф. Гамалее (1859–1949) принадлежат заслуги в области ликвидации оспы в нашей стране. Он был автором многочисленных научных исследований, в том числе посвященных бешенству, холере, чуме и другим серьезным проблемам. Чрезвычайно большую роль имели работы Л.С. Ценковского (1822–1887) по борьбе с сибирской язвой.

Благодаря самоотверженной деятельности Г.Н. Габричевского (1860–1907) в России было организовано производство противодифтерийной сыворотки, создана вакцина от скарлатины. Г.Н. Габричевский основал первый в России бактериологический институт и первую кафедру микробиологии в Московском государственном университете.

В работах С.Н. Виноградского (1856–1953) заложены основы современного понимания метаболизма прокариот и возникла новая наука — почвенная микробиология.

Большой вклад в развитие отечественной микробиологии и эпидемиологии



И.И. Мечников (1845–1916)

внесли отечественные ученые-микробиологи Л.А. Тарасевич (1868–1927), Д.К. Заболотный (1866–1929), П.В. Циклинская (1859–1923).

В 1943 г. благодаря работам З.В. Ермольевой (1898–1974) и Г.Ф. Гаузе были получены первые отечественные антибиотики — пенициллин, грамицидин С, стрептомицин, создан первый в России институт получения антибиотиков.

Широкую известность за рубежом получили работы советских ученых: П.Ф. Здродовского (1890–1976) — по исследованию риккетсиозов, вирусно-генетическая теория канцерогенеза А.А. Зильбера (1894–1966), М.П. Чумакова и А.А. Смородинцева (1901–1986) — по исследованию вирусных энцефалитов и созданию отечественной вакцины против полиомиелита, П.Н. Кашкина (1902–1992) — по исследованию грибов и созданию отечественной медицинской микологии, Н.П. Елинова, А.А. Воробьева — по созданию новых микробных биотехнологий и многих других.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Отметьте, кому из перечисленных ниже ученых принадлежала честь создания первой вакцины против бешенства:

1. Л. Пастер.
2. Р. Кох.
3. И. Мечников.
4. А. Левенгук.

Б. Отметьте, кому из перечисленных ниже ученых принадлежала честь создания фагоцитарной теории иммунитета, за которую он был удостоен Нобелевской премии:

1. Л. Пастер.
2. Р. Кох.
3. И. Мечников.
4. П. Эрлих.

В. Отметьте, кому из перечисленных ниже ученых принадлежала честь первому культивировать и описать возбудителей туберкулеза и холеры:

1. П. Эрлих.
2. И. Мечников.
3. Л. Пастер.
4. Р. Кох.

Глава 2

МОРФОЛОГИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ МИКРОБОВ

2.1. СИСТЕМАТИКА И НОМЕНКЛАТУРА МИКРОБОВ

Мир микробов можно разделить на клеточные и неклеточные формы. Клеточные формы микробов представлены бактериями, грибами и простейшими. Их можно называть *микроорганизмами*. Неклеточные формы представлены вирусами, виридами и прионами.

Новая классификация клеточных микробов включает следующие таксономические единицы: домены, царства, типы, классы, порядки, семейства, роды, виды. В основу классификации микроорганизмов положены их генетическое родство, а также морфологические, физиологические, антигенные и молекулярно-биологические свойства.

Вирусы нередко рассматриваются не как организмы, а как автономные генетические структуры, поэтому они будут рассмотрены отдельно.

Клеточные формы микробов разделены на три домена. Домены *Bacteria* и *Archaeobacteria* включают микробы с прокариотическим типом строения клетки. Представители домена *Eukarya* являются эукариотами. Он состоит из 4 царств:

- 1) царства грибов (*Fungi, Eumycota*);
- 2) царства простейших (*Protozoa*);
- 3) царства *Chromista* (хромовики);
- 4) микробов с неуточненным таксономическим положением (*Microspora*, микроспоридии).

Различия в организации прокариотической и эукариотической клеток представлены в табл. 2.1.

2.2. КЛАССИФИКАЦИЯ И МОРФОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Термин «бактерия» происходит от слова *bacterion*, что означает «палочка». Бактерии относятся к прокариотам. Их разделяют на два доме-

Таблица 2.1. Признаки прокариотической и эукариотической клетки

Отличительный признак	Эукариотическая клетка	Прокариотическая клетка
Наличие истинного ядра, отделенного от цитоплазмы ядерной мембраной, в котором присутствуют ядрышко и связанные с молекулой ДНК белки-гистоны	+	Истинное ядро отсутствует, вместо него присутствует нуклеоид с гаплоидным набором генов
Наличие в цитоплазме вторичных мембранных образований (митохондрии, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум)	+	—
Присутствие стеролов в цитоплазматической мембране	+	— (за исключением микоплазм)
Рибосомы	Типа 80S	Типа 70S
Наличие в клеточной стенке пептидогликана	—	+

на: *Bacteria* и *Archaeobacteria*. Бактерии, входящие в домен *Archaeobacteria*, представляют одну из древнейших форм жизни. Они имеют особенности строения клеточной стенки (у них отсутствует пептидогликан) и рибосомальной рибонуклеиновой кислоты (РНК). Среди них отсутствуют возбудители инфекционных заболеваний.

Внутри домена бактерии подразделяются на следующие таксономические категории: класс, тип, порядок, семейство, род, вид.

Одной из основных таксономических категорий является вид (*species*). *Вид* — это совокупность особей, имеющих единое происхождение и генотип, объединенных по близким свойствам, отличающим их от других представителей рода. Название вида соответствует бинарной номенклатуре, то есть состоит из двух слов. Например, возбудитель дифтерии пишется как *Corynebacterium diphtheriae*. Первое слово — название рода и пишется с прописной буквы, второе слово обозначает вид и пишется со строчной буквы. При повторном упоминании вида родовое название сокращается до начальной буквы, например *C. diphtheriae*.

Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующихся сходными морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называется «чистая культура». Чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называется

«штамм». Близким к понятию «штамм» является понятие «клон». Клон представляет собой совокупность потомков, выращенных из единственной микробной клетки.

Для обозначения некоторых совокупностей микроорганизмов, отличающихся по тем или иным свойствам, употребляется суффикс «вар» (разновидность), поэтому микроорганизмы в зависимости от характера различий обозначают как морфовары (отличие по морфологии), резистентовары (отличие по устойчивости, например, к антибиотикам), серовары (отличие по антигенам), фаговары (отличие по чувствительности к бактериофагам), биовары (отличие по биологическим свойствам), хемовары (отличие по биохимическим свойствам) и т.д.

Раньше основу классификации бактерий составляла особенность строения клеточной стенки. Подразделение бактерий по особенностям строения клеточной стенки связано с возможной вариабельностью их окраски в тот или иной цвет по методу Грама. Согласно этому методу, предложенному в 1884 г. датским ученым Х. Грамом, в зависимости от результатов окраски бактерии делятся на грамположительные, окрашиваемые в сине-фиолетовый цвет, и грамотрицательные, окрашиваемые в красный цвет.

В настоящее время основу классификации составляет степень генетического родства, основанная на изучении строения генома рибосомных РНК (рРНК) (см. гл. 5), определении процентного содержания в геноме гуанинцитозиновых пар, построении рестрикционной карты генома, изучении степени гибридизации. Также учитываются и фенотипические показатели: отношение к окраске по Граму, морфологические, культуральные и биохимические свойства, антигенная структура.

Домен *Bacteria* включает 30 типов, из которых медицинское значение имеют изложенные ниже типы.

Большинство грамотрицательных бактерий объединены в тип *Proteobacteria* (по имени греческого бога *Proteus*, способного принимать различные облики). Тип *Proteobacteria* подразделен на 5 классов:

- 1) класс *Alphaproteobacteria* (роды *Rickettsia*, *Orientia*, *Erlichia*, *Bartonella*, *Brucella*);
- 2) класс *Betaproteobacteria* (роды *Bordetella*, *Burholderia*, *Neisseria*, *Spirillum*);
- 3) класс *Gammaaproteobacteria* (представители семейства *Enterobacteriaceae*, роды *Francisella*, *Legionella*, *Coxiella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*);
- 4) класс *Deltaproteobacteria* (род *Bilophila*);
- 5) класс *Epsilonproteobacteria* (роды *Campilobacter*, *Helicobacter*).

Грамотрицательные бактерии входят также в следующие типы:

- тип *Chlamydiae* (роды *Chlamydia*, *Chlamydophila*);
- тип *Spirochaetes* (роды *Spirocheta*, *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*);
- тип *Bacteroides* (роды *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*);
- тип *Fusobacteria* включает класс *Fusobacteria*, род *Fusobacterium*.

Грамположительные бактерии входят в следующие типы:

- тип *Firmicutes* включает класс *Clostridium* (роды *Clostridium*, *Peptococcus*), класс *Bacilli* (*Listeria*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*);
- тип *Actinobacteria* (роды *Actinomyces*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Mobiluncus*);
- тип *Tenericutes* включает класс *Mollicutes* (роды *Mycoplasma*, *Ureaplasma*), которые являются бактериями, не имеющими клеточной стенки.

2.2.1. Морфологические формы бактерий

Различают несколько основных форм бактерий (рис. 2.1):

- кокковидные;
- палочковидные;
- извитые;
- ветвящиеся.

Сферические формы, или кокки, — шаровидные бактерии размером 0,5–1,0 мкм, которые по взаимному расположению делятся на микрококки, диплококки, стрептококки, тетракокки, сарцины и стафилококки.

Микрококки (от греч. *micros* — малый) — отдельно расположенные клетки.

Диплококки (от греч. *diploos* — двойной), или парные кокки, располагаются парами (пневмококк, гонококк, менингококк), так как клетки после деления не расходятся. Пневмококк (возбудитель пневмонии) имеет с противоположных сторон ланцетовидную форму, а гонококк (возбудитель гонореи) и менингококк (возбудитель эпидемического менингита) имеют форму кофейных зерен, обращенных вогнутой поверхностью друг к другу.

Стрептококки (от греч. *streptos* — цепочка) — клетки округлой или вытянутой формы, составляющие цепочку вследствие деления клеток в одной плоскости и сохранения связи между ними в месте деления.

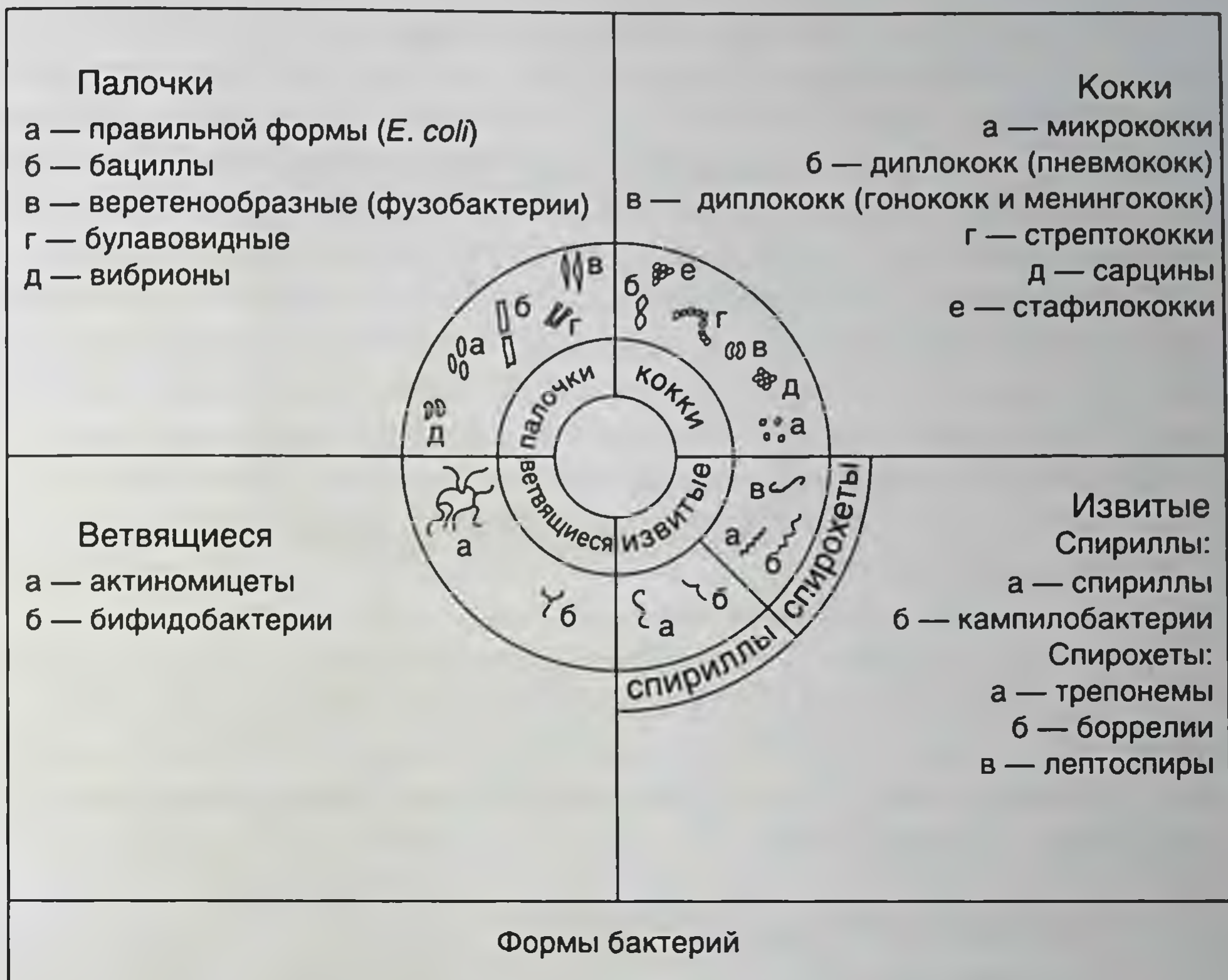


Рис. 2.1. Формы бактерий

Сарцины (от лат. *sarcina* — связка, тук) располагаются в виде пакетов из 8 кокков и более, так как они образуются при делении клетки в трех взаимно перпендикулярных плоскостях.

Стафилококки (от греч. *staphyle* — виноградная гроздь) — кокки, расположенные в виде грозди винограда в результате деления в разных плоскостях.

Палочковидные бактерии различаются по размерам, форме концов клетки и взаимному расположению клеток. Длина клеток 1–10 мкм, толщина 0,5–2,0 мкм. Палочки могут быть правильной (кишечная палочка и др.) и неправильной булавовидной (коринебактерии и др.) формы. К наиболее мелким палочковидным бактериям относятся риккетсии.

Концы палочек могут быть как бы обрезанными (сибирязвенная бацилла), закругленными (кишечная палочка), заостренными (фузобактерии) или в виде утолщения. В последнем случае палочка похожа на булаву (коринебактерии дифтерии).

Слегка изогнутые палочки называются вибрионами (холерный вибрион). Большинство палочковидных бактерий располагается беспорядочно, так как после деления клетки расходятся. Если после деления клетки остаются связанными общими фрагментами клеточной стенки и не расходятся, то они располагаются под углом друг к другу (коринебактерии дифтерии) или образуют цепочку (сибиреязвенная бацилла).

Извитые формы — спиралевидные бактерии, которые бывают двух видов: спириллы и спирохеты. *Спириллы* имеют вид штопорообразно извитых клеток с крупными завитками. К патогенным спириллам относятся возбудитель содоку (болезнь укуса крыс), а также кампилобактерии и хеликобактерии, имеющие изгибы, напоминающие крылья летящей чайки. *Спирохеты* представляют тонкие длинные извитые бактерии, отличающиеся от спирилл более мелкими завитками и характером движения. Особенность их строения описана ниже.

Ветвящиеся формы — палочковидные бактерии, которые могут иметь разветвление в форме латинской буквы Y, встречаемое у бифидобактерий, также могут быть представленными в виде нитевидных разветвленных клеток, способных переплетаться, образуя мицелий, что наблюдается у актиномицет.

2.2.2. Структура бактериальной клетки

Структура бактерий хорошо изучена с помощью электронной микроскопии целых клеток и их ультратонких срезов, а также других методов. Бактериальную клетку окружает оболочка, состоящая из клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. Под оболочкой находится протоплазма, состоящая из цитоплазмы с включениями и наследственного аппарата — аналога ядра, называемого «нуклеоид» (рис. 2.2). Имеются дополнительные структуры: капсула, микрокапсула, слизь, жгутики, пили. Некоторые бактерии в неблагоприятных условиях способны образовывать споры.

Клеточная стенка — прочная, упругая структура, придающая бактерии определенную форму и вместе с подлежащей цитоплазматической мембраной сдерживающая высокое осмотическое давление в бактериальной клетке. Она участвует в процессе деления клетки и транспорте метаболитов, имеет рецепторы для бактериофагов, бактериоцинов и различных веществ. Наиболее толстая клеточная стенка у грамположительных бактерий (рис. 2.3). Так, если толщина клеточной стенки грамотрицательных бактерий около 15–20 нм, то у грамположительных она может достигать 50 нм и более.

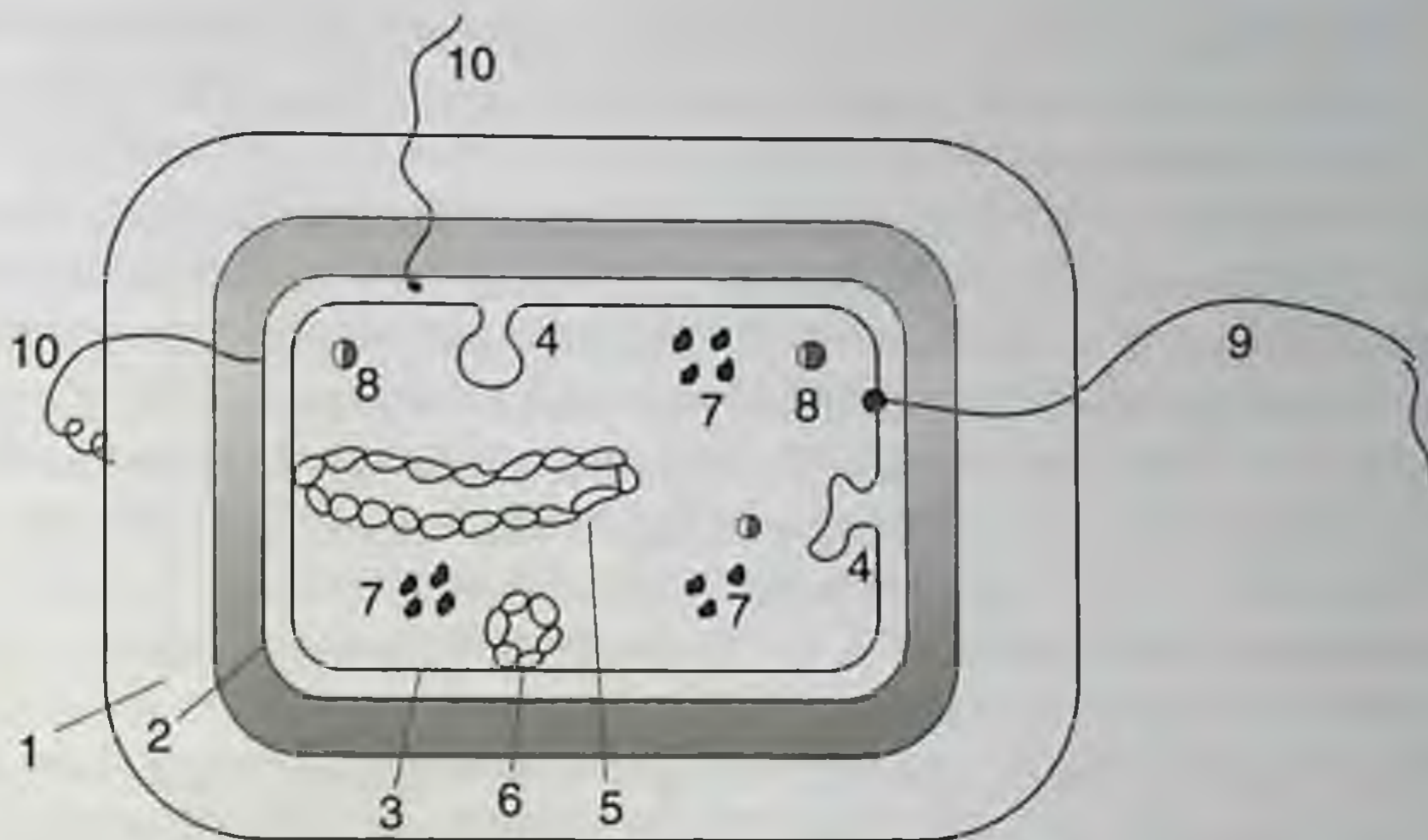


Рис. 2.2. Структура бактериальной клетки: 1 — капсула; 2 — клеточная стенка; 3 — цитоплазматическая мембрана; 4 — мезосомы; 5 — нуклеоид; 6 — плаزمиды; 7 — рибосомы; 8 — включения; 9 — жгутик; 10 — пили (ворсинки)

Липотейховые кислоты,
пронизывающие стенку
и закрепленные
в мембране



Липидный бислои плазматической
мембраны с включенными белками

Грамположительные



Липидный бислои плазматической
мембраны с включенными белками

Грамотрицательные

Рис. 2.3. Схема архитектоники клеточной стенки бактерий

Основу клеточной стенки бактерий составляет *пептидогликан*. Пептидогликан является полимером. Он представлен параллельными полисахаридными гликановыми цепями, состоящими из повторяющихся

остатков N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенных гликозидной связью. Эту связь разрывает лизоцим, являющийся ацетилмурамидазой.

К N-ацетилмурамовой кислоте ковалентными связями присоединен *тетрапептид*, который состоит из L-аланина, связанного с N-ацетилмурамовой кислотой; D-глутамина, который у грамположительных бактерий соединен с L-лизином, а у грамотрицательных бактерий — с диаминопимелиновой кислотой, представляющей собой предшественник лизина в процессе бактериального биосинтеза аминокислот и служащей уникальным соединением, присутствующим только у бактерий; 4-й аминокислотой является D-аланин (рис. 2.4).

В клеточной стенке грамположительных бактерий содержится небольшое количество полисахаридов, липидов и белков. Основным компонентом клеточной стенки этих бактерий является многослойный пептидогликан (муреин, мукопептид), составляющий 40–90% массы клеточной стенки. Тетрапептиды разных слоев пептидогликана у грамположительных бактерий соединены друг с другом полипептидными цепочками из 5 остатков глицина (пентаглицина), что придает пептидогликану жесткую геометрическую структуру (см. рис. 2.4, б). С пептидогликаном клеточной стенки грамположительных бактерий ковалентно связаны *тейхоевые кислоты* (от греч. *tekhos* — стенка), молекулы которых представляют собой цепи из 8–50 остатков глицерола и рибитола, соединенных фосфатными мостиками. Форму и прочность бактериям

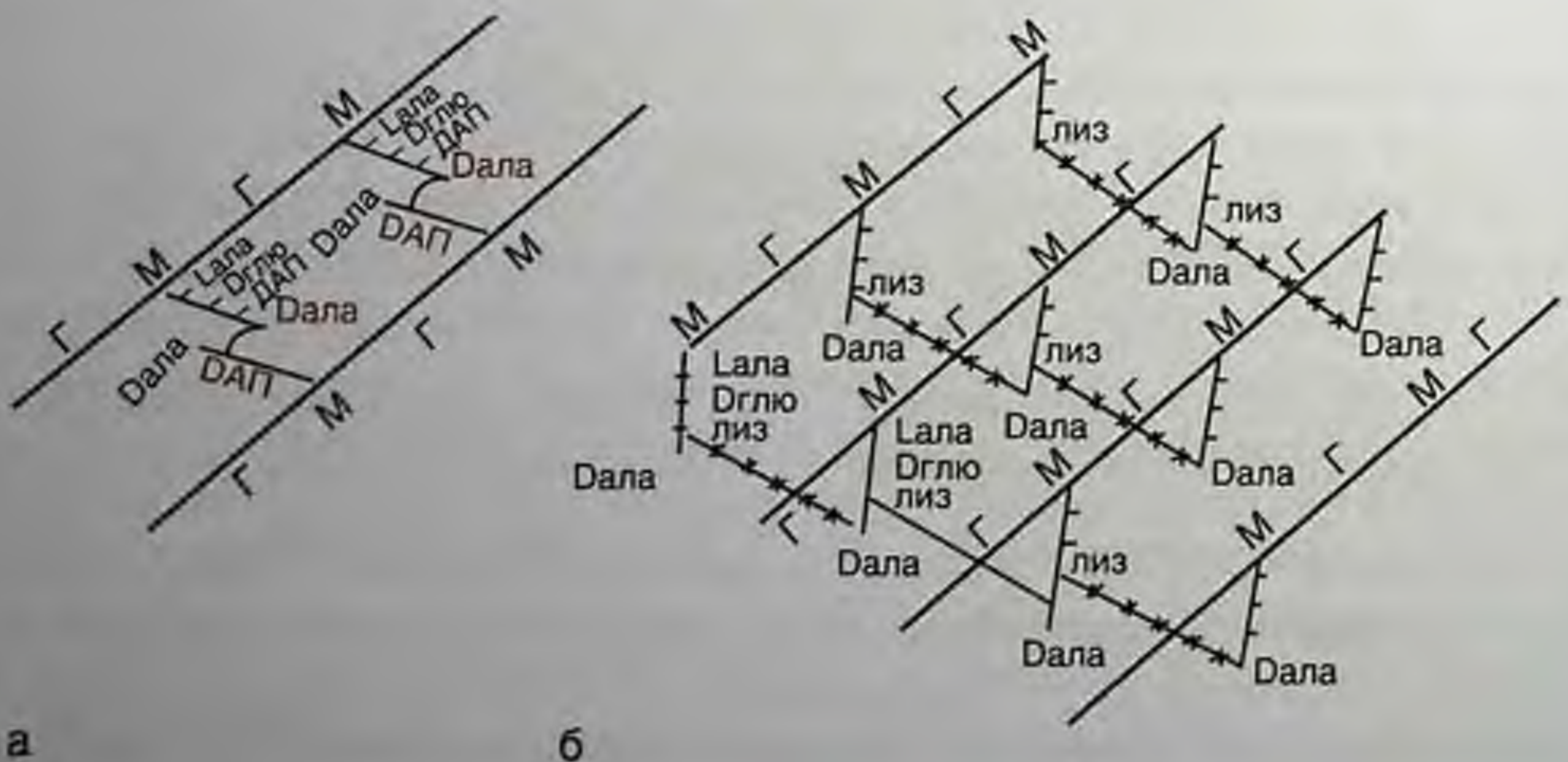


Рис. 2.4. Структура пептидогликана: а — грамотрицательные бактерии; б — грамположительные бактерии

придает жесткая волокнистая структура многослойного, с поперечными пептидными сшивками пептидогликана.

Способность грамположительных бактерий при окраске по Граму удерживать генциановый фиолетовый в комплексе с йодом (сине-фиолетовая окраска бактерий) связана со свойством многослойного пептидогликана взаимодействовать с красителем. Кроме этого, последующая обработка мазка бактерий спиртом вызывает сужение пор в пептидогликане и тем самым задерживает краситель в клеточной стенке.

Грамотрицательные бактерии после воздействия спиртом утрачивают краситель, что обусловлено меньшим количеством пептидогликана (5–10% массы клеточной стенки); они обесцвечиваются спиртом и при обработке фуксином или сафранином приобретают красный цвет. Это связано с особенностями строения клеточной стенки. Пептидогликан в клеточной стенке грамотрицательных бактерий представлен 1–2 слоями. Тетрапептиды слоев соединены между собой прямой пептидной связью между аминогруппой диаминопимелиновой кислоты одного тетрапептида и карбоксильной группой D-аланина тетрапептида другого слоя (см. рис. 2.4, а). Кнаружи от пептидогликана расположен слой *липопротеина*, соединенный с пептидогликаном через диаминопимелиновую кислоту. За ним следует *наружная мембрана* клеточной стенки.

Наружная мембрана является мозаичной структурой, представленной липополисахаридами (ЛПС), фосфолипидами и белками. Внутренний слой ее представлен фосфолипидами, а в наружном слое расположен ЛПС (рис. 2.5). Таким образом, наружная мембрана асимметрична. ЛПС наружной мембраны состоит из трех фрагментов:

- 1) из липида А — консервативной структуры, практически одинаковой у грамотрицательных бактерий. Липид А состоит из фосфорилированных глюкозаминовых дисахаридных единиц, к которым прикреплены длинные цепочки жирных кислот (см. рис. 2.5);
- 2) ядра, или стержневой, коровой части (от лат. *core* — ядро), относительно консервативной олигосахаридной структуры;
- 3) высоковариабельной O-специфической цепи полисахарида, образованной повторяющимися идентичными олигосахаридными последовательностями.

ЛПС заякорен в наружной мембране липидом А, обуславливающим токсичность ЛПС и отождествляемым поэтому с эндотоксином. Разрушение бактерий антибиотиками приводит к освобождению большого количества эндотоксина, что может вызвать у больного эндотоксический шок. От липида А отходит ядро, или стержневая часть ЛПС.

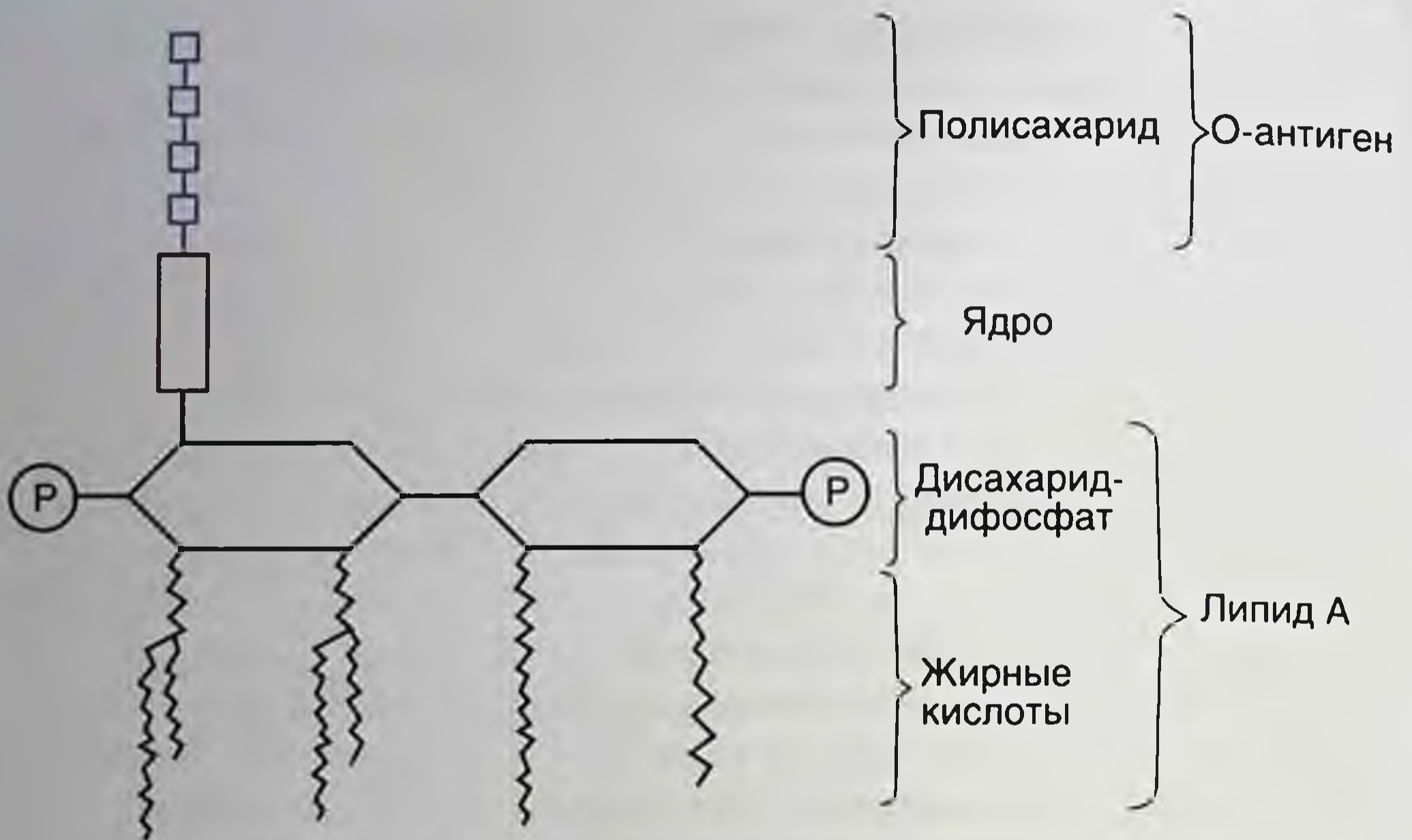


Рис. 2.5. Структура липополисахарида

Наиболее постоянной частью ядра ЛПС является кетодезоксиоктоновая кислота. O-специфическая полисахаридная цепь, отходящая от стержневой части молекулы ЛПС, состоящая из повторяющихся олигосахаридных единиц, обуславливает серогруппу, серовар (разновидность бактерий, выявляемая с помощью иммунной сыворотки) определенного штамма бактерий. Таким образом, с понятием «липополисахарид» связаны представления об O-антигене, по которому можно дифференцировать бактерии. Генетические изменения могут привести к дефектам, укорочению ЛПС-бактерий и появлению в результате этого шероховатых колоний R-форм, теряющих O-антигенную специфичность.

Не все грамотрицательные бактерии имеют полноценную O-специфическую полисахаридную цепь, состоящую из повторяющихся олигосахаридных единиц. В частности, бактерии рода *Neisseria* имеют короткий гликолипид, который называется «липоолигосахарид». Он сравним с R-формой, потерявшей O-антигенную специфичность, наблюдаемой у мутантных шероховатых штаммов *Escherichia coli* (*E. coli*). Структура липоолигосахаарида напоминает структуру гликофинголипида цитоплазматической мембраны человека, поэтому липоолигосахарид мимикрирует микроб, позволяя ему избегать иммунного ответа хозяина.

Белки матрикса наружной мембраны пронизывают ее таким образом, что молекулы белка, называемые «порины», окаймляют гидрофильные поры, через которые проходят вода и мелкие гидрофильные молекулы с относительной массой до 700 Д.

Между наружной и цитоплазматической мембраной находится *периплазматическое пространство*, или периплазма, содержащая ферменты (протеазы, липазы, фосфатазы, нуклеазы, β -лактамазы), а также компоненты транспортных систем.

При нарушении синтеза клеточной стенки бактерий под влиянием лизоцима, пенициллина, защитных факторов организма и других соединений образуются клетки с измененной (часто шаровидной) формой:

- *протопласты* — бактерии, полностью лишенные клеточной стенки;
- *сферопласты* — бактерии с частично сохранившейся клеточной стенкой.

После удаления ингибитора клеточной стенки такие измененные бактерии могут реверсировать, то есть приобретать полноценную клеточную стенку и восстанавливать исходную форму.

Бактерии сферо- или протопластного типа, утратившие способность к синтезу пептидогликана под влиянием антибиотиков или других факторов и способные размножаться, называются «L-формы» (от названия Института им. Д. Листера, где они впервые были изучены). L-формы могут возникать и в результате мутаций. Они представляют собой осмотически чувствительные, шаровидные, колбовидные клетки различной величины, в том числе и проходящие через бактериальные фильтры. Некоторые L-формы (нестабильные) при удалении фактора, приведшего к изменениям бактерий, могут реверсировать, возвращаясь в исходную бактериальную клетку. L-формы могут образовывать многие возбудители инфекционных болезней.

Цитоплазматическая мембрана при электронной микроскопии ультратонких срезов представляет собой трехслойную мембрану (два темных слоя толщиной по 2,5 нм каждый разделены светлым — промежуточным). По структуре она похожа на плазмолемму клеток животных и состоит из двойного слоя липидов, главным образом фосфолипидов, с внедренными поверхностными, а также интегральными белками, как бы пронизывающими насквозь структуру мембраны. Некоторые из них являются пермеазами, участвующими в транспорте веществ. В отличие от эукариотических клеток, в цитоплазматической мембране бактериальной клетки отсутствуют стеролы (за исключением микоплазм).

Цитоплазматическая мембрана является динамической структурой с подвижными компонентами, поэтому ее представляют как мобильную текучую структуру. Она окружает наружную часть цитоплазмы бактерий и участвует в регуляции осмотического давления, в транспорте веществ и энергетическом метаболизме клетки (за счет ферментов цепи переноса электронов, аденозинтрифосфатазы — АТФазы и др.). При избыточном росте (по сравнению с ростом клеточной стенки) цитоплазматическая мембрана образует инвагинаты — впячивания в виде сложно закрученных мембранных структур, называемые «мезосомы». Менее сложно закрученные структуры называются «внутрицитоплазматические мембраны». Роль мезосом и внутрицитоплазматических мембран до конца не выяснена. Предполагают даже, что они являются артефактом, возникающим после приготовления (фиксации) препарата для электронной микроскопии. Тем не менее считают, что производные цитоплазматической мембраны участвуют в делении клетки, обеспечивая энергией синтез клеточной стенки, принимают участие в секреции веществ, спорообразовании, то есть в процессах с высокой затратой энергии. Цитоплазма занимает основной объем бактериальной клетки и состоит из растворимых белков, рибонуклеиновых кислот, включений и многочисленных мелких гранул — рибосом, ответственных за синтез (трансляцию) белков.

Рибосомы бактерий имеют размер около 20 нм и коэффициент седиментации 70S, в отличие от 80S-рибосом, характерных для эукариотических клеток. Поэтому некоторые антибиотики, связываясь с рибосомами бактерий, подавляют синтез бактериального белка, не влияя на синтез белка эукариотических клеток. Рибосомы бактерий могут диссоциировать на две субъединицы: 50S и 30S. рРНК — консервативные элементы бактерий («молекулярные часы» эволюции). 16S-рРНК входит в состав малой субъединицы рибосом, а 23S-рРНК — в состав большой субъединицы рибосом. Изучение 16S-рРНК служит основой геносистематики, позволяя оценить степень родства организмов.

В цитоплазме имеются различные включения в виде гранул гликогена, полисахаридов, β -оксимасляной кислоты и полифосфатов (волютин). Они накапливаются при избытке питательных веществ в окружающей среде и выполняют роль запасных веществ для питания и энергетических потребностей.

Волютин обладает сродством к основным красителям и легко выявляется с помощью специальных методов окраски (например, по Нейссеру) в виде метакроматических гранул. Толуидиновым синим* или

Метиленовым синим^{*} волютин окрашивается в красно-фиолетовый цвет, а цитоплазма бактерии — в синий. Характерное расположение гранул волютина отмечается у дифтерийной палочки в виде интенсивно прокрашивающихся полюсов клетки. Метахроматическое окрашивание волютина связано с высоким содержанием полимеризованного неорганического полифосфата. При электронной микроскопии они имеют вид электронно-плотных гранул размером 0,1–1,0 мкм.

Нуклеоид — эквивалент ядра у бактерий. Он расположен в центральной зоне бактерий в виде двунитевой ДНК, плотно уложенной наподобие клубка. Нуклеоид бактерий, в отличие от эукариот, не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков (гистонов). У большинства бактерий содержится одна хромосома, представленная замкнутой в кольцо молекулой ДНК. Однако у некоторых бактерий имеются две хромосомы кольцевой формы (*V. cholerae*) и линейные хромосомы (см. раздел 5.1.1). Нуклеоид выявляется в световом микроскопе после окраски специфическими для ДНК методами: по Фельгену или Романовскому–Гимзе. На электронограммах ультратонких срезов бактерий нуклеоид имеет вид светлых зон с фибриллярными, нитевидными структурами ДНК, связанной определенными участками с цитоплазматической мембраной или мезосомой, участвующими в репликации хромосомы.

Кроме нуклеоида, в бактериальной клетке имеются внехромосомные факторы наследственности — *плазмиды* (см. раздел 5.1.2), представляющие собой ковалентно замкнутые кольца ДНК.

Капсула, микрокапсула, слизь. *Капсула* — слизистая структура толщиной более 0,2 мкм, прочно связанная с клеточной стенкой бактерий и имеющая четко очерченные внешние границы. Капсула различима в мазках-отпечатках из патологического материала. В чистых культурах бактерий капсула образуется реже. Она выявляется при специальных методах окраски мазка по Бурри–Гинсу, создающих негативное контрастирование веществ капсулы: тушь создает темный фон вокруг капсулы. Капсула состоит из полисахаридов (экзополисахаридов), иногда из полипептидов, например, у сибиреязвенной бациллы она состоит из полимеров D-глутаминовой кислоты. Капсула гидрофильна, включает большое количество воды. Она препятствует фагоцитозу бактерий. Капсула антигенна: антитела к капсуле вызывают ее увеличение (реакция набухания капсулы).

Многие бактерии образуют *микрокапсулу* — слизистое образование толщиной менее 0,2 мкм, выявляемое лишь при электронной микроскопии.

От капсулы следует отличать *слизь* — мукоидные экзополисахариды, не имеющие четких внешних границ. Слизь растворима в воде.

Мукоидные экзополисахариды характерны для мукоидных штаммов синегнойной палочки, часто встречаемых в мокроте больных кистозным фиброзом. Бактериальные экзополисахариды участвуют в адгезии (прилипанию к субстратам); их еще называют *гликокаликсом*.

Капсула и слизь предохраняют бактерии от повреждений, высыхания, так как, являясь гидрофильными, хорошо связывают воду, препятствуют действию защитных факторов макроорганизма и бактериофагов.

Жгутики бактерий определяют подвижность бактериальной клетки. Жгутики представляют собой тонкие нити, берущие начало от цитоплазматической мембраны, имеют большую длину, чем сама клетка. Толщина жгутиков 12–20 нм, длина 3–15 мкм. Они состоят из трех частей: спиралевидной нити, крюка и базального тельца, содержащего стержень со специальными дисками (одна пара дисков у грамположительных и две пары у грамотрицательных бактерий). Дисками жгутики прикреплены к цитоплазматической мембране и клеточной стенке. При этом создается эффект электромотора со стержнем — ротором, вращающим жгутик. В качестве источника энергии используется разность протонных потенциалов на цитоплазматической мембране. Механизм вращения обеспечивает протонная АТФ-синтаза. Скорость вращения жгутика может достигать 100 об/с. При наличии у бактерии нескольких жгутиков они начинают синхронно вращаться, сплетаясь в единый пучок, образующий своеобразный пропеллер.

Жгутики состоят из белка флагеллина (*flagellum* — жгутик), являющегося антигеном — так называемый Н-антиген. Субъединицы флагеллина закручены в виде спирали.

Число жгутиков у бактерий разных видов варьирует от одного (монотрих) у холерного вибриона до десятка и сотен, отходящих по периметру бактерии (перитрих), у кишечной палочки, протей и др. Лофотрихи имеют пучок жгутиков на одном из концов клетки. Амфитрихи имеют по одному жгутику или пучку жгутиков на противоположных концах клетки.

Жгутики выявляют с помощью электронной микроскопии препаратов, напыленных тяжелыми металлами, или в световом микроскопе после обработки специальными методами, основанными на протравливании и адсорбции различных веществ, приводящих к увеличению толщины жгутиков (например, после серебрения).

Ворсинки, или пили (фимбрии), — нитевидные образования, более тонкие и короткие (3–10 нм × 0,3–10 мкм), чем жгутики. Пили отходят от поверхности клетки и состоят из белка пилина. Известно несколько типов пилей. Пили общего типа отвечают за прикрепления к субстрату, питание и водно-солевой обмен. Они многочисленны — несколько сотен на клетку. Половые пили (1–3 на клетку) создают контакт между клетками, осуществляя между ними передачу генетической информации путем конъюгации (см. гл. 5). Особый интерес представляют пили IV типа, у которых концы обладают гидрофобностью, в результате чего они закручиваются. Располагаются они по полюсам клетки. Эти пили встречаются у патогенных бактерий. Они обладают антигенными свойствами, осуществляют контакт бактерии с клеткой-хозяином, участвуют в образовании биопленки (см. гл. 3). Многие пили являются рецепторами для бактериофагов.

Споры — своеобразная форма покоящихся бактерий с грамположительным типом строения клеточной стенки. Спорообразующие бактерии рода *Bacillus*, у которых размер споры не превышает диаметр клетки, называются бациллами. Спорообразующие бактерии, у которых размер споры превышает диаметр клетки, от чего они принимают форму веретена, называются «кlostридии», например бактерии рода *Clostridium* (от лат. *Clostridium* — веретено). Споры кислотоустойчивы, поэтому окрашиваются по методу Ауески или по методу Циля–Нельсена в красный, а вегетативная клетка — в синий цвет.

Спорообразование, форма и расположение спор в клетке (вегетативной) являются видовым свойством бактерий, что позволяет отличать их друг от друга. Форма спор бывает овальной и шаровидной, расположение в клетке — терминальное, то есть на конце палочки (у возбудителя столбняка), субтерминальное — ближе к концу палочки (у возбудителей ботулизма, газовой гангрены) и центральное (у сибиреязвенной бациллы).

Процесс спорообразования (споруляция) проходит ряд стадий, в течение которых часть цитоплазмы и хромосома бактериальной вегетативной клетки отделяются, окружаясь растущей цитоплазматической мембраной, — образуется проспора.

В протопласте проспоры находятся нуклеоид, белоксинтезирующая система и система получения энергии, основанная на гликолизе. Цитохромы отсутствуют даже у аэробов. Не содержится АТФ, энергия для прорастания сохраняется в форме 3-глицеринфосфата.

Проспору окружают две цитоплазматические мембраны. Слой, окружающий внутреннюю мембрану споры, называется «стенка споры», он

состоит из пептидогликана и является главным источником клеточной стенки при прорастании споры.

Между наружной мембраной и стенкой споры формируется толстый слой, состоящий из пептидогликана, имеющего много сшивок, — *кортекс*.

Кнаружи от внешней цитоплазматической мембраны расположена *оболочка споры*, состоящая из кератиноподобных белков, содержащих множественные внутримолекулярные дисульфидные связи. Эта оболочка обеспечивает резистентность к химическим агентам. Споры некоторых бактерий имеют дополнительный покров — *экзоспориум* липопротеиновой природы. Таким образом формируется многослойная плохо проницаемая оболочка.

Спорообразование сопровождается интенсивным потреблением проспорой, а затем и формирующейся оболочкой споры дипиколиновой кислоты и ионов кальция. Спора приобретает термоустойчивость, которую связывают с наличием в ней дипиколината кальция.

Спора долго может сохраняться из-за наличия многослойной оболочки, дипиколината кальция, низкого содержания воды и вялых процессов метаболизма. В почве, например, возбудители сибирской язвы и столбняка могут сохраняться десятки лет.

В благоприятных условиях споры прорастают, проходя три последовательные стадии: активации, инициации, вырастания. При этом из одной споры образуется одна бактерия. Активация — это готовность к прорастанию. При температуре 60–80 °С спора активируется для прорастания. Инициация прорастания длится несколько минут. Стадия вырастания характеризуется быстрым ростом, сопровождаемым разрушением оболочки и выходом проростка.

2.2.3. Особенности строения спирохет, риккетсий, хламидий, актиномицет и микоплазм

Спирохеты — тонкие длинные извитые бактерии. Они состоят из наружной мембранной клеточной стенки, которая окружает цитоплазматический цилиндр. Поверх наружной мембраны располагается прозрачный чехол гликозаминогликановой природы. Под наружной мембранной клеточной стенкой располагаются фибриллы, закручивающиеся вокруг цитоплазматического цилиндра, придавая бактериям винтообразную форму. Фибриллы прикреплены к концам клетки и направлены навстречу друг другу. Число и расположение фибрилл варьи-

руют у разных видов. Фибриллы участвуют в передвижении спирохет, придавая клеткам вращательное, сгибательное и поступательное движение. При этом спирохеты образуют петли, завитки, изгибы, которые названы вторичными завитками. Спирохеты плохо воспринимают красители. Обычно их окрашивают по Романовскому—Гимзе или серебрением. В живом виде спирохеты исследуют с помощью фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.

Спирохеты представлены тремя родами, патогенными для человека: *Treponema*, *Borrelia*, *Leptospira*.

Трепонемы (род *Treponema*) имеют вид тонких штопорообразно закрученных нитей с 8—12 равномерными мелкими завитками. Вокруг протопласта трепонем расположены 3—4 фибриллы (жгутики). В цитоплазме имеются цитоплазматические филаменты. Патогенными представителями являются *T. pallidum* — возбудитель сифилиса, *T. pertenue* — возбудитель тропической болезни *фрамбезии*. Имеются и сапрофиты — обитатели полости рта человека ила водоемов.

Боррелии (род *Borrelia*), в отличие от трепонем, более длинные, имеют по 3—8 крупных завитков и 7—20 фибрилл. К ним относятся возбудитель возвратного тифа (*B. recurrentis*) и возбудители болезни Лайма (*B. burgdorferi*) и других заболеваний.

Лептоспиры (род *Leptospira*) имеют завитки неглубокие и частые, в виде закрученной веревки. Концы этих спирохет изогнуты наподобие крючков с утолщениями на концах. Образуя вторичные завитки, они приобретают вид букв S или C; имеют две осевые фибриллы. Патогенный представитель *L. interrogans* вызывает лептоспироз при попадании в организм с водой или пищей, приводя к кровоизлияниям и желтухе.

Риккетсии (род *Rickettsia*) — мелкие граммотрицательные палочковидные бактерии (0,3—2,0 мкм), облигатные (обязательные) внутриклеточные паразиты. Размножаются бинарным делением в цитоплазме, а некоторые в ядре инфицированных клеток. Обитают в членистоногих (вши, блохи, клещи), которые являются их хозяевами или переносчиками. Форма и размер риккетсий могут меняться (клетки неправильной формы, нитевидные) в зависимости от условий роста. Структура риккетсии не отличается от таковой граммотрицательных бактерий.

Риккетсии обладают независимым от клетки хозяина метаболизмом, однако, возможно, они получают от клетки хозяина макроэргические соединения для своего размножения. В мазках и тканях их окрашивают

по Романовскому—Гимзе, по Маккиавелло—Здродовскому (риккетсии красного цвета, а инфицированные клетки — синего).

У человека риккетсии вызывают эпидемический сыпной тиф (*R. prowazekii*), клещевой риккетсиоз (*R. sibirica*), пятнистую лихорадку Скалистых гор (*R. rickettsii*) и другие риккетсиозы.

Хламидии — мелкие грамотрицательные бактерии шаровидной или овоидной формы. Не образуют спор, не имеют жгутиков и капсулы. Хламидии относятся к облигатным внутриклеточным паразитам. Они имеют кокковидную форму, грамотрицательны (иногда грамвариабельны).

Строение их клеточной стенки напоминает таковую грамотрицательных бактерий, хотя имеются отличия. Она не содержит типичного пептидогликана: в его составе полностью отсутствует N-ацетилмурамовая кислота. В состав клеточной стенки входит двойная наружная мембрана, которая включает ЛПС и белки. Несмотря на отсутствие пептидогликана, клеточная стенка хламидий обладает ригидностью. Цитоплазма клетки ограничена внутренней цитоплазматической мембраной.

Основным методом выявления хламидий является окраска по Романовскому—Гимзе. Цвет окраски зависит от стадии жизненного цикла: элементарные тельца окрашиваются в пурпурный цвет на фоне голубой цитоплазмы клетки, ретикулярные тельца — в голубой цвет.

Хламидии размножаются только в живых клетках: их рассматривают как энергетических паразитов; они не синтезируют АТФ и гуанозинтрифосфат. Вне клеток хламидии имеют мелкую сферическую форму (0,3 мкм), метаболически неактивны и называются «элементарные тельца». Элементарные тельца попадают в эпителиальную клетку путем эндоцитоза с формированием внутриклеточной вакуоли. Внутри клеток они увеличиваются в размере и превращаются в делящиеся *ретикулярные тельца*, образуя скопления в вакуолях (включения). Из ретикулярных телец формируются элементарные тельца, которые выходят из клеток путем экзоцитоза или лизиса клетки. Вышедшие из клетки элементарные тельца вступают в новый цикл, инфицируя другие клетки.

У человека хламидии вызывают поражения глаз (трахома, конъюнктивит), урогенитального тракта, легких и др.

Актиномицеты — ветвящиеся, нитевидные или палочковидные грамположительные бактерии. Свое название (от греч. *actis* — луч, *mykes* — гриб) они получили в связи с образованием в пораженных тканях друз — гранул из плотно переплетенных нитей в виде лучей, отходящих от центра и заканчивающихся колбовидными утолщениями. Актино-

мицеты, как и грибы, образуют мицелий — нитевидные переплетающиеся клетки (гифы). Они формируют субстратный мицелий, образующийся в результате врастания клеток в питательную среду, и воздушный, растущий на поверхности среды. Актиномицеты могут делиться путем фрагментации мицелия на клетки, похожие на палочковидные и кокковидные бактерии. На воздушных гифах актиномицетов образуются споры, служащие для размножения. Споры актиномицетов обычно не термостойки.

Общую филогенетическую ветвь с актиномицетами образуют так называемые нокардиоподобные (нокардиоформные) актиномицеты — собирательная группа палочковидных бактерий неправильной формы. Их отдельные представители образуют ветвящиеся формы. К ним относят бактерии родов *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и др. Нокардиоподобные актиномицеты отличаются наличием в клеточной стенке сахаров арабинозы, галактозы, а также миколовых кислот и большого количества жирных кислот. Миколовые кислоты и липиды клеточных стенок обуславливают кислотоустойчивость бактерий, в частности микобактерий туберкулеза и лепры (при окраске по Цилю–Нельсену они имеют красный цвет, а неокислотоустойчивые бактерии и элементы ткани, мокроты — синий цвет).

Патогенные актиномицеты вызывают актиномикоз, нокардии — нокардиоз, микобактерии — туберкулез и лепру, коринебактерии — дифтерию. Сапрофитные формы актиномицетов и нокардиоподобных актиномицетов широко распространены в почве, многие из них являются продуцентами антибиотиков.

Микоплазмы — мелкие бактерии (0,15–1,0 мкм), окруженные только цитоплазматической мембраной, содержащей стеролы. Они относятся к классу *Mollicutes*. Из-за отсутствия клеточной стенки микоплазмы осмотически чувствительны. Имеют разнообразную форму: кокковидную, нитевидную, колбовидную. Эти формы видны при фазово-контрастной микроскопии чистых культур микоплазм. На плотной питательной среде микоплазмы образуют колонии, напоминающие яичницу-глазунью: центральная непрозрачная часть, погруженная в среду, и просвечивающая периферия в виде круга.

Микоплазмы вызывают у человека атипичную пневмонию (*Mycoplasma pneumoniae*) и поражения мочеполового тракта (*M. hominis* и др.). Микоплазмы вызывают заболевания не только у животных, но и у растений. Достаточно широко распространены и непатогенные представители.

2.3. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ГРИБОВ

Грибы относятся к домену *Eukarya*, царству *Fungi* (*Mycota*, *Mycetes*). Недавно грибы и простейшие были разделены на самостоятельные царства: царство *Eumycota* (настоящие грибы), царство *Chromista* и царство *Protozoa*. Некоторые микроорганизмы, ранее считавшиеся грибами или простейшими, были перемещены в новое царство *Chromista* (хромовики).

Грибы — многоклеточные или одноклеточные нефотосинтезирующие (бесхлорофильные) эукариотические микроорганизмы с толстой клеточной стенкой. Они имеют ядро с ядерной оболочкой, цитоплазму с органеллами, цитоплазматическую мембрану и многослойную ригидную клеточную стенку, состоящую из нескольких типов полисахаридов (маннаны, глюканы, целлюлоза, хитин), а также из белка, липидов и др. Некоторые грибы образуют капсулу. Цитоплазматическая мембрана содержит гликопротеины, фосфолипиды и эргостеролы (в отличие от холестерина — главного стерола тканей млекопитающих). Большинство грибов — облигатные или факультативные аэробы.

Грибы широко распространены в природе, особенно в почве. Некоторые грибы содействуют производству хлеба, сыра, молочнокислых продуктов и алкоголя. Другие грибы продуцируют антимикробные антибиотики (например, пенициллин) и иммунодепрессивные лекарства (например, циклоспорин). Для моделирования различных процессов молекулярные биологи и генетики используют грибы. Фитопатогенные грибы наносят значительный ущерб сельскому хозяйству, вызывая грибковые болезни злаковых растений и зерна. Инфекции, вызываемые грибами, называются «микозы». Различают гифальные и дрожжевые грибы.

Гифальные (плесневые) грибы, или *гифомицеты*, состоят из тонких нитей толщиной 2–50 мкм, называемых гифами, которые сплетаются в грибницу или мицелий (плесень). Тело гриба называется «таллом». Различают дематиевые (пигментированные — коричневые или черные) и гиалиновые (непигментированные) гифомицеты. Гифы, врастающие в питательный субстрат, отвечают за питание гриба и называются вегетативными гифами. Гифы, растущие над поверхностью субстрата, называются воздушными или репродуктивными гифами (отвечают за размножение). Колонии из-за воздушного мицелия имеют пушистый вид.

Различают низшие и высшие грибы: гифы высших грибов разделены перегородками, или септами, с отверстиями. Гифы низших грибов не

имеют перегородок, представляя собой многоядерные клетки, называемые «ценоцитными» (от греч. *κοινος* — единый, общий).

Дрожжевые грибы (дрожжи) в основном представлены отдельными овальными клетками диаметром 3–15 мкм, а их колонии, в отличие от гифальных грибов, имеют компактный вид. По типу полового размножения они распределены среди высших грибов — аскомицет и базидиомицет. При бесполом размножении дрожжи образуют почки или делятся. Могут образовывать псевдогифы и ложный мицелий (псевдомицелий) в виде цепочек удлинённых клеток — «сарделек». Грибы, аналогичные дрожжам, но не имеющие полового способа размножения, называют «дрожжеподобные». Они размножаются только бесполом способом — почкованием или делением. Понятия «дрожжеподобные грибы» часто идентифицируют с понятием «дрожжи».

Многие грибы обладают диморфизмом — способностью к гифальному (мицелиальному) или дрожжеподобному росту в зависимости от условий культивирования. В инфицированном организме они растут в виде дрожжеподобных клеток (дрожжевая фаза), а на питательных средах образуют гифы и мицелий. Диморфизм связан с температурным фактором: при комнатной температуре образуется мицелий, а при 37 °С (при температуре тела человека) — дрожжеподобные клетки.

Грибы размножаются половым или бесполом способом. Половое размножение грибов происходит с образованием гамет, половых спор и других половых форм. Половые формы называются телеоморфами.

Бесполое размножение грибов происходит с образованием соответствующих форм, называемых анаморфами. Такое размножение происходит почкованием, фрагментацией гиф и бесполоыми спорами. Эндогенные споры (спорангиоспоры) созревают внутри округлой структуры — спорангия. Экзогенные споры (конидии) формируются на кончиках плодоносящих гиф, так называемых конидиеносцах.

Различают разнообразие конидии. Артроконидии (артроспоры), или таллоконидии, образуются при равномерном септировании и расчленении гиф, а бластоконидии образуются в результате почкования. Небольшие одноклеточные конидии называются микроконидиями, большие многоклеточные конидии — макроконидиями. К бесполом формам грибов относят также хламидоконидии, или хламидоспоры (толстостенные крупные покоящиеся клетки или комплекс мелких клеток).

Царство грибов *Eumycota* включает 4 типа (*Phylum*) настоящих грибов, имеющих медицинское значение: *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Deiteromycota*. Не имеют медицинского значения хитридиомицеты (тип *Chytridiomycota*) — водные сапрофитные грибы, поражающие водоросли. Ранее относимые к грибам оомицеты (организмы, родственные водорослям, паразиты высших растений) теперь относят к царству *Chromista* (*Stramenopila*), типу *Oomycota*.

Различают совершенные и несовершенные грибы. *Совершенные грибы* имеют половой способ размножения; к ним относят зигомицеты (*Zygomycota*), аскомицеты (*Ascomycota*) и базидиомицеты (*Basidiomycota*). *Несовершенные грибы* имеют только бесполой способ размножения; к ним относят формальный условный тип/группу грибов — дейтеромицеты (*Deiteromycota*).

Зигомицеты относятся к низшим грибам (мицелий несептированный). Они включают представителей родов *Mucor*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Basidiobolus*, *Conidiobolus*. Зигомицеты распространены в почве и воздухе. Могут вызывать зигомикоз (мукоромикоз) легких, головного мозга и других органов человека.

При бесполом размножении зигомицет на плодоносящей гифе (спорангиеносце) образуется спорангий — шаровидное утолщение с оболочкой, содержащее многочисленные спорангиоспоры (рис. 2.6). Половое размножение у зигомицетов происходит с помощью зигоспор.

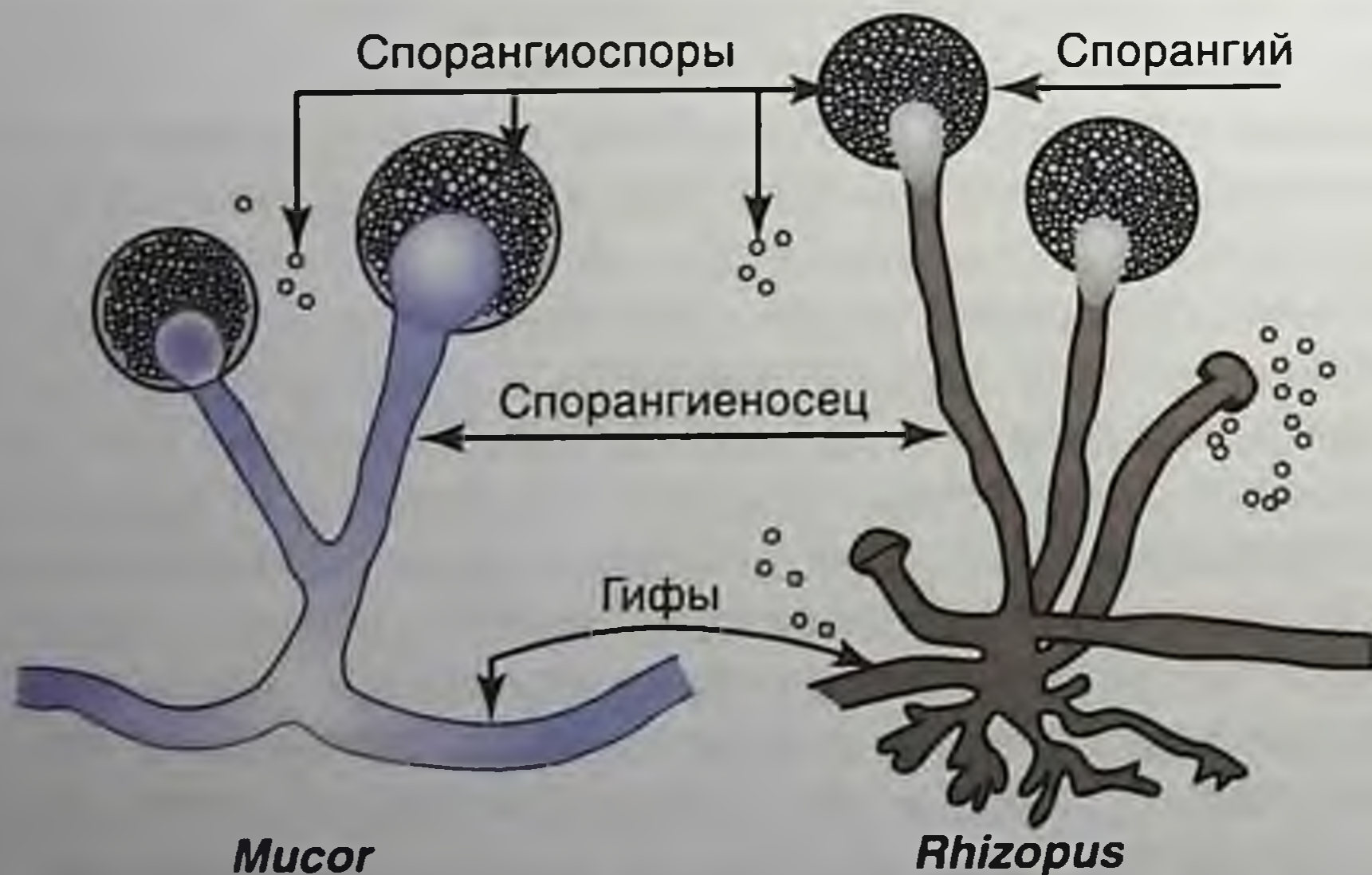


Рис. 2.6. Грибы рода *Mucor* и рода *Rhizopus*

Аскомицеты (сумчатые грибы) имеют септированный мицелий (кроме одноклеточных дрожжей). Свое название они получили от основного органа плодоношения — сумки, или аска, содержащего 4 или 8 гаплоидных половых спор (аскоспор).

К аскомицетам относятся отдельные представители (телеоморфы) родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Большинство грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium* являются анаморфами, то есть размножаются только бесполом путем с помощью бесполой спор — конидий (рис. 2.7) и должны быть отнесены по этому признаку к несовершенным грибам. У грибов рода *Aspergillus* на концах плодоносящих гиф, конидиеносцах, имеются утолщения — стеригмы, фиалиды, на которых образуются цепочки конидий («лещинная плесень»).

У грибов рода *Penicillium* (кистевик) плодоносящая гифа напоминает кисточку, так как из нее (на конидиеносце) образуются утолщения, разветвляющиеся на более мелкие структуры — стеригмы, фиалиды, на которых находятся цепочки конидий. Некоторые виды аспергилл могут вызывать аспергиллезы и афлатоксикозы, пенициллы могут вызывать пенициллиозы.

Представителями аскомицетов являются телеоморфы родов *Trichophyton*, *Microsporum*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, а также дрожжи (род *Saccharomyces*, телеоморфы многих видов рода *Candida*). Дрожжи — одноклеточные грибы, утратившие способность к образованию истинного мицелия; имеют овальную форму клеток диаметром 3–15 мкм. Они

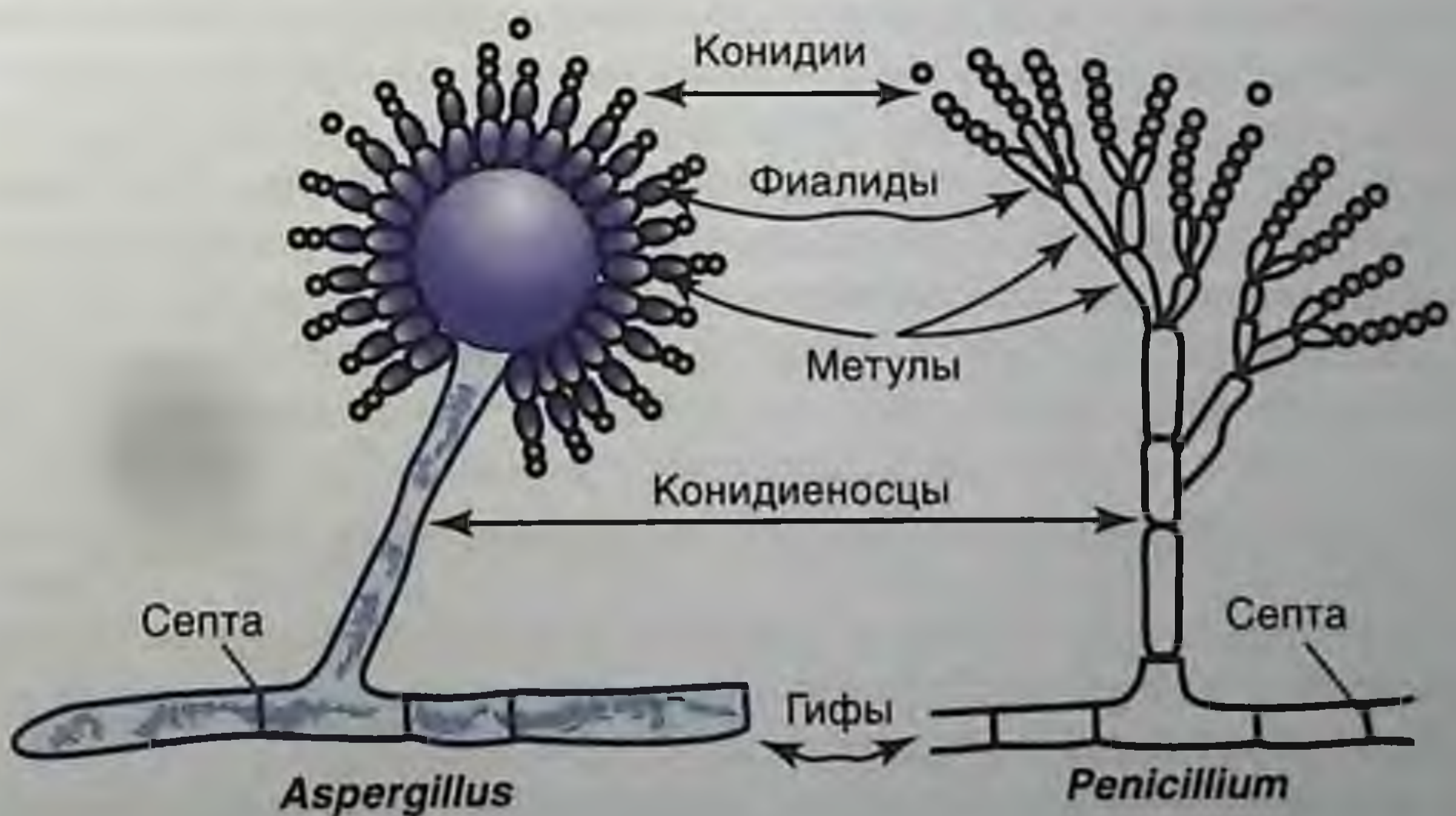


Рис. 2.7. Грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*

размножаются почкованием, бинарным делением на две равные клетки или половым путем с образованием аскоспор. Заболевания, вызываемые некоторыми видами дрожжей, получили название дрожжевых микозов. К аскомицетам относятся возбудитель пневмоцистной пневмонии *Pneumocystis (carinii) jiroveci* и возбудитель эрготизма (спорынья *Claviceps purpurea*), паразитирующий на злаках.

Базидиомицеты включают шляпочные грибы. Они имеют септированный мицелий и образуют половые споры — базидиоспоры путем отшнуровывания от базидия — концевой клетки мицелия, гомологичной аску. К базидиомицетам относятся некоторые дрожжи, например телеоморфы *Cryptococcus neoformans*.

Дейтеромицеты являются несовершенными грибами (*Fungi imperfecti*, анаморфные грибы, конидиальные грибы). Это условный, формальный таксон грибов, объединяющий грибы, не имеющие полового размножения. Недавно вместо термина «дейтеромицеты» предложен термин «митоспоровые грибы» — грибы, размножаемые неполовыми спорами, то есть путем митоза. При установлении факта полового размножения несовершенных грибов их переносят в один из известных типов — *Ascomycota* или *Basidiomycota*, присваивая название телеоморфной формы. Дейтеромицеты имеют септированный мицелий, размножаются только путем бесполого формирования конидий. К дейтеромицетам относятся несовершенные дрожжи (дрожжеподобные грибы), например некоторые грибы рода *Candida*, поражающие кожу, слизистые оболочки и внутренние органы (кандидоз). Они имеют овальную форму, диаметр 2–5 мкм, делятся почкованием, образуют псевдогифы (псевдомицелий) в виде цепочек из удлиненных клеток, иногда образуют гифы. Для *Candida albicans* характерно образование хламидоспор (рис. 2.8). К дейтеромицетам относят также другие грибы, не имеющие полового способа размножения, относящиеся к родам *Epidermophyton*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides*, *Sporothrix*, *Aspergillus*, *Phialophora*, *Fonsecaea*, *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Bipolaris*, *Exerohilum*, *Wangiella*, *Alrernaria* и др.

2.4. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ПРОСТЕЙШИХ

Простейшие относятся к домену *Eukarya*, царству животных (*Animalia*), подцарству *Protozoa*. Недавно предложено выделить простейшие в ранг царства *Protozoa*.

Клетка простейших окружена мембраной (пелликулой) — аналогом цитоплазматической мембраны клеток животных. Она имеет ядро с

Рис. 2.8. *Candida albicans*

ядерной оболочкой и ядрышком, цитоплазму, содержащую эндоплазматический ретикулум, митохондрии, лизосомы и рибосомы. Размеры простейших колеблются от 2 до 100 мкм. При окраске по Романовскому–Гимзе ядро простейших имеет красный, а цитоплазма — голубой цвет. Простейшие передвигаются с помощью жгутиков, ресничек или псевдоподий, некоторые из них имеют пищеварительные и сократительные (выделительные) вакуоли. Они могут питаться путем фагоцитоза или образования особых структур. По типу питания они разделяются на гетеротрофы и аутотрофы. Многие простейшие (дизентерийная амеба, лямблии, трихомонады, лейшмании, балантидии) могут расти на питательных средах, содержащих нативные белки и аминокислоты. Для их культивирования используют также культуры клеток, куриные эмбрионы и лабораторных животных (рис. 2.9).

Простейшие размножаются бесполым путем — двойным или множественным (шизогония) делением, а некоторые и половым путем (спорогония). Одни простейшие размножаются внеклеточно (лямблии), а другие — внутриклеточно (плазмодии, токсоплазма, лейшмании). Жизненный цикл простейших характеризуется стадийностью — образованием стадии трофозои́та и стадии цисты. Цисты — покоящиеся стадии, устойчивые к изменению температуры и влажности. Кислотоустойчивостью отличаются цисты *Sarcocystis*, *Cryptosporidium* и *Isospora*.

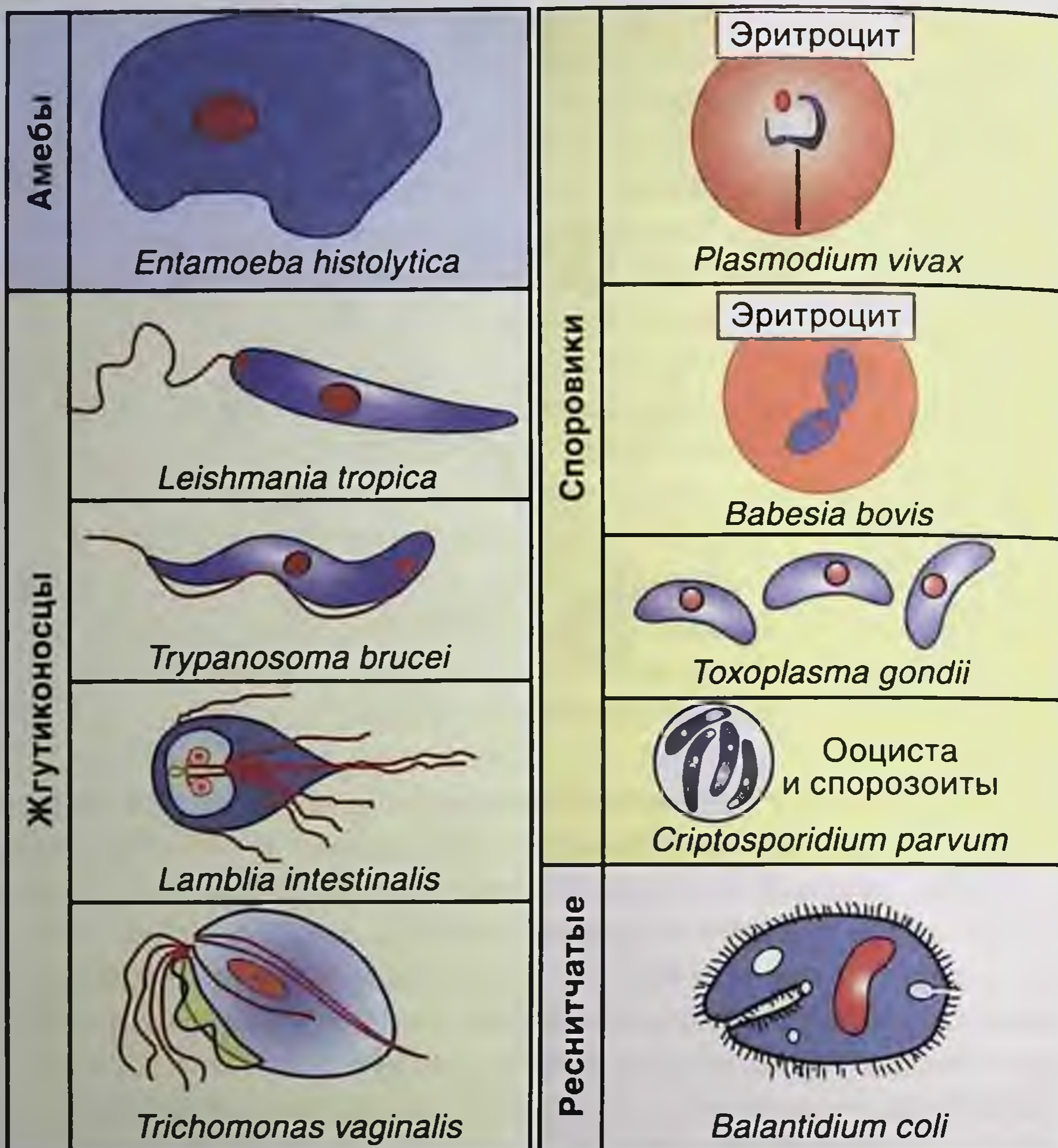


Рис. 2.9. Морфология основных представителей простейших

Ранее простейшие, вызывающие заболевания у человека, были представлены 4 типами¹ (*Sarcomastigophora*, *Apicomplexa*, *Ciliophora*, *Microspora*). Эти типы недавно реклассифицированы на большее количество, появились новые царства — *Protozoa* и *Chromista* (табл. 2.2). В новое царство *Chromista* (хромовики) вошли некоторые простейшие и грибы (бластоцисты, оомицеты и *Rhinosporidium seeberi*). Царство

¹ Тип *Sarcomastigophora* состоял из подтипов *Sarcodina* и *Mastigophora*. Подтип *Sarcodina* (саркодовые) включал дизентерийную амебу, а подтип *Mastigophora* (жгутиконосцы) — трипаносомы, лейшмании, лямблию и трихомонады. Тип *Apicomplexa* включал класс *Sporozoa* (споровики), куда входили плазмодии малярии, токсоплазма, криптоспоридии и др. Тип *Ciliophora* включает балантидии, а тип *Microspora* — микроспоридии.

Таблица 2.2. Представители царств *Protozoa* и *Chromista*, имеющие медицинское значение

Таксоны	Представители	Болезни
Царство <i>Protozoa</i>		
Подцарство 1. <i>Archezoa</i>		
Тип <i>Metamonada</i> (кишечные жгутиконосцы)	<i>Lambliа intestinalis</i> (<i>Giardia lamblia</i>)	Диарея, мальабсорбция
Тип <i>Parabasalia</i> Класс <i>Trichomonadea</i> (кишечные и родственные жгутиконосцы)	<i>Dientamoeba fragilis</i>	Диентамебиаз
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Вагинит, уретрит
Подцарство 2. <i>Neozoa</i>		
Инфрацарство 1. <i>Discicristata</i>		
Тип <i>Euglenozoa</i> Класс <i>Kinetoplastea</i> (жгутиконосцы, имеющие кинетопласт)	<i>Leishmania spp.</i>	Лейшманиозы
	<i>Trypanosoma spp.</i>	Трипаносомозы
Тип <i>Percolozoa</i> Класс <i>Heterolobosea</i> (жгутиконосные амебы)	<i>Naegleria fowleri</i>	Амебный менингоэнцефалит
Инфрацарство 2. <i>Sarcomastigota</i>		
Тип <i>Amoebozoa</i> Класс <i>Amoebaea</i> Класс <i>Entamoebidea</i>	<i>Acanthamoeba spp.</i> <i>Balamuthia mandrillaris</i>	Гранулематозный энцефалит
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Амебиаз
Инфрацарство 3. <i>Alveolate</i>		
Тип <i>Sporozoa</i> (споровики) Класс <i>Coccidea</i> Порядок <i>Eimeriida</i> Порядок <i>Piroplasmida</i> Порядок <i>Haemosporida</i>	<i>Toxoplasma gondii</i> <i>Cryptosporidium spp.</i>	Токсоплазмоз Криптоспориоз
	<i>Babesia spp.</i>	Бабезиоз
	<i>Plasmodium spp.</i>	Малярия
	Тип <i>Ciliophora</i> (реснитчатые)	<i>Balantidium coli</i>
Царство <i>Chromista</i>		
Тип <i>Bigyra</i> Класс <i>Blastocystea</i>	<i>Blastocystis hominis</i>	Бластоцистоз
Микробы неизвестного таксономического положения (в настоящее время отнесены к грибам. См. т. 2)		
Тип <i>Microspora</i> (микроспоридии) Класс <i>Microsporea</i>	<i>Encephalitozoon cuniculli</i> , <i>E. bienewisi</i>	Микроспоририоз

Protozoa включает амёбы, жгутиконосцы, споровики и реснитчатые. Они подразделены на различные типы, среди которых различают амёбы, жгутиконосцы, споровики и реснитчатые.

К амёбам относятся возбудитель амёбиаза человека — амёбной дизентерии (*Entamoeba histolytica*), свободно живущие и непатогенные амёбы (кишечная амёба и др.). Амёбы размножаются бинарно, бесполом путем. Их жизненный цикл состоит из стадии трофозои́та (растущая, подвижная клетка, малоустойчивая) и стадии цисты. Трофозоиты передвигаются с помощью псевдоподий, которые захватывают и погружают в цитоплазму питательные вещества. Из трофозои́та образуется циста, устойчивая к внешним факторам. Попав в кишечник, она превращается в трофозоит.

Жгутиконосцы характеризуются наличием жгутиков: у лейшманий один жгутик, у трихомонад четыре свободных жгутика и один жгутик, соединенный с короткой ундулирующей мембраной. Ими являются:

- жгутиконосцы крови и тканей (лейшмании — возбудители лейшманиозов; трипаносомы — возбудители сонной болезни и болезни Шагаса);
- жгутиконосцы кишечника (лямблия — возбудитель лямблиоза);
- жгутиконосцы мочеполового тракта (трихомонада влагалищная — возбудитель трихомоноза).

Споровики включают различные паразиты:

- кровяные паразиты (плазмодии малярии и бабезии — возбудители пироплазмоза);
- кишечные и тканевые паразиты (токсоплазма — возбудитель токсоплазмоза, криптоспоридии — возбудители криптоспоридиоза и др.).

Паразиты имеют апикальный комплекс, позволяющий паразитам проникнуть в клетку хозяина. Каждый из них имеет сложное строение и свои особенности жизненного цикла. Так, например, жизненный цикл возбудителя малярии характеризуется чередованием полового (в организме комаров *Anopheles*) и бесполого (в клетках печени и эритроцитах человека, где они размножаются путем множественного деления) размножения.

Реснитчатые представлены балантидиями, которые поражают толстую кишку человека (балантидиазная дизентерия). Балантидии имеют стадию трофозои́та и цисты. Трофозоит подвижен, имеет многочисленные реснички, более тонкие и короткие, чем жгутики.

Микроорганизмы с неутонченным родством представлены микроспоридиями — многочисленными видами маленьких облигатных внут-

риклеточных паразитов, вызывающих у ослабленных людей диарею и поражение различных органов. Эти паразиты имеют особые споры с инфекционным материалом — спороплазмой.

2.5. СТРОЕНИЕ И КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Вирусы — мельчайшие микробы, относящиеся к царству *Virae* (от лат. *virus* — яд). Они не имеют клеточного строения и состоят из ДНК- или РНК-генома, окруженного белками. Будучи автономными генетическими структурами и облигатными внутриклеточными паразитами, вирусы размножаются в цитоплазме или ядре клетки и не имеют собственной метаболической системы. Для них характерен особый разобщенный (дизъюнктивный) способ размножения (репродукции): в разных частях вирусинфицированной клетки синтезируются вирусные компоненты, а затем происходят их сборка и формирование вирусных частиц. Зрелая вирусная частица называется «вирион».

Структуру вирусов из-за их малых размеров изучают с помощью электронной микроскопии, как вирионов, так и их ультратонких срезов. Размеры вирусов (вирионов) определяют напрямую с помощью электронной микроскопии или косвенно методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор, методом ультрацентрифугирования. Размер вирусов колеблется от 15 до 400 нм (1 нм равен 1/1000 мкм): к маленьким вирусам, размер которых сходен с размером рибосом, относят парвовирусы и вирус полиомиелита, а к наиболее крупным — вирус натуральной оспы (350 нм). Вирусы отличаются по форме вирионов, которые имеют вид палочек (вирус табачной мозаики), пули (вирус бешенства), сферы (вирусы полиомиелита, ВИЧ), нити (филовirusы), сперматозоида (многие бактериофаги).

Вирусы поражают воображение своим разнообразием структуры и свойств. В отличие от клеточных геномов, которые содержат однородную двунитевую ДНК, вирусные геномы чрезвычайно разнообразны. Различают ДНК- и РНК-содержащие вирусы, которые гаплоидны, то есть имеют один набор генов. Диплоидный геном имеют только ретровирусы. Геном вирусов содержит от 6 до 200 генов и представлен различными видами нуклеиновых кислот: двунитевыми, однонитевыми, линейными, кольцевыми, фрагментированными.

Среди однонитевых РНК-содержащих вирусов различают геномные плюс-нить РНК и минус-нить РНК (полярность РНК). Плюс-нить (позитивная нить) РНК этих вирусов, кроме геномной (наследственной)

функции, выполняет функцию информационной, или матричной, РНК (иРНК, или мРНК); она является матрицей для белкового синтеза на рибосомах инфицированной клетки. Плюс-нить РНК является инфекционной: при введении в чувствительные клетки она способна вызвать инфекционный процесс. Минус-нить (негативная нить) РНК-содержащих вирусов выполняет только наследственную функцию; для синтеза белка на минус-нити РНК синтезируется комплементарная ей нить. У некоторых вирусов РНК-геном является амбиполярным (*ambisense* от греч. *амби* — с обеих сторон, двойная комплементарность), то есть содержит плюс- и минус-сегменты РНК.

Геном вирусов может включаться в геном клетки в виде провируса, проявляя себя генетическим паразитом клетки. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов, например вирусов герпеса, могут находиться в цитоплазме инфицированных клеток, напоминая плазмиды. Для вирусов характерно наличие структурных и неструктурных белков. Неструктурные белки участвуют в репродукции вирусов, а структурные белки обуславливают строение вирусов. Вирусы имеют как вирусспецифические белки, так и клеточные белки, захваченные вирусом при репродукции в клетке хозяина. Липиды и полисахариды имеют в своем составе главным образом сложные вирусы.

Различают простые вирусы (например, вирус гепатита А) и сложные вирусы (например, вирусы гриппа, герпеса, коронавирусы).

Простые, или безоболочечные, вирусы имеют только нуклеиновую кислоту, связанную с белковой структурой, называемой «капсид» (от лат. *capsa* — футляр). Протеины, связанные с нуклеиновой кислотой, известны как нуклеопротеины, а ассоциация вирусных протеинов капсида вируса с вирусной нуклеиновой кислотой названа «нуклеокапсид». Некоторые простые вирусы могут формировать кристаллы (например, вирус ящура).

Капсид включает повторяющиеся морфологические субъединицы — капсомеры, скомпонованные из нескольких полипептидов. Нуклеиновая кислота вириона, связываясь с капсидом, образует нуклеокапсид. Капсид защищает нуклеиновую кислоту от деградации. У простых вирусов капсид участвует в прикреплении (адсорбции) к клетке хозяина. Простые вирусы выходят из клетки в результате ее разрушения (лизиса).

Сложные, или оболочечные, вирусы (рис. 2.10), кроме капсида, имеют мембранную двойную липопротеиновую оболочку (син.: суперкапсид, или пеплос), которая приобретается путем почкования вириона через мембрану клетки, например через плазматическую мембрану, мембрану

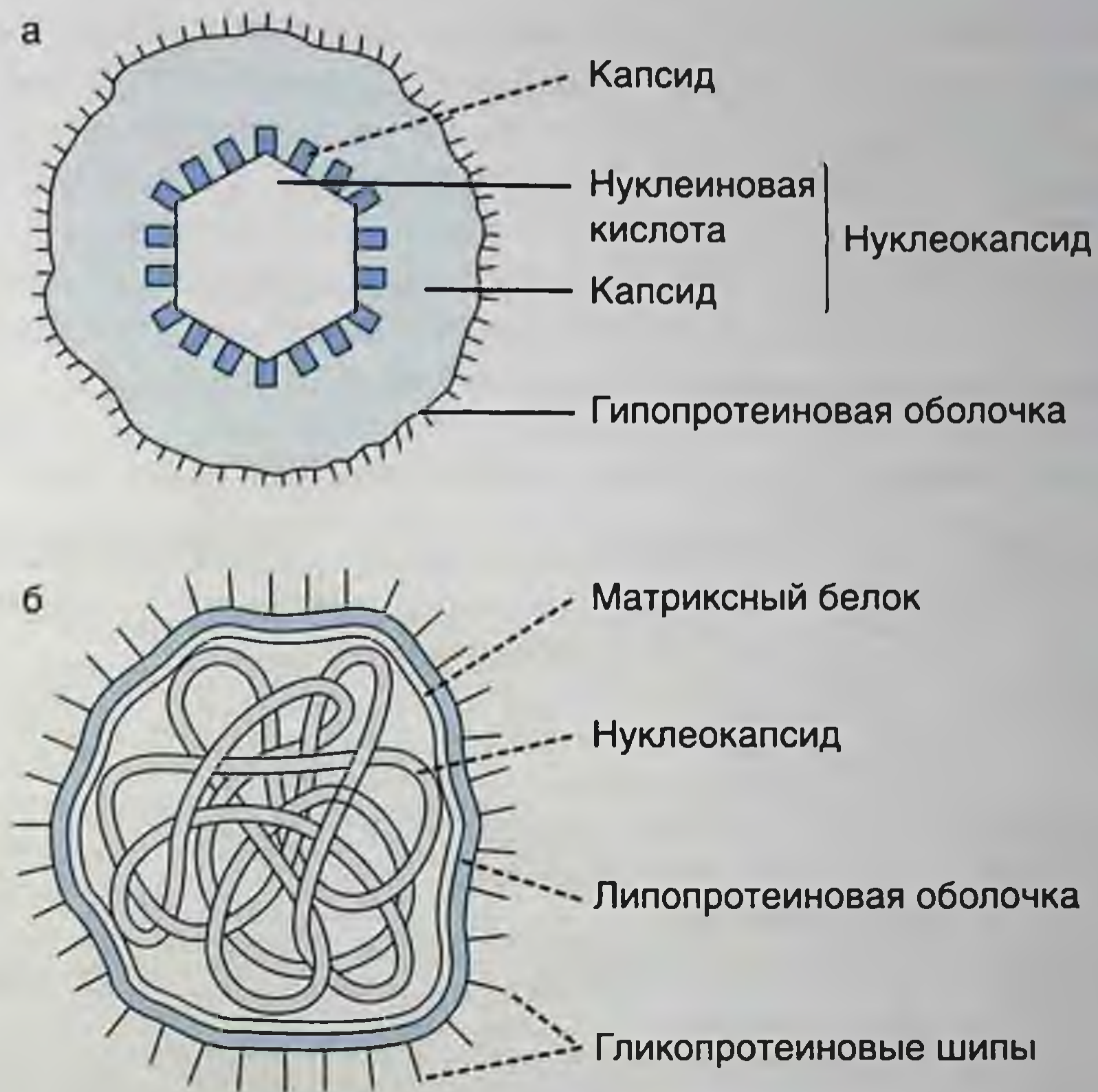


Рис. 2.10. Строение оболочечных вирусов с икосаэдрическим (а) и спиральным (б) капсидом

ядра или мембрану эндоплазматического ретикулума. На оболочке вируса расположены гликопротеиновые шипы, или шипики, пепломеры. Разрушение оболочки эфиром и другими растворителями инактивирует сложные вирусы. Под оболочкой некоторых вирусов находится матриксный белок.

Вирионы имеют спиральный, икосаэдрический (кубический) или сложный тип симметрии капсида (нуклеокапсида). *Спиральный* тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида (например, у вирусов гриппа, коронавирусов): капсомеры уложены по спирали вместе с нуклеиновой кислотой. *Икосаэдрический* тип симметрии обусловлен образованием изометрически полого тела из капсида, содержащего вирусную нуклеиновую кислоту (например, у вируса герпеса).

Капсид и оболочка (суперкапсид) защищают вирионы от воздействия окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодей-

ствие (адсорбцию) своими рецепторными белками с определенными клетками, а также антигенные и иммуногенные свойства вирионов.

Внутренние структуры вирусов имеют название «сердцевина». У аденовирусов сердцевина состоит из гистоноподобных белков, связанных с ДНК, у реовирусов — из белков внутреннего капсида.

Лауреат Нобелевской премии Д. Балтимор предложил систему балтиморской классификации, основанной на механизме синтеза мРНК. Эта классификация размещает вирусы в 7 группах (табл. 2.3).

Таблица 2.3. Основные вирусы, имеющие медицинское значение

Семейство/ подсемейство	Представители	Репликация генома	
		ферменты	локализация
Группа I: ДНК (двунитевые)-вирусы			
Поксвирусы (<i>Poxviridae</i>)	Вирусы натуральной оспы, вакцины, оспы обезьян, контактиозного моллюска	Вирусная ДНК-зависимая ДНК-полимераза	Цитоплазма
Герпесвирусы (<i>Herpesviridae</i>)	Вирусы герпеса (типы 1, 2, 5, 6, 7, 8), Эпштейна–Барр, ветряной оспы	То же	Ядро
Аденовирусы (<i>Adenoviridae</i>)	Аденовирусы человека	То же	Ядро
Папилломавирусы (<i>Papillomaviridae</i>)	Папилломавирусы человека	Клеточная ДНК-зависимая ДНК-полимераза	Ядро
Полиомавирусы (<i>Polyomaviridae</i>)	Полиомавирусы человека (IC, BK)	То же	Ядро
Группа II: ДНК (однонитевые)-вирусы			
Парвовирусы (<i>Parvoviridae</i>)	Парвовирус человека B19	То же	Ядро
Род <i>Anellovirus</i>	ТТ-вирус (TTV), SEN-вирус, TLMV	То же	Ядро
Группа III: РНК (двунитевые)-вирусы			
Реовирусы (<i>Reoviridae</i>)	Вирусы Кемерово, колорадской клещевой лихорадки, ротавирусы человека	Вирионная РНК-зависимая РНК-полимераза	Цитоплазма
Группа IV: РНК (плюс-однонитевые)-вирусы			
Пикорнавирусы (<i>Picomaviridae</i>)	Вирусы полиомиелита, Коксаки А и В, ЕСНО, гепатита А, риновирусы человека	Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза	Цитоплазма
Калицивирусы (<i>Caliciviridae</i>)	Норовирусы, вирусы гастроэнтерита группы Норволк	То же	Цитоплазма

Окончание табл. 2.3

Семейство/ подсемейство	Представители	Репликация генома	
		ферменты	локализация
Гепевирусы (<i>Hepeviridae</i>)	Вирус гепатита Е	То же	Цитоплазма
Коронавирусы (<i>Coronaviridae</i>)	Коронавирусы человека, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, торовирусы	То же	Цитоплазма
Флавивирусы (<i>Flaviviridae</i>)	Вирусы желтой лихорадки, клещевого энцефалита, гепа- тита С	То же	Цитоплазма
Тогавирусы (<i>Togaviridae</i>)	Вирусы краснухи, карельской лихорадки, энцефаломиелита	То же	Цитоплазма
Группа V: РНК (минус-однонитевые)-вирусы			
Борнавирусы (<i>Bornaviridae</i>)	Вирус болезни Борна	Вирионная РНК-зависимая РНК-полимераза	Ядро
Филовирусы (<i>Filoviridae</i>)	Вирусы Марбург, Эбола	То же	Цитоплазма
Парамиксовирусы (<i>Paramyxoviridae</i>)	Вирусы: кори, парагриппа, эпидемического паротита, Хендра, Нипа	То же	Цитоплазма
Пневмовирусы (<i>Pneumoviridae</i>)	Респираторно-синцитиаль- ный вирус	То же	Цитоплазма
Ортомиксовирусы (<i>Orthomyxoviridae</i>)	<i>Influenzavirus</i> типы А, В, С	То же	Ядро
Хантавирусы (<i>Hantaviridae</i>)	Вирус Хантаан	То же	Цитоплазма
НаиРОВирусы (<i>Nairoviridae</i>)	Крымско–Конго геморраги- ческой лихорадки	То же	Цитоплазма
Фенуивирусы (<i>Phenuiviridae</i>)	Вирус лихорадки Рифт-Валли	То же	Цитоплазма
Буньявирусы (<i>Bunyviridae</i>)	Вирусы Хантаан, Крым- Конго геморрагической ли- хорадки	То же	Цитоплазма
Дельтавирусы (<i>Deltavirus</i>)	Вирус гепатита D	РНК-полимераза	Ядро
Ареновирусы (<i>Arenaviridae</i>)	Вирусы ЛХМ, Ласса, Гуана- рито, Хунин и Мачупо	Вирионная РНК-зависимая РНК-полимераза	Цитоплазма

Семейство/ подсемейство	Представители	Репликация генома	
		ферменты	локализация
Группа VI: РНК-вирусы (обратнотранскрибирующиеся)			
Ретровирусы (<i>Retroviridae</i>)	Вирус иммунодефицита человека	Вирионная ревертаза	Ядро/цитоплазма
Группа VII: ДНК-вирусы (обратнотранскрибирующиеся)			
Гепаднавирусы (<i>Hepadnaviridae</i>)	Вирус гепатита В Вирионная ревертаза		Ядро/цитоплазма
Субвирусные агенты: прионы			

Международный комитет на таксономии вирусов принял универсальную систему классификации, которая использует такие таксономические категории, как семейство (название оканчивается на *viridae*), подсемейство (название оканчивается на *virinae*), род (название оканчивается на *virus*). Вид вируса не получил биномиального названия, как у бактерий.

Вирусы классифицируют по типу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), ее структуре и количеству нитей. Они имеют двунитевые или однонитевые нуклеиновые кислоты; позитивную (+), негативную (–) полярность нуклеиновой кислоты или смешанную полярность нуклеиновой кислоты, амбиполярную (+, –); линейную или циркулярную нуклеиновую кислоту; фрагментированную или нефрагментированную нуклеиновую кислоту. Учитывают также размер и морфологию вирионов, количество капсомеров и тип симметрии нуклеокапсида, наличие оболочки (суперкапсида), чувствительность к эфиру и дезоксихолату, место размножения в клетке, антигенные свойства и др.

Вирусы поражают животных, бактерии, грибы и растения. Будучи основными возбудителями инфекционных заболеваний человека, вирусы также участвуют в процессах канцерогенеза, могут передаваться различными путями, в том числе через плаценту (вирус краснухи, цитомегаловирус и др.), поражая плод человека. Они могут приводить и к постинфекционным осложнениям — развитию миокардитов, панкреатитов, иммунодефицитов и др.

К неклеточным формам жизни, кроме вирусов, относят прионы и вириды. *Вириды* — небольшие молекулы кольцевой, суперспирализованной РНК, не содержащие белок и вызывающие заболевания растений. Патологические *прионы* — инфекционные белковые частицы, вызывающие особые конформационные болезни в результате измене-

ния структуры нормального клеточного прионового протеина PrP^c , который имеется в организме животных и человека. Нормальный клеточный прионовый протеин PrP^c выполняет регуляторные функции. Его кодирует нормальный прионовый ген (PrP-ген), расположенный в коротком плече хромосомы 20 человека. Прионные болезни протекают по типу трансмиссивных губкообразных энцефалопатий (болезнь Крейтцфельда—Якоба, куру и др.). При этом прионовый протеин приобретает другую, инфекционную форму, обозначаемую как PrP^{sc} (*sc* от *scrapie* — скрепи, прионная инфекция овец и коз). Этот инфекционный прионовый протеин имеет вид фибрилл и отличается от нормального прионного протеина третичной или четвертичной структурой.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Отметьте микробы, являющиеся прокариотами:

1. Грибы.
2. Вирусы.
3. Бактерии.
4. Прионы.

Б. Отметьте отличительные особенности прокариотической клетки:

1. Рибосомы 70S.
2. Наличие пептидогликана в клеточной стенке.
3. Наличие митохондрий.
4. Диплоидный набор генов.

В. Отметьте составные компоненты пептидогликана:

1. Тейхоевые кислоты.
2. N-ацетилглюкозамин.
3. Липополисахарид.
4. Тетрапептид.

Г. Отметьте особенности строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий:

1. Мезодиаминопимелиновая кислота.
2. Тейхоевые кислоты.
3. ЛПС.
4. Белки-порины.

Д. Назовите функции спор у бактерий:

1. Сохранение вида.
2. Жароустойчивость.

3. Расселение субстрата.

4. Размножение.

Е. Назовите облигатные внутриклеточные паразиты:

1. Риккетсии.

2. Актиномицеты.

3. Спирохеты.

4. Хламидии.

Ж. Назовите особенности актиномицет:

1. Имеют термолабильные споры.

2. Грамположительные бактерии.

3. Отсутствует клеточная стенка.

4. Имеют извитую форму.

З. Назовите особенности спирохет:

1. Грамотрицательные бактерии.

2. Имеют двигательный фибриллярный аппарат.

3. Имеют извитую форму.

4. Являются абсолютными паразитами.

И. Назовите простейшие, обладающие апикальным комплексом, позволяющим проникать внутрь клетки:

1. Малярийный плазмодий.

2. Амебы.

3. Токсоплазма.

4. Криптоспоридии.

К. Назовите отличительную особенность сложноорганизованных вирусов:

1. Два типа нуклеиновой кислоты.

2. Наличие липидной оболочки.

3. Двойной капсид.

4. Наличие неструктурных белков.

Л. Отметьте высшие грибы:

1. *Mucor*.

2. *Candida*.

3. *Penicillium*.

4. *Aspergillus*.

Глава 3

ФИЗИОЛОГИЯ МИКРОБОВ

3.1. ФИЗИОЛОГИЯ БАКТЕРИЙ

Физиология бактерий включает метаболизм бактерий, то есть питание, получение энергии, рост и размножения бактерий, а также их взаимодействие с окружающей средой. Метаболизм бактерий лежит в основе изучения и разработки методов их культивирования, получения чистых культур и их идентификации. Выяснение физиологии патогенных и условно-патогенных бактерий важно для изучения патогенеза вызываемых ими инфекционных болезней, постановки микробиологического диагноза, лечения и профилактики инфекционных заболеваний, регуляции взаимоотношения человека с окружающей средой, а также для использования бактерий в биотехнологических процессах в целях получения биологически активных веществ.

3.1.1. Питание бактерий

Химический состав бактериальной клетки

Бактериальная клетка на 80–90% состоит из воды и только 10% приходится на долю сухого вещества. Вода в клетке находится в свободном или связанном состоянии. Она выполняет механическую роль в обеспечении тургора, участвует в гидролитических реакциях. Удаление воды из клетки путем высушивания приводит к приостановке процессов метаболизма, прекращению размножения, а для многих микроорганизмов губительно. В то же время особый способ высушивания микроорганизмов в вакууме из замороженного состояния (лиофилизация) обеспечивает сохранение жизнеспособности большинства микроорганизмов. Лиофилизация используется для приготовления проб, пригодных для длительного хранения.

В сухом веществе бактерий 52% составляют белки, 17% — углеводы, 9% — липиды, 16% — РНК, 3% — ДНК и 3% — минеральные вещества.

Белки являются ферментами, а также составной частью клетки, входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, спор и некоторых капсул. Некоторые бактериальные белки являются антигенами и токсинами бактерий. В состав белков бактерий входят отсутствующие у человека D-аминокислоты, а также диаминопимелиновая кислота.

Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди-, олигосахаров и полисахаридов, а также входят в состав комплексных соединений с белками, липидами и другими соединениями. Полисахариды входят в состав некоторых капсул, клеточной стенки; крахмал и гликоген являются запасными питательными веществами. Некоторые полисахариды принимают участие в формировании антигенов.

Липиды или жиры входят в состав цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки грамотрицательных бактерий, а также служат запасными веществами, входят в состав эндотоксина грамотрицательных бактерий, в составе ЛПС формируют антигены. В бактериальных жирах преобладают длинноцепочечные (C14–C18) насыщенные жирные кислоты и ненасыщенные жирные кислоты, содержащие одну двойную связь. Сложные липиды представлены фосфатидилинозитом, фосфатидилглицерином и фосфатидилэтаноламином. У некоторых бактерий в клетке находятся воски, эфиры миколовой кислоты. Микоплазмы — единственные представители царства *Procatyotae*, имеющие в составе цитоплазматической мембраны стеролы. Остальные бактерии в составе цитоплазматической мембраны и ее производных не имеют стеролов.

В бактериальной клетке присутствуют все типы РНК: иРНК, транспортная РНК (тРНК), рРНК, менее известная антисенс РНК (асРНК). Молекулы асРНК пока не обнаружены в клетках эукариот. Информация об асРНК записана в хромосоме, в так называемых антисенс-генах. АсРНК принимает активное участие в регуляции различных клеточных процессов, в том числе репликации ДНК бактерий, вирусов, плазмид и транспозонов. АсРНК представляет собой короткую молекулу, комплементарную определенному участку иРНК, и, соединяясь с ней, блокирует процесс синтеза белка. При этом в клетке подобные комплексы могут накапливаться, и при диссоциации асРНК и иРНК одновременно начинается синтез белка на большом числе однотипных матриц. Искусственные молекулы асРНК пытаются использовать для борьбы с

бактериями за счет угнетения ими синтеза в клетке определенных жизненно важных белков.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, моносахаров, органических кислот.

ДНК выполняет в бактериальной клетке наследственную функцию. Молекула ДНК построена из двух полинуклеотидных цепочек. Каждый нуклеотид состоит из азотистого основания, сахара дезоксирибозы и фосфатной группы (рис. 3.1, б). Азотистые основания представлены пуринами (аденин, гуанин) и пиримидинами (тимин, цитозин). Каждый нуклеотид обладает полярностью. У него имеется дезоксирибозный 3'-конец и фосфатный 5'-конец. Нуклеотиды соединяются в полинуклеотидную цепочку посредством фосфодиэфирных связей между 5'-концом одного нуклеотида и 3'-концом другого (рис. 3.1, а). Соединение цепей обеспечивается водородными связями между комплементарными азотистыми основаниями: аденина с тимином, гуанина с цитозином. Нуклеотидные цепи антипараллельны: на каждом из концов линейной молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи. Процентное содержание гуанинцитозиновых пар

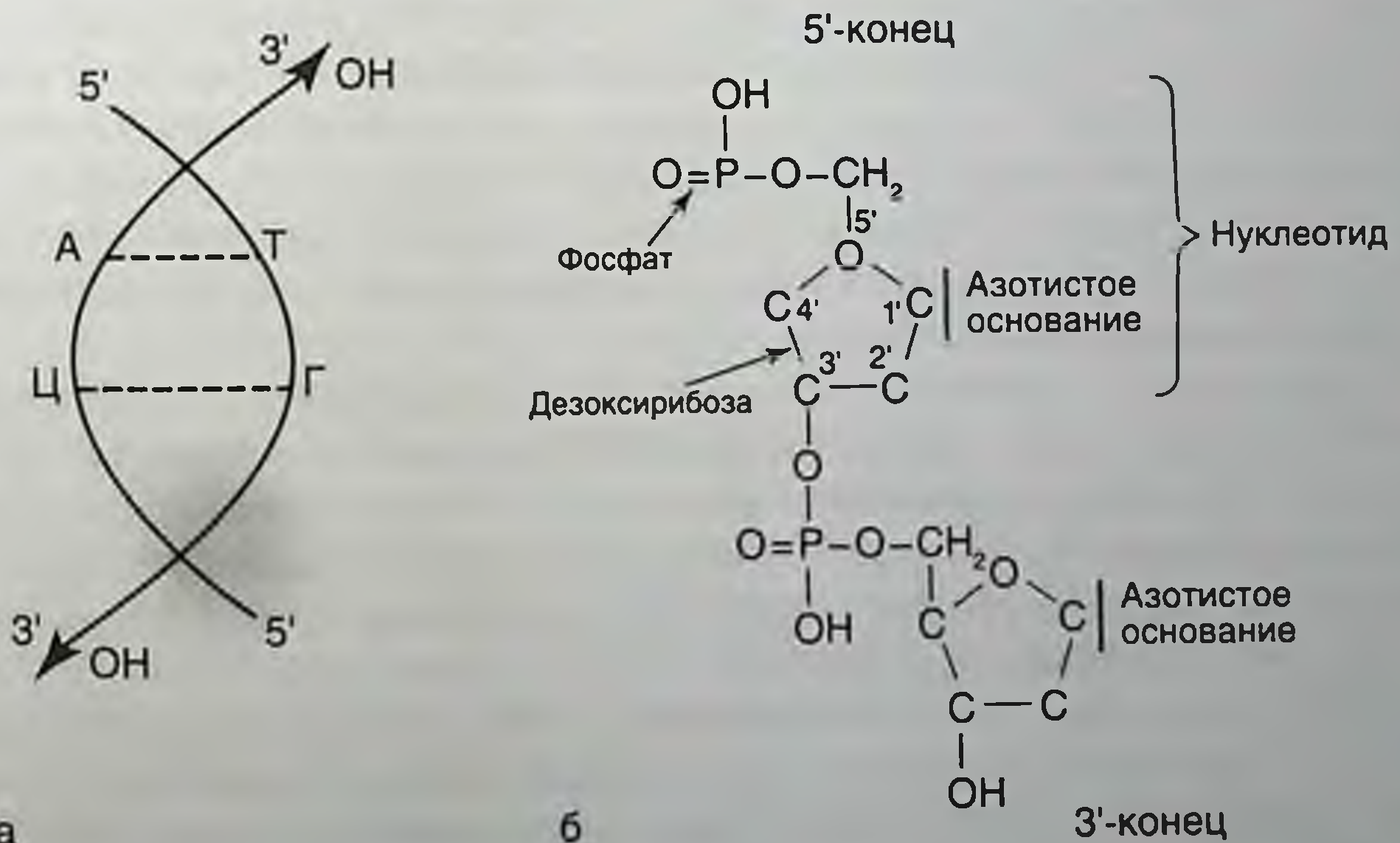


Рис. 3.1. Строение дезоксирибонуклеиновой кислоты и ее элементов (см. пояснение в тексте)

в ДНК определяет степень родства между бактериями и используется при определении таксономического положения бактерий.

Минеральные вещества обнаруживаются в золе, полученной после сжигания клеток. В большом количестве представлены N, S, P, Ca, K, Mg, Fe, Mn, а также микроэлементы Zn, Cu, Co, Ba.

Азот входит в состав белков, нуклеотидов, коферментов. Сера входит в виде сульфгидрильных групп в структуру белков. Фосфор в виде фосфатов представлен в нуклеиновых кислотах, АТФ, коферментах. В качестве активаторов ферментов используются ионы Mg, Fe, Mn. Ионы K и Mg необходимы для активации рибосом. Са является составной частью клеточной стенки грамположительных бактерий. У многих бактерий имеются сидерохромы, которые обеспечивают транспортировку ионов Fe внутрь клетки в виде растворимых комплексных соединений.

Классификация бактерий по типам питания и способам получения энергии

Основная цель метаболизма бактерий — рост, то есть координированное увеличение всех компонентов клетки. Поскольку основными компонентами бактериальной клетки являются органические соединения, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды, остов которых построен из атомов углерода, то для роста требуется постоянный приток атомов углерода. В зависимости от источника усвояемого углерода бактерии подразделяют на *аутотрофы* (от греч. *autos* — сам, *trophe* — питание), которые используют для построения своих клеток неорганический углерод в виде CO_2 , и *гетеротрофы* (от греч. *heteros* — другой), которые используют органический углерод. Легкоусвояемыми источниками органического углерода являются гексозы, многоатомные спирты, аминокислоты, липиды.

Белки, жиры, углеводы и нуклеиновые кислоты являются крупными полимерными молекулами, которые синтезируются из мономеров в реакциях поликонденсации, протекающих с поглощением энергии. Поэтому для восполнения своей биомассы бактериям, помимо источника углерода, требуется источник энергии. Энергия запасается бактериальной клеткой в форме молекул АТФ.

Организмы, для которых источником энергии является свет, называются «фототрофы». Те организмы, которые получают энергию за счет окислительно-восстановительных реакций, называются «хемотрофы».

Среди хемотрофов выделяют *литотрофы* (от греч. *lithos* — камень), способные использовать неорганические доноры электронов (H_2 , NH_3 ,

H₂S, Fe²⁺ и др.), и *органотрофы*, которые используют в качестве доноров электронов органические соединения.

Бактерии, изучаемые медицинской микробиологией, являются *гетерохемоорганотрофами*. Отличительной особенностью этой группы является то, что источник углерода у них служит источником энергии. Учитывая разнообразие микромира и типов метаболизма, далее изложение материала ограничено рассмотрением метаболизма у гетерохемоорганотрофов.

Степень гетеротрофности у различных бактерий неодинакова. Среди бактерий выделяют *сапрофиты* (от греч. *sapros* — гнилой, *phyton* — растение), которые питаются мертвым органическим материалом и независимы от других организмов, и *паразиты* (от греч. *parasites* — нахлебник) — гетеротрофные микроорганизмы, получающие питательные вещества от макроорганизма.

Среди паразитов различают облигатные и факультативные. *Облигатные* паразиты полностью лишены возможности жить вне клеток макроорганизма. К ним относятся представители родов *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Chlamydia* и др., размножающиеся только внутри клеток макроорганизма. *Факультативные* паразиты могут жить и без хозяина и размножаться, так же как и сапрофиты, на питательных средах *in vitro*, то есть вне организма.

Культивирование бактерий в системах *in vitro* осуществляется на питательных средах. Искусственные питательные среды должны отвечать следующим требованиям.

- Каждая питательная среда должна содержать воду, так как все процессы жизнедеятельности бактерий протекают в воде.
- Для культивирования гетероорганотрофных бактерий в среде должен содержаться органический источник углерода и энергии. Эту функцию выполняют различные органические соединения: углеводы, аминокислоты, органические кислоты, липиды. Наибольшим энергетическим потенциалом обладает глюкоза, так как она непосредственно подвергается расщеплению с образованием АТФ и ингредиентов для биосинтетических путей. Часто используется в этих целях пептон — продукт неполного гидролиза белков, состоящий из поли-, олиго- и дипептидов. Пептон также поставляет аминокислоты для построения бактериальных белков.
- Для синтеза белков, нуклеотидов, АТФ, коферментов бактериям требуются источники азота, серы, фосфаты и другие минеральные вещества, в том числе микроэлементы. Источником азота может

служить пептон; кроме того, большинство бактерий способны использовать соли аммония в качестве источника азота. Серу и фосфор бактерии способны утилизировать в виде неорганических солей: сульфатов и фосфатов. Для нормального функционирования ферментов бактериям требуются ионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , которые добавляют в питательную среду в виде солей, чаще всего фосфатов.

- Решающее значение для роста многих микроорганизмов имеет *pH* среды. Поддерживание определенного *pH* имеет значение для предотвращения гибели микроорганизмов от ими же образованных продуктов обмена.
- Среда должна обладать определенным осмотическим давлением. Большинство бактерий способны расти на изотоничных средах, изотоничность которых достигается добавлением натрия хлорида в концентрации 0,87%. Некоторые бактерии не способны расти на средах при концентрации соли в них ниже 1%. Такие бактерии называются «галофильные». Поскольку устойчивость к осмотическому давлению определяется наличием у бактерий клеточной стенки, бактерии, лишенные клеточной стенки, микоплазмы L-формы, могут расти на питательных средах, содержащих гипертонический раствор, обычно сахарозы. При необходимости к питательной среде добавляют факторы роста, ингибиторы роста определенных бактерий, субстраты для действия ферментов, индикаторы.
- Питательные среды должны быть стерильными.

В зависимости от консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими и плотными. Плотность среды достигается добавлением агара.

Агар — полисахарид, получаемый из водорослей. Он плавится при температуре 100 °С, но при охлаждении остывает при температуре 45–50 °С. Агар добавляют в концентрации 0,5% для полужидких сред и 1,5–2% для создания плотных сред. В зависимости от состава и цели применения различают простые, сложные, элективные, минимальные, дифференциально-диагностические и комбинированные среды.

По составу питательные среды могут быть простыми и сложными. К *простым средам* относятся пептонная вода, питательный бульон, мясопептонный агар. На основе простых сред готовят *сложные среды*, например сахарный и сывороточный бульоны, кровяной агар.

В зависимости от назначения среды подразделяются на элективные, обогащения, дифференциально-диагностические. Под *элективными*

понимают среды, на которых лучше растет какой-то определенный микроорганизм. Например, щелочной агар, имеющий pH 9,0, служит для выделения холерного вибриона. Другие бактерии, в частности кишечная палочка, из-за высокого pH на этой среде не растут.

Среды обогащения — это среды, которые стимулируют рост какого-то определенного микроорганизма, ингибируя рост других. Например, среда, содержащая селенит натрия, стимулирует рост бактерий рода *Salmonella*, ингибируя рост кишечной палочки.

Дифференциально-диагностические среды служат для изучения ферментативной активности бактерий. Они состоят из простой питательной среды с добавлением субстрата, на который должен подействовать фермент, и индикатора, меняющего свой цвет в результате ферментативного превращения субстрата. Примером таких сред являются среды Гисса, используемые для изучения способности бактерий ферментировать сахара.

Комбинированные питательные среды сочетают в себе селективную среду, подавляющую рост сопутствующей флоры, и дифференциальную среду, диагностирующую ферментативную активность выделяемого микроба. Примером таких сред служат среда Плоскирева и висмут-сульфитный агар, используемые при выделении патогенных кишечных бактерий. Обе эти среды ингибируют рост кишечной палочки.

3.1.2. Ферменты бактерий

В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов, которые принадлежат к 6 классам: оксиредуктазы, трансферазы, гидролазы, лигазы, лиазы, изомеразы. Ферменты, образуемые бактериальной клеткой, могут как локализоваться внутри клетки — *эндоферменты*, так и выделяться в окружающую среду — *экзоферменты*. Экзоферменты играют большую роль в обеспечении бактериальной клетки доступными для проникновения внутрь источниками углерода и энергии. Большинство гидролаз являются экзоферментами, которые, выделяясь в окружающую среду, расщепляют крупные молекулы пептидов, полисахаридов, липидов до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки. Ряд экзоферментов, например гиалуронидаза, коллагеназа, являются ферментами агрессии. Некоторые ферменты локализованы в периплазматическом пространстве бактериальной клетки. Они участвуют в процессах переноса веществ в бактериальную клетку. Ферментативный спектр является таксономическим

признаком, характерным для семейства, рода и в некоторых случаях для видов. Поэтому определением спектра ферментативной активности пользуются при установлении таксономического положения бактерий. Наличие экзоферментов можно определить с помощью дифференциально-диагностических сред. Для идентификации бактерий разработаны специальные тест-системы, состоящие из набора дифференциально-диагностических сред.

3.1.3. Энергетический метаболизм

Энергия в бактериальной клетке накапливается в форме молекул АТФ. У хемоорганотрофных бактерий реакции, связанные с получением энергии в форме АТФ, — это реакции окисления—восстановления, сопряженные с реакциями фосфорилирования. Окисленный в этих реакциях углерод выделяется клеткой в виде CO_2 . Для удаления отщепившегося в этих реакциях водорода, который находится в форме восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД), разные бактерии используют различные возможности в зависимости от конечного акцептора водорода (или электронов, что является эквивалентным понятием). В зависимости от способа получения энергии у бактерий имеется несколько типов метаболизма: окислительный, или дыхание; бродильный, или ферментативный; смешанный. Тип метаболизма определяет не только реакции, в результате которых образуется АТФ, но и конечные продукты этих реакций, которые используются при идентификации бактерий, а также условия культивирования бактерий.

При использовании в качестве источника углерода и энергии глюкозы или других гексоз начальные этапы окисления глюкозы являются общими как при оксидативном, так и при бродильном метаболизме. К ним относятся пути превращения глюкозы в пируват (при использовании в качестве источника энергии отличных от глюкозы гексоз, или дисахаридов, они в результате химических превращений вступают в цепь реакций, превращающих глюкозу в пируват). Пируват, образовавшийся при расщеплении глюкозы, превращается при участии кофакторов в активированную уксусную кислоту или ацетилкоэнзим А. Последний окисляется в CO_2 с отщеплением водорода в цикле трикарбоновых кислот.

Цикл трикарбоновых кислот не только выполняет функцию конечного окисления питательных веществ, но и обеспечивает процессы биосинтеза многочисленными предшественниками: пируват α -кетоглутаровая, щавелевая и янтарные кислоты — для синтеза

аминокислот, щавелевоуксусная — для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, малонат — для синтеза аминокислот, пиримидиновых нуклеотидов и жиров (рис. 3.2).

Окислительный метаболизм. Бактерии, обладающие окислительным метаболизмом, энергию получают путем *дыхания*. *Дыхание* — процесс получения энергии в реакциях окисления–восстановления, сопряженных с реакциями окислительного фосфорилирования, при котором донорами электронов могут быть органические (у органотрофов) и неорганические (у литотрофов) соединения, а акцептором — только неорганические соединения.

У бактерий, обладающих окислительным метаболизмом, акцептором электронов (или водорода H^+) является молекулярный кислород. В этом случае пируват полностью окисляется в цикле трикарбоновых кислот до CO_2 . Цикл трикарбоновых кислот выполняет функции поставщика как предшественников для биосинтетических процессов, так и атомов водорода, который в форме восстановленного НАД переносится на молекулярный кислород через серию переносчиков, обладающих сложной структурно оформленной мультиферментной системой — *дыхательной цепью*. Дыхательная цепь у бактерий локализована в цитоплазматической мембране и во внутриклеточных мембранных структурах.

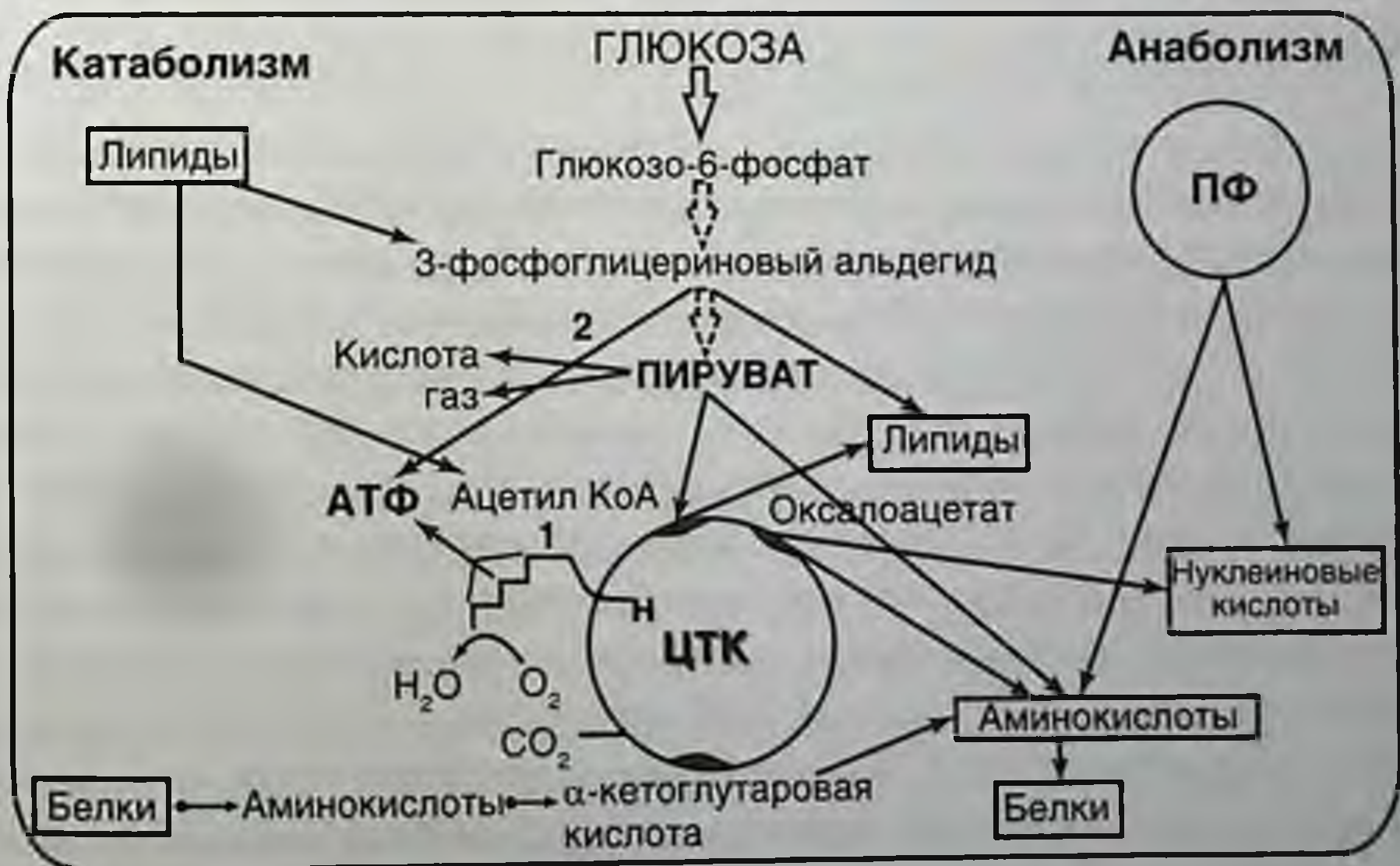
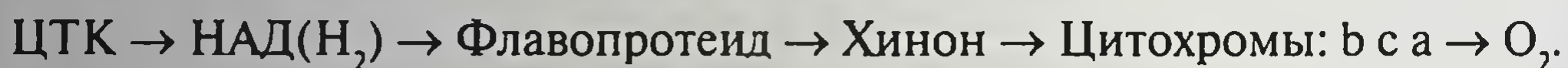


Рис. 3.2. Схема обмена веществ у бактерий

Электрохимическую энергию бактерии получают в процессе переноса электронов по окислительно-восстановительным цепям в мембране, в результате чего происходит неравномерное распределение H^+ по обеим ее сторонам. Переносчики электронов располагаются в мембране таким образом, что во внешней среде происходит накопление ионов водорода (при этом возникает подкисление среды), а в цитоплазме их число уменьшается, что сопровождается подщелачиванием среды. Неравномерное распределение положительно заряженных протонов (большее число на наружной и меньшее на внутренней поверхности плазматической мембраны) приводит к формированию расположенного поперек мембраны электрического поля, мембранного потенциала. В результате при переносе электронов возникает трансмембранный электрохимический градиент ионов водорода, обозначаемый символом $\Delta\mu_{H^+}$ и измеряемый в вольтах. Энергия мембранного потенциала используется для синтеза локализованной в мембране АТФазой АТФ.

Энергия в форме $\Delta\mu_{H^+}$ не теряется при ее запасании и может образовываться и потребляться клеткой в условиях, когда невозможен синтез АТФ. В последние годы показано, что аналогичным образом перераспределяются и атомы Na^+ с образованием энергии, обозначаемой как $\Delta\mu_{K^+}$. Данные формы энергии тратятся преимущественно на движение бактерий (у подвижных форм) и транспорт веществ в клетку и из нее.

Типичная цепь выглядит следующим образом:



Конечным этапом переноса электронов (протонов) по дыхательной цепи является восстановление цитохромов $a + a_3$ (цитохромоксидазы). Цитохромоксидаза является конечной оксидазой, передающей электроны на кислород. Образующиеся при окислении флавинадениндинуклеотида (ФАД) или хинонов протоны связываются ионами O^{2-} с образованием воды.

В то время как у эукариотов ферменты дыхательной цепи имеют относительно постоянный состав, у бактерий встречаются вариации в составе дыхательной цепи. У некоторых бактерий цитохромы отсутствуют и при контакте с кислородом происходит непосредственный перенос водорода на кислород с помощью флавопротеидов, конечным продуктом при этом оказывается перекись водорода (H_2O_2).

Помимо углеводов, прокариоты способны использовать другие органические соединения, в частности белки, в качестве источника энергии, окисляя их полностью до CO_2 и H_2O .

Аминокислоты и белки также могут выступать в качестве энергетических ресурсов. Их использование связано в первую очередь с определенными ферментативными преобразованиями подготовительного характера. Белки вначале вне клетки расщепляются протеолитическими ферментами на пептиды, которые поглощаются клеткой и расщепляются внутриклеточными пептидазами до аминокислот. Аминокислоты могут использоваться в конструктивном метаболизме, а могут у аммонифицирующих бактерий служить основным материалом в энергетических процессах при окислительном дезаминировании, в результате которого происходят выделение аммиака и превращение аминокислоты в кетокислоту, которая через цикл трикарбоновых кислот вступает в конструктивный метаболизм.

Процесс аммонификации известен как *гниение*, при этом происходит накопление продуктов, обладающих неприятным специфическим запахом образующихся при этом первичных аминов. Гнилостные бактерии осуществляют минерализацию белка, разлагая его до CO_2 , NH_3 , H_2S . К гнилостным бактериям относятся *Proteus*, *Pseudomonas*, *Bacillus cereus*.

Анаэробное дыхание. Некоторые бактерии обладают способностью использовать в анаэробных условиях нитрат как конечный акцептор водорода. Восстановление нитрата может происходить двумя путями:

- 1) аммонификацией, при которой нитрат превращается в аммиак;
- 2) денитрофикацией, при которой происходит восстановление нитрата до молекулярного азота или закиси азота. Этот процесс связан с деятельностью фермента нитратредуктазы.

Сульфатное дыхание. Использовать сульфат как конечный акцептор водорода при анаэробном дыхании способна лишь небольшая группа бактерий, включающая только два рода: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*. Эти бактерии являются строгими анаэробами, они обитают в сероводородном иле и не имеют значения в медицинской микробиологии. Они способны использовать в качестве донора электронов молекулярный водород, поэтому их относят к хемолитотрофам. Этим бактериям принадлежит ведущая роль в образовании сероводорода в природе.

Бродильный (ферментативный) метаболизм. *Ферментация*, или *брожение*, — процесс получения энергии, при котором отщепленный от субстрата водород переносится на органические соединения. Кислород в процессе брожения участия не принимает. Восстановленные органические соединения выделяются в питательную среду и накапливаются в ней. Ферментироваться могут углеводы, аминокислоты (за исключением

ароматических), пурины, пиримидины, многоатомные спирты. Не способны сбраживаться ароматические углеводороды, стероиды, каротиноиды, жирные кислоты. Эти вещества разлагаются и окисляются только в присутствии кислорода, в анаэробных условиях они стабильны. Продуктами брожения являются кислоты, газы, спирты.

При ферментации гексоз (глюкозы) пируват лишь частично окисляется в цикле трикарбоновых кислот. Последний выполняет только функции поставщика предшественников для биосинтетических процессов. Энергия в форме двух молекул АТФ образуется в результате субстратного фосфорилирования, протекающего при окислении триозофосфата в пируват. Отщепившийся от субстрата водород, находящийся в форме восстановленного НАД, переносится на пируват, превращая его в цепи реакций в этанол, кислоты, газы. Исходя из природы конечных продуктов, различают несколько типов брожения углеводов: спиртовое, молочнокислое, муравьинокислое, маслянокислое.

Спиртовое брожение встречается в основном у дрожжей. Конечными продуктами являются этанол и CO_2 . Спиртовое брожение используется в хлебопекарной промышленности и виноделии.

Молочнокислое брожение происходит у *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. Salivarius*, а также у бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*. Продуктами этого типа брожения являются молочная кислота, этанол и уксусная кислота. Продукты молочнокислого брожения играют большую роль в формировании колонизационной резистентности бактериями рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, составляющих облигатную флору кишечника. Молочнокислые бактерии широко используются в молочной промышленности для получения молочнокислых продуктов, а также в создании пробиотиков.

Муравьинокислое (смешанное) брожение встречается у представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae*. Различают два типа этого брожения. При первом происходит расщепление пирувата с образованием через цепь реакций муравьиной, янтарной и молочной кислот. Сильное кислотообразование можно выявить реакцией с индикатором метиленовым красным, который меняет окраску в сильноокислой среде. При втором типе брожения образуется целый ряд кислот, однако главным продуктом брожения являются ацетоин и 2,3-бутандиол, образующиеся через цепь реакций из двух молекул пирувата. Эти вещества при взаимодействии с α -нафтолом в щелочной среде вызывают образование окраски бурого цвета, что выявляется реакцией Фогеса—Проскауэра, используемой при идентификации бактерий.

Маслянокислое брожение. Масляная кислота, бутанол, ацетон, изо-пропанол и ряд других органических кислот, в частности уксусная, капроновая, валериановая, пальмитиновая, являются продуктами сбраживания углеводов сахаролитическими строгими анаэробами. Спектр этих кислот, определяемый с помощью газожидкостной хроматографии, используется как экспресс-метод при идентификации анаэробов.

Ферментация белков. Если для бактерий с бродильным метаболизмом источником энергии служат белки, то такие бактерии называются «пептолитические». Пептолитическими являются некоторые клостридии, в частности *C. histolyticum* и *C. botulinum*. Пептолитические бактерии гидролизуют белки и сбраживают аминокислоты. Многие аминокислоты сбраживаются совместно с другими, при этом одна выполняет функцию донора, а другая — функцию акцептора водорода. Аминокислота-донор дезаминируется в кетокислоту, которая в результате окислительного декарбоксилирования превращается в жирную кислоту.

3.1.4. Конструктивный метаболизм

Основные органические компоненты бактериальной клетки, как уже было отмечено, синтезируются в реакциях полимеризации из строительных блоков: аминокислот, фосфатов, сахаров, пуриновых и пиримидиновых оснований, органических кислот. Поставщиками этих строительных блоков являются промежуточные продукты основных путей энергетического метаболизма (см. рис. 3.2). Среди бактерий выделяется группа, называемая «прототрофы», которые способны синтезировать все компоненты клетки из одного источника углерода и энергии. Если бактерии теряют способность образовывать какое-либо жизненно важное вещество (аминокислоту, витамин, фактор роста и др.), участвующее в биосинтетических процессах, то для их роста и размножения требуется его поступление в готовом виде. Такие вещества называют «фактор роста», а бактерии, возникшие, как правило, в результате мутаций, — «ауксотрофы».

Факторами роста служат аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, витамины, которые входят в состав простетических групп коферментов.

Биосинтез аминокислот и синтез белка. Большинство бактерий обладают способностью синтезировать все 20 аминокислот, из которых состоят белки. Белки в бактериальной клетке выполняют ферментативную функцию, а также являются составной частью структурных образо-

ваний клетки: цитоплазматической мембраны и ее производных, клеточной стенки, жгутиков, капсулы и спор у некоторых бактерий.

Углеродные скелеты аминокислот образуются из промежуточных продуктов обмена. Исходным материалом служат промежуточные продукты фруктозодифосфатного и пентозофосфатного путей, цикл трикарбоновых кислот: пируват, кетоглутаровая кислота, оксалоацетат, фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-4-фосфат. Аминогруппы вводятся в результате непосредственного аминирования или переаминирования. Перевод неорганического азота в органические соединения происходит всегда через аммиак. Нитраты, нитриты и молекулярный азот предварительно восстанавливаются в аммиак и только после этого включаются в состав органических соединений. В результате прямого аминирования образуются лишь L-аланин, L-аспартат, L-глутамат и L-глугамин. Все остальные аминокислоты получают свою аминогруппу в результате переаминирования с одной из первичных аминокислот. Синтез белка осуществляется у бактерий так же, как в клетках эукариот.

Синтез белка происходит на рибосомах и обычно подразделяется на три процесса:

- 1) инициацию;
- 2) элонгацию;
- 3) терминацию.

Инициация синтеза белка заключается в связывании мет-тРНК с малой субъединицей рибосомы с последующим встраиванием иницирующего кодона иРНК. *Элонгация* происходит за счет поочередного присоединения аминокислотных остатков к растущей полипептидной цепи. *Терминация* наступает, когда синтез полипептида достигает стоп-кодона. У *E. coli* известны три таких кодона: УАА, УГА и УАГ. В результате действия факторов терминации происходят остановка синтеза белка и диссоциация молекулы иРНК и рибосомы.

Скорость синтеза белка в микробной клетке очень велика, так как ДНК бактерий не отграничена мембраной от цитоплазмы, не содержит интронов (участков ДНК, не несущих информации) и, соответственно, у микробов отсутствуют вырезание их копий из иРНК и сшивание копий экзонов (участков, кодирующих белки). В результате в клетках прокариот не происходит физического разделения процессов синтеза иРНК (транскрипции) и трансляции, поэтому оба процесса часто идут одновременно: трансляция начинается раньше, чем завершена транскрипция. Бактерии также способны одновременно синтезировать несколько идентичных молекул на одной матрице иРНК. При этом иРНК

связывается с несколькими рибосомами с образованием комплекса, получившего название «полисомы».

Процесс синтеза белка представляет собой важную мишень для разнообразных антимикробных препаратов. При этом антибиотики имеют различные мишени и механизмы действия, например аминогликозиды и тетрациклины соединяются с малой, а макролиды и линкозамиды — с большой субъединицей рибосом. Белки, синтезируемые клеткой, могут использоваться внутри нее или выделяться в окружающую среду или периплазматическое пространство (грамотрицательные бактерии).

Многие годы считали, что после синтеза на рибосомах молекулы белков сами приобретают нужную форму (третичную структуру). Сейчас мы знаем, что большинство из них приобретают нужную конформацию молекулы с помощью специальных белков, получивших название «шапероны». Молекулы шаперонов не только обеспечивают правильное складывание белков, но и препятствуют неправильному их закручиванию. Эти молекулы абсолютно необходимы для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки как эу-, так и прокариот. Процесс укладки белковых молекул является энергетически зависимым и сопровождается расходом энергии АТФ. Количество шаперонов резко возрастает, когда клетка подвергается стрессорному воздействию различных факторов внешней среды (температуры — тепловой шок, токсинов, нарушающих метаболические реакции и др.) При этом шапероны защищают многие белки, включая ДНК-полимеразы, от разрушения. Еще одной важной функцией шаперонов является их участие в транспорте белков через мембраны.

Биосинтез нуклеотидов. Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды — это те строительные блоки, из которых синтезируются нуклеиновые кислоты. Кроме того, пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды входят в состав многих коферментов и служат для активации и переноса аминокислот, сахаров, липидов в реакциях полимеризации. Исходным соединением для образования пентозной части нуклеотидов служит рибозо-5-фосфат, образующийся в фруктозодифосфатном пути. Углеродный скелет пиримидинов происходит из аспартата, который образуется в цикле трикарбоновых кислот. Атомы азота и аминогруппы пуринов и аминосодержащих пиримидинов происходят из аспартата и глутамина.

Ключевой промежуточный продукт для биосинтеза жирных кислот — ацетилкоэнзим А. Ключевые промежуточные продукты для синтеза фосфолипидов — продукт фруктозодифосфатного пути,

диоксиацетилфосфат, восстанавливающийся в глицерол-3-фосфат, который соединяется с остатками жирных кислот.

Биосинтез углеводов. Углеводы представлены в бактериальной клетке в виде моно-, ди- и полисахаридов, а также комплексных соединений.

Синтез глюкозы происходит из пирувата за счет обратных реакций, путей распада глюкозы. Для обхода реакций, идущих только в одном направлении, имеются обходные пути, например глиоксилатный цикл.

3.1.5. Транспорт веществ

Транспорт веществ в бактериальную клетку

Для того чтобы питательные вещества могли подвергнуться превращениям в цитоплазме клетки, они должны проникнуть в клетку через пограничные слои, отделяющие клетку от окружающей среды. Ответственность за поступление в клетку питательных веществ лежит на цитоплазматической мембране.

Существует два типа переноса веществ в бактериальную клетку: пассивный и активный.

При *пассивном* переносе вещество проникает в клетку только по градиенту концентрации. Затрат энергии при этом не происходит. Различают две разновидности пассивного переноса: простую диффузию и облегченную диффузию.

- *Простая диффузия* — неспецифическое проникновение веществ в клетку, при этом решающее значение имеют величина молекул и липофильность. Скорость переноса незначительна.
- *Облегченная диффузия* протекает с участием белка-переносчика транслоказы. Скорость этого способа переноса зависит от концентрации вещества в наружном слое.

При *активном* переносе вещество проникает в клетку против градиента концентрации с помощью белка-переносчика пермеазы. При этом происходит затрата энергии. Имеется два типа активного транспорта. При первом типе активного транспорта небольшие молекулы (аминокислоты, некоторые сахара) накачиваются в клетку и создают концентрацию, которая может в 100–1000 раз превышать концентрацию этого вещества снаружи клетки.

Второй механизм, получивший название «*транслокация радикалов*» (*фосфотрансферный путь*), обеспечивает включение в клетку некоторых сахаров (например, глюкозы, сахарозы), которые в процессе переноса фосфорилируются, то есть химически модифицируются.

Для осуществления этих процессов в бактериальной клетке локализуется специальная фосфотрансферазная система, составной частью которой является белок-переносчик, находящийся в активной фосфорилированной форме. Фосфорилированный белок связывает свободный сахар на наружной поверхности мембраны и транспортирует его в цитоплазму, где сахар освобождается в виде фосфата. Поступив в клетку, органический источник углерода и энергии вступает в цепь биохимических реакций, в результате которых образуются АТФ и ингредиенты для биосинтетических процессов. Ферменты, входящие в состав фосфотрансферазной системы, принимают участие в регуляции процесса под названием *катаболическая репрессия*. Когда в питательной среде присутствуют два углевода, то бактериальная клетка начинает утилизировать энергетически более выгодный. Проникновение другого углевода в клетку и его утилизация при этом репрессируются. Например, если в питательной среде присутствуют одновременно глюкоза и лактоза, то глюкоза блокирует расщепление лактозы. Биосинтетические (конструктивные) и энергетические процессы протекают в клетке одновременно. Они тесно связаны между собой через общие промежуточные продукты, которые называются «амфиболиты».

Транспорт веществ из бактериальной клетки

В процессе жизнедеятельности бактериям требуется выделять в окружающую среду различные белки и ферменты. Секретируемые белки необходимы для жизнедеятельности бактерий. Они участвуют в построении клеточных оболочек, жгутиков, пилей, расщепляют крупные полимерные молекулы, используемые в качестве питательных веществ, до размеров, способных проходить через бактериальную цитоплазматическую мембрану; осуществляют взаимодействие с системами макроорганизма. У грамположительных микробов белки секретируются непосредственно во внешнюю среду. А у грамотрицательных бактерий они должны пересечь наружную мембрану. Наличие наружной мембраны привело к формированию у грамотрицательных бактерий различных по структуре и функциям систем секреции 6 типов.

Белки, секретируемые по I, III, IV и VI путям, пересекают внутреннюю цитоплазматическую и наружные мембраны в один этап без участия *sec*-белков, без химической модификации, тогда как белки, секретируемые по II и V путям, проходят через внутреннюю и наружную мембрану отдельными этапами при участии *sec*-белков.

Sec-белки (транслоказы) являются небольшими белками в 30 аминокислот, которые способны узнавать сигнальную последовательность, расположенную на N-терминальном конце секретируемого белка, и связываться с ней сразу же после завершения процесса трансляции, предотвращая включение секретируемого белка в метаболизм клетки. В процессе транслокации белка, которая сопровождается поглощением энергии, происходит отщепление пептидазой в периплазматическом пространстве сигнальной последовательности, а в результате взаимодействия с шаперонами происходит формирование четвертичной структуры переносимого белка.

Зрелый белок проходит через пору в наружной мембране в окружающую среду. Секреция II типа является основным путем для секреции экстрацеллюлярных гидролитических ферментов у грамотрицательных бактерий. У *V. cholerae* по этому пути выделяются холерный токсин, нейраминидаза, гемагглютининпротеаза, а у *P. aeruginosa* — эластаза, фосфолипаза С.

Секреторная система V типа отличается от II тем, что в периплазматическом пространстве из C-терминальной части секретируемого полипептида формируется β -цилиндрическая структура, выполняющая роль поры, через которую проходит N-терминальный конец. Внеклеточный протеолиз приводит секретируемый белок в активное функциональное состояние. По этому пути секретируются IgA-протеаза у *N. gonorrhoeae*, белок пертактин у *B. pertussis*.

Секреторная система I типа протекает одноэтапно и требует наличия трех секреторных белков: белка, формирующего в цитоплазматической мембране пору АТФазы; белка цитоплазматической мембраны, пронизывающего периплазматическое пространство; белка клеточной стенки, формирующего пору.

Транспортные белки узнают секретируемый белок по наличию сигнальной последовательности, расположенной на C-терминальном конце белка. Данным путем секретируются в основном пороформирующие токсины: гемолизин, металлопротеаза, а также внеклеточная аденилатциклаза у *B. pertussis* (рис. 3.3).

Секреторная система IV типа (Т4СС) представляет систему, расположенную на поверхности бактериальной клетки, посредством которой бактериальная клетка способна как секретировать, так и захватывать молекулы ДНК и секретировать эффекторные белки в клетку-мишень. Секреторная система IV типа (Т4СС) представляет белковый комплекс, состоящий из 12–13 белков, формирующих канал, по которому ДНК

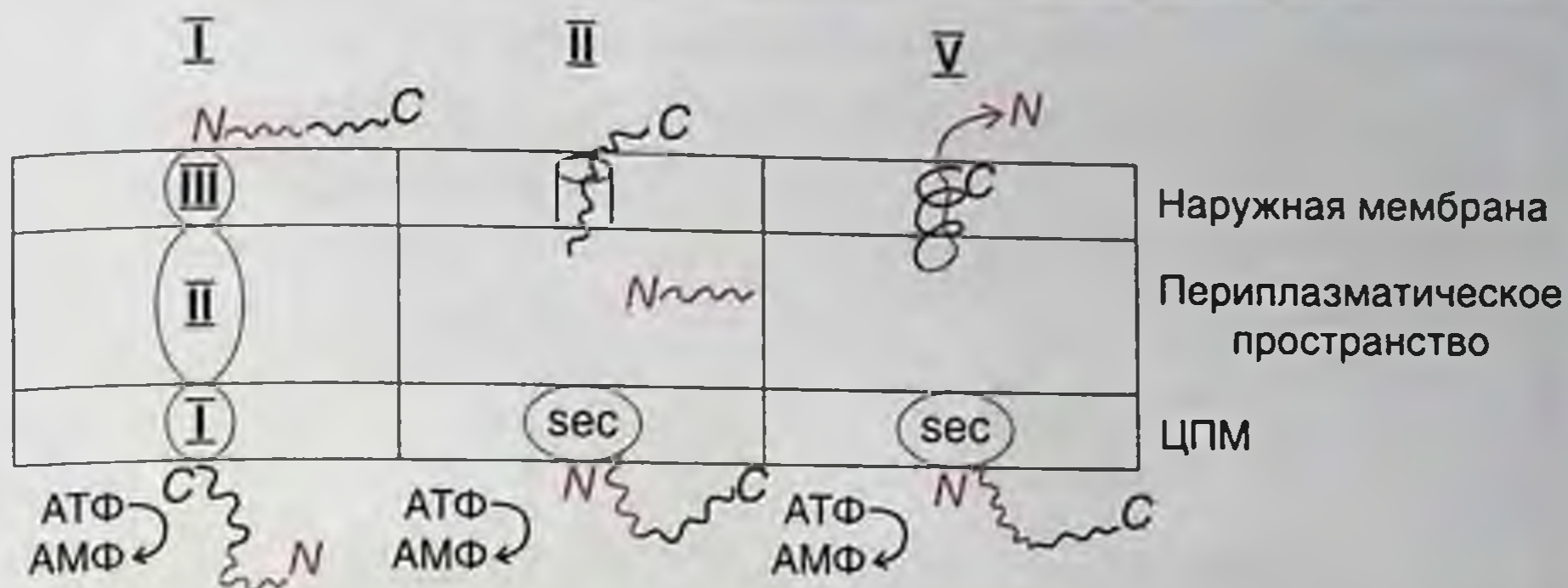


Рис. 3.3. Схема строения секреторных систем: I тип обеспечивает секрецию формирующих поры токсинов (гемолизина); II тип обеспечивает секрецию гидролитических ферментов, некоторых токсинов (энтеротоксин *V. cholerae*), поверхностных структур (пили 4-го типа); V тип обеспечивает аутотранспорт белков у грамотрицательных бактерий

из бактериальной клетки-донора доставляется в клетку-реципиент в процессе конъюгации (см. раздел 5.4.1), а также захватывается ДНК из окружающей среды в процессе естественной трансформации (см. раздел 5.4.3). По этому каналу также происходит доставка поршневым механизмом эффекторных молекул в клетку-мишень. Благодаря этому обеспечивается внутриклеточное обитание бруцелл и коксиилл (рис. 3.4).

Секреторная система VI типа (Т6СС) обладает структурной гомологией со структурой отростка бактериофага Т4 (см. раздел 3.4). Это белковая система, которая формирует тубулярную структуру (Нср), покрытую сокращающимся белком (рис. 3.5). При активации системы чехол сокращается и в результате вращающегося движения происходит пронизывание клетки-мишени с помощью находящегося на поверхности белка Vrg.

Особый интерес для медицинской микробиологии представляет секреторная система III типа (Т3СС), возникшая эволюционно у грамотрицательных бактерий для транспорта из клетки компонентов жгутиков. Показано, что он используется также для направленной доставки в клетку эукариот бактериальных белков. В результате действия последних в клетке возникают различные нарушения функций, приводящие в конечном счете к появлению у человека заболеваний. В процесс выделения молекул из клетки данным способом вовлечено более 20 различных белков. Секреторная система III типа (Т3СС) представляет шприцеподобную структуру (рис. 3.6), способную инъецировать

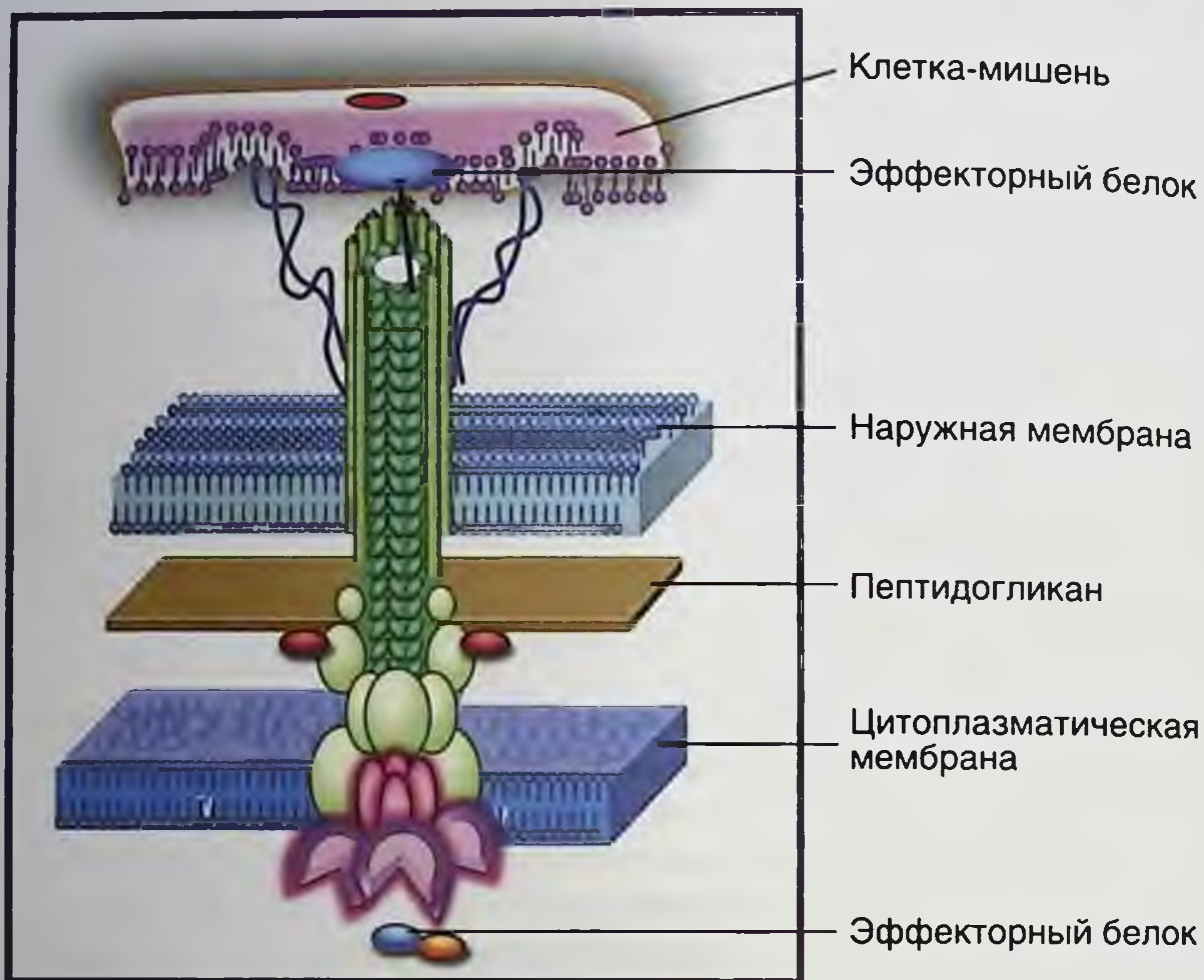


Рис. 3.4. Секреторная система IV типа (Т4СС). Схема

эффекторные молекулы непосредственно в цитозоль клетки-хозяина. Белки секреторной системы III типа можно разделить на три группы: белки, формирующие «шприц» секреторной системы III типа; белки транслокационного комплекса, обеспечивающие транслокацию эффекторных молекул в цитоплазму клеток хозяина; эффекторные белки, которые непосредственно оказывают модулирующее действие на клетку-хозяина.

Белки транслокационных комплексов формируют поры в мембране клетки-хозяина, создавая канал для доставки эффекторных молекул. Транслокация через сформировавшийся канал в клетку-хозяина эффекторных молекул происходит при участии белков-шоперонов.

Эффекторные белки вызывают реорганизацию цитоскелета клетки-хозяина, что способствует проникновению бактерии в клетку-хозяина, а также вызывают различные нарушения функций клеток хозяина, приводящие в конечном счете к возникновению патологического процесса.

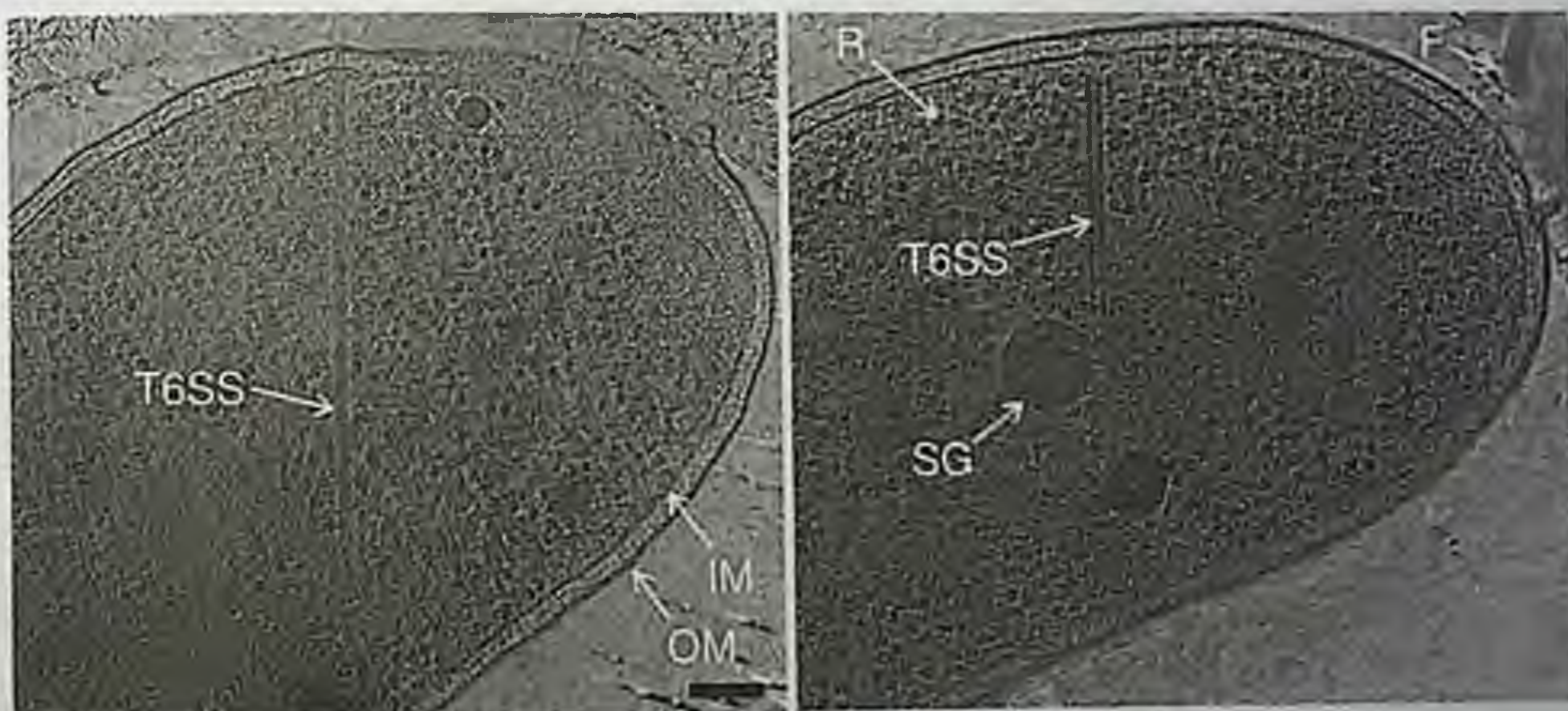
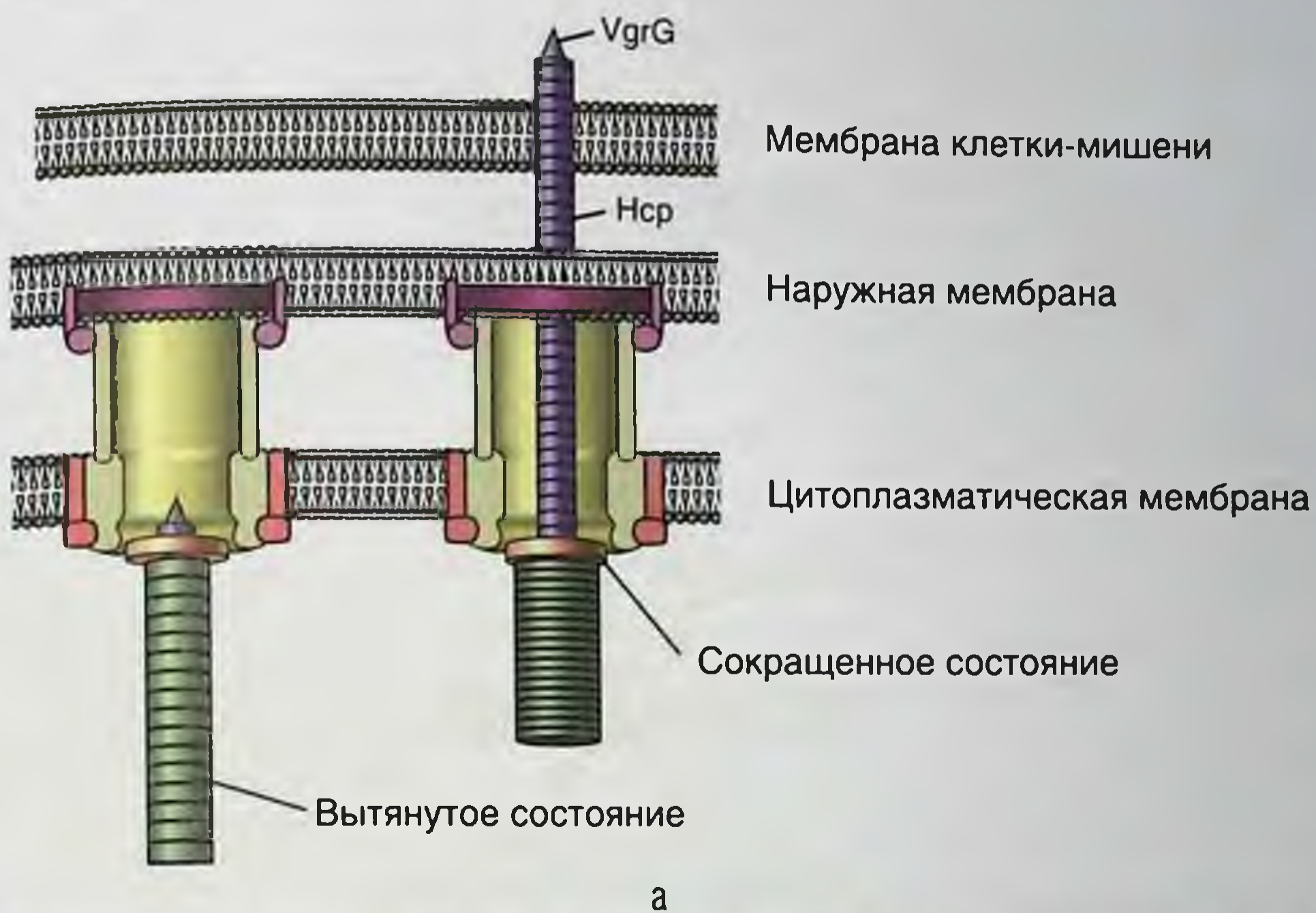


Рис. 3.5. Секреторная система VI типа (Т6СС): а — схема строения, б — электронная микрофотография

Экспрессия генов секреторной системы III типа (Т3СС) регулируется различными транскрипционными регуляторами, которые интегрируют сигналы окружающей среды, такие как осмолярность, концентрация кислорода, pH , температура, концентрация ионов Ca . Секреторная

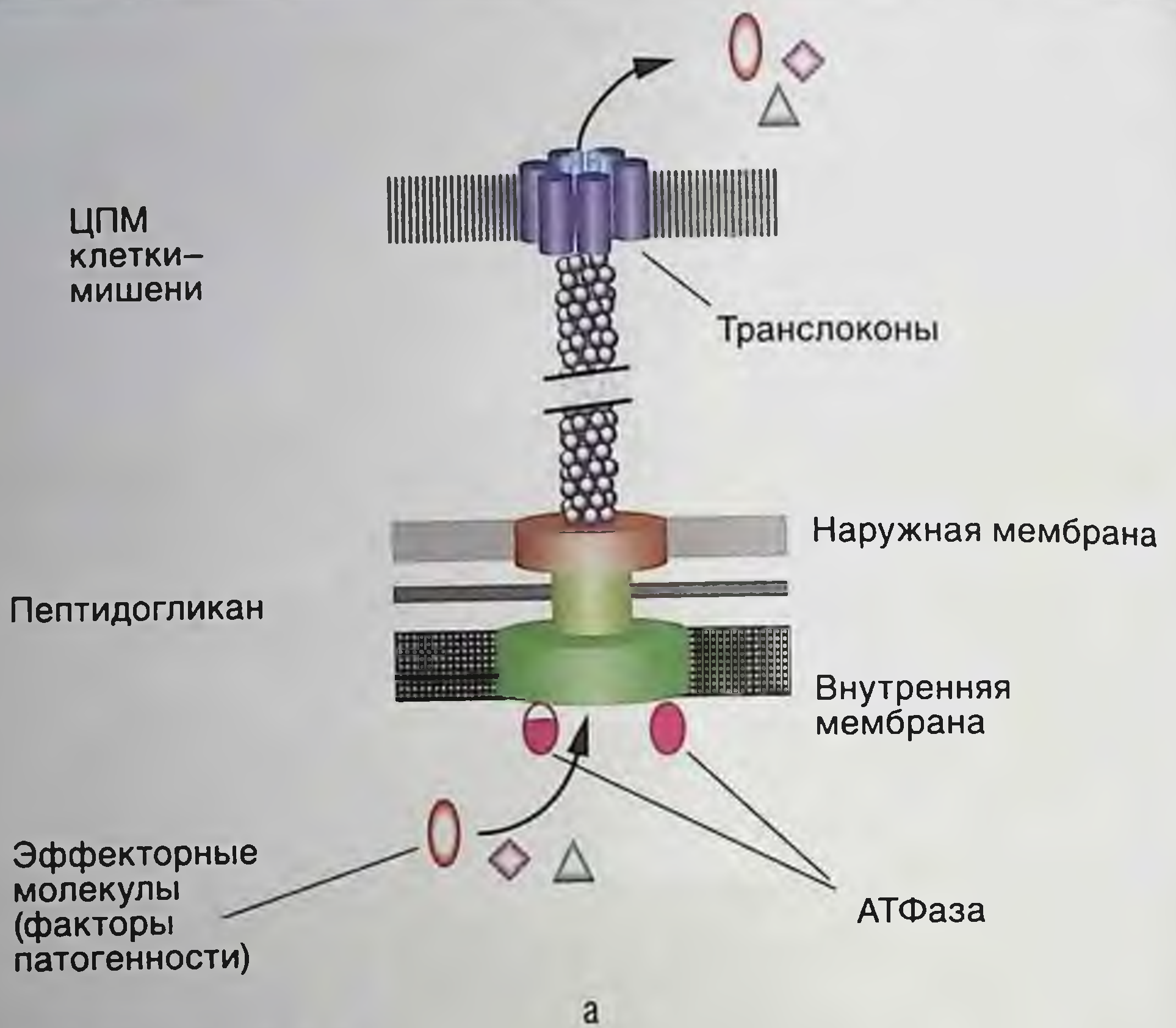


Рис. 3.6. Строение секреторной системы III типа (ТЗСС): а — схема строения; б — электронная микрофотография секреторной системы III типа у *Salmonella*

система III типа имеется у *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *P. aeruginosa*, *Chlamydia*, у некоторых патогенных *E. coli*.

Выделение молекул из клетки также осуществляется с помощью белков-переносчиков и фосфотрансферным путем. Одним из вариантов переносчиков можно считать белковые помпы, обеспечивающие выведение из клеток ряда антимикробных препаратов, например тетрациклинов. Фосфотрансферный путь широко используется при выведении молекул, необходимых для построения различных структур бактерий, расположенных снаружи от плазматической мембраны, в частности клеточной стенки, капсулы и др. Некоторые из стадий подобного транспорта подавляются используемыми в практике антимикробными препаратами, например, транспорт через мембрану N-ацетилглюкозамина блокируется гликопептидным антибиотиком ванкомицином. Особым типом транспорта веществ из клеток бактерий является недавно открытая секреция мембранных пузырьков. Хотя механизм их выделения остается не совсем ясным, показано, что они могут содержать липиды, белки, нуклеиновые кислоты и полисахариды, в том числе некоторые бактериальные токсины.

3.1.6. Регуляция метаболизма у бактерий

Регуляция функций бактерий может приводить к появлению или исчезновению активности, а также изменению ее уровня. Эффективность клеточных регуляторных механизмов очень велика и обеспечивает максимально экономичное использование питательных веществ, предупреждает избыточный синтез промежуточных и конечных метаболитов и способствует адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Регуляторные процессы в клетке происходят на разных уровнях и начинаются на уровне генома. Изменение числа копий определенного гена приводит к повышению синтеза закодированного в нем белка.

Регуляция на уровне транскрипции сводится к тому, что ряд генов бактерий транскрибируется только в определенных условиях. Регуляция осуществляется специальными транскрипционными факторами и компонентами глобальной регуляторной сети. Под ее контролем находятся ответы микробной клетки на изменения температуры и *pH* среды, наличие питательных веществ и двухвалентных катионов (особенно Ca^{2+}), фаза роста культуры. На уровне транскрипции регулируются III тип транспорта веществ из бактерий в клетку хозяина и процессы, обеспечивающие поддержание жизнедеятельности клетки в экстре-

мальных для нее условиях. К последним относятся системы холодового и теплового шока, адаптационная система, индуцибельная система репарации ДНК (SOS-ответ) и др. Синтез белка этих систем начинается, когда клетка попадает в неблагоприятные условия и образование молекул и РНК других белков замедляется. Количество одного и того же фермента у бактерий в разных условиях может изменяться от 1–2 молекул на клетку до нескольких процентов от ее массы. Известны некоторые механизмы регуляции на уровне транскрипции, связанные с регуляторными генами. Различают негативную и позитивную регуляцию. При *позитивной регуляции* индуктор взаимодействует с репрессором и освобождает ген-оператор. При *негативной регуляции* происходит блокирование гена-оператора белком-репрессором.

В регуляции различных свойств бактерий в ответ на изменения условий окружающей среды принимают участие так называемые двухкомпонентные системы передачи сигнала. Основными компонентами системы проведения сигнала являются *сенсор*, принимающий сигнал, которым обычно является трансмембранная протеинкиназа, изменяющая свою активность под влиянием фактора окружающей среды, и расположенный в цитозоле *регулятор*, который она активирует и который, в свою очередь, влияет на экспрессию соответствующих оперонов.

Регуляция на уровне ферментов осуществляется регуляцией интенсивности ферментативных реакций. Скорость последних может регулироваться двумя основными способами: путем изменения количества ферментов и путем изменения их активности.

- *Биосинтетические пути*, опосредованные конститутивными ферментами, регулируются аллостерическим ингибированием активности первого фермента. Биосинтетические пути, опосредованные индуцибельными ферментами, регулируются путем репрессии их синтеза конечным продуктом.
- *Катаболические пути*, опосредованные индуцибельными ферментами, регулируются индукцией синтеза ферментов и катаболической репрессией, а опосредованные конститутивными ферментами — посредством аллостерических воздействий на их активность. АТФ в этом случае является отрицательным эффектором, а аденозиндифосфат — положительным.

3.1.7. Морфогенез бактерий и их сообществ

Построение микробной клетки представляет собой сложный процесс, включающий не только синтез компонентов и деление. Для фор-

мирования нормальной клетки необходимо также образование всех структур, расположенных снаружи от плазматической мембраны, то есть клеточной стенки, жгутиков, ресничек капсулы и т.п. Морфогенез начинается с синтеза молекул-предшественников в цитоплазме клеток. Эти молекулы представляют собой компоненты будущих внешних структур. Синтезированные молекулы различными путями переносятся через плазматическую мембрану. Компоненты пептидогликана, например, переносятся за счет фосфотрансферного пути, некоторые белки — по II типу секреции. Компоненты жгутиков переносятся за счет специальных белков — транслоказ, являющихся компонентами III типа вывода белков из клетки. На поверхности мембраны перенесенные молекулы собираются в блоки, которые, в свою очередь, транспортируются к конечному месту своего расположения и формируют ту или иную внешнюю структуру.

Все этапы морфогенеза контролируются специфическими транспортными и связующими белками, регулируются различными внешними и внутренними факторами и являются мишенями действия ряда антимикробных препаратов. Кроме компонентов клетки, во внешнюю среду также выносятся органические молекулы, предназначенные для образования внеклеточного матрикса и поверхностной пленки, отделяющей сообщества от внешней среды. Многие стадии морфогенеза регулируются за счет активности связанных с мембраной ферментов, работа которых, в свою очередь, зависит от различных факторов, например температуры. Так, при 30 °С у мезофильных возбудителей болезней человека не образуются полноценные капсулы и капсулоподобные оболочки, реснички, функционально активные молекулы токсинов. Последние могут накапливаться в клетке или периплазме в виде гигантских молекул — протоксинов, у которых не происходит разрезания (ограниченный протеолиз), делающего их функционально активными. Синтез самих молекул-предшественников при этом может не изменяться. Интересно, что после возвращения микроба к оптимальной температуре нормальная структура всех компонентов клетки восстанавливается обычно уже через 2–3 ч и микроб вновь становится вирулентным.

3.1.8. Вторичный метаболизм

Хотя бактерии и клетки животных имеют в большинстве своем сходные пути промежуточного метаболизма, ряду бактерий свойственны дополнительные реакции, в ходе которых синтезируются различные уникальные соединения. Совокупность подобных реакций получила

название «вторичный метаболизм», а полученные в результате вещества — «вторичные метаболиты». Наиболее характерными примерами вторичных метаболитов являются антибиотики, синтезируемые представителями ограниченного числа родов бактерий, включающего *Bacillus*, *Streptomyces* и *Nocardia*.

3.1.9. Отношение к факторам окружающей среды

Отношение к температуре

Влияние температуры на бактерии в медицинской микробиологии имеет два основных результата: возможность размножаться и сохранение жизнеспособности. В последнем случае речь идет о возможности восстановления способности к росту и размножению после пребывания при экстремальных температурах (повышенных или пониженных) для данного вида. Температурные условия на Земле различаются в широком диапазоне от 90 до 2500 °С, и всюду встречаются микробы, приспособившиеся к ним. Бактерии, вызывающие болезни людей, максимально адаптированы к температуре тела человека. В то же время некоторые из них могут жить и размножаться в окружающей среде (воде, почве, организмах различных животных), в связи с чем оптимальная температура для их роста может быть ниже или выше 37 °С.

По отношению к температуре роста бактерии принято разделять на три основные группы:

- 1) психрофилы;
- 2) мезофилы;
- 3) термофилы.

Психрофилы живут и размножаются при пониженных температурах (диапазон температур роста от +10 до –20 °С). При этом строгие (облигатные) психрофилы не способны размножаться при температуре выше 20 °С, а факультативные имеют оптимум роста от 22 до 30 °С. Именно в группе факультативных психрофилов обнаружены возбудители болезней человека (например, возбудитель чумы — *Yersinia pestis*, иерсиниоза — *Yersinia enterocolitica*, гнойно-воспалительных процессов — *Aeromonas spp.*). Бактерии, растущие при низких температурах, содержат повышенное количество ненасыщенных жирных кислот и имеют ряд особенностей структуры ферментных белков, что позволяет им расти при низких температурах.

Мезофилы включают бактерии, температурный диапазон роста которых находится между 10 и 45 °С, а диапазон оптимальных температур

роста лежит между 30 и 40 °С. Именно к этой группе относится большинство возбудителей болезней человека, оптимальный рост которых возможен при 37 °С.

Термофилы представляют группу микробов, способных расти при повышенных температурах. Различают *термотолерантные формы*, для которых оптимальной температурой роста являются 37 °С, но возможность роста, в отличие от мезофилов, сохраняется до 60 °С. *Факультативные термофилы* проявляют максимальный рост при 50–60 °С, но также растут при 20–40 °С, в то время как *облигатные термофилы* не могут расти при температуре ниже 40 °С; оптимальная температура для их размножения 70 °С. Известны также *экстремальные термофилы*, размножающиеся при температуре выше 80 °С. Ряд микробов, являющихся экстремальными термофилами, относятся к доминиону Археи. В строении термофилов одним из важнейших факторов, обеспечивающих термоустойчивость, является структура их белков. Хотя среди термофилов пока не найдены возбудители болезней человека, продукты их жизнедеятельности используются в медицинской промышленности (протеазы, нанесенные на перевязочный материал, для инфицированных ран) и при изготовлении моющих средств (ферменты-биодобавки для очистки тканей от органических молекул).

Сохранение жизнеспособности бактерий при различных температурах зависит от строения клеток. Наиболее устойчивыми следует считать споры, выживающие в широком диапазоне температур — от минусовых до температуры кипящей воды. Вегетативные формы бактерий для выживания в условиях, несколько отличающихся от оптимальных, используют дополнительные индуцибельные генетические программы — системы холодового и теплового шока, относящиеся к так называемым стрессовым системам. Особенности чувствительности бактерий к температуре учитываются при дезинфекции и стерилизации.

Отношение к кислотности среды

Один из важных факторов, определяющих возможности жизни бактерий, — кислотность среды (концентрация ионов водорода). Большинство возбудителей болезней человека живут при *pH* среды от 4 до 9 с оптимумом около 7. Вместе с тем известны микробы, предпочитающие щелочную среду *pH* от 9 и выше (алкалофильные бактерии). К их числу можно отнести возбудитель холеры — *Vibrio cholera*. Некоторые микробы растут только в кислой среде при *pH* 4 и ниже (ацидофильные бактерии). Представители этой группы микроорганизмов используются в

пищевой промышленности для получения молочнокислых продуктов. Известны микробы, устойчивые к изменениям pH среды и способные сохранять жизнеспособность как в сильноокислой, так и в сильнощелочной средах. К таким бактериям относятся возбудители туберкулеза, проказы и микобактериозов (*Mycobacterium spp.*), а также актиномицеты и нокардии.

Отношение к молекулярному кислороду

Кислород, широко распространенный в природе, находится в свободном и связанном состоянии. В клетках он находится в связанном состоянии в составе воды и органических соединений. В атмосфере он присутствует в свободном состоянии в виде молекулярной формы, объемная доля которого составляет 21%. По отношению к кислороду, а также по использованию его в процессах получения энергии микроорганизмы подразделяются на три группы:

- 1) облигатные аэробы;
- 2) облигатные анаэробы;
- 3) факультативные анаэробы.

Облигатные аэробы растут и размножаются только в присутствии кислорода, используют кислород для получения энергии путем кислородного дыхания. Энергию получают оксидативным метаболизмом, применяя кислород как терминальный акцептор электронов в реакции, катализируемой цитохромоксидазой.

Облигатные аэробы подразделяются на строгие аэробы, которые растут при парциальном давлении воздуха, и микроаэрофилы, которые, используя кислород в процессах получения энергии, растут при его пониженном парциальном давлении. Это связано с тем, что у микроаэрофилов имеются ферменты, которые инактивируются при контакте с сильными окислителями и активны только при низких значениях парциального давления кислорода, например фермент гидрогеназа.

Облигатные анаэробы не используют кислород для получения энергии. Тип метаболизма у них бродильный, за исключением метаболизма у двух видов бактерий: *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*, которые относятся к хемолитотрофам и обладают сульфатным дыханием. Облигатные анаэробы подразделяются на две группы: строгие анаэробы и аэротолерантные. Строгие анаэробы характеризуются тем, что молекулярный кислород для них токсичен: он убивает микроорганизмы или ограничивает их рост. Энергию строгие анаэробы получают маслянокислым

брожением. К строгим анаэробам относятся, например, некоторые кло-стридии (*C. botulinum*, *C. tetani*), бактериоиды.

Аэротолерантные микроорганизмы не используют кислород для получения энергии, но могут существовать в его атмосфере. К ним относятся молочнокислые бактерии, получающие энергию гетероферментативным молочнокислым брожением.

Факультативные анаэробы способны расти и размножаться как в присутствии, так и при отсутствии кислорода. Они обладают смешанным типом метаболизма. Процесс получения энергии у них может происходить кислородным дыханием в присутствии кислорода, а при его отсутствии переключаться на брожение. Для этих бактерий характерно наличие анаэробного нитратного дыхания.

Различное физиологическое отношение микроорганизмов к кислороду связано с наличием у них ферментных систем, позволяющих существовать в атмосфере кислорода. Следует отметить, что в окислительных процессах, протекающих в атмосфере кислорода, при окислении флавопротеидов образуются токсичные продукты: перекись водорода H_2O_2 и закисный радикал кислорода O_2^- — соединение, имеющее неспаренный электрон. Эти соединения вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот и окисление SH-групп белков.

Для нейтрализации токсичных форм кислорода микроорганизмы, способные существовать в его атмосфере, имеют защитные механизмы. У облигатных аэробов и факультативных анаэробов накоплению закисного радикала O_2^- препятствует фермент супероксиддисмутаза, расщепляющая закисный радикал на перекись водорода и молекулярный кислород. Перекись водорода у этих бактерий разлагается ферментом каталазой на воду и молекулярный кислород.

Аэротолерантные микроорганизмы не имеют супероксиддисмутазы, и ее функцию восполняет высокая концентрация ионов марганца, который, окисляясь под действием O_2^- , убирает тем самым супероксидный ион. Перекись водорода у этих микроорганизмов разрушается ферментом пероксидазой в катализируемых ею реакциях окисления органических веществ.

Строгие анаэробы не имеют ни каталазы, ни пероксидазы. Однако супероксиддисмутаза встречается у многих строгих анаэробов, и наличие этого фермента коррелирует с их устойчивостью к кислороду. Некоторые строгие анаэробы (роды *Bacteroides*, *Fusobacterium*) не выносят присутствия даже незначительного количества молекулярного кислорода, тогда как некоторые представители рода *Clostridium*

могут находиться в атмосфере кислорода. Для культивирования строгих анаэробов создаются условия, позволяющие удалять атмосферный кислород: использование специальных приборов, анаэроостатов и анаэробных боксов, добавление в питательные среды редуцирующих кислород веществ, например тиогликолята натрия, использование поглотителей кислорода.

Отношение к излучению

Важнейшим естественным источником излучения для Земли является солнечная радиация. Поверхности Земли достигают преимущественно волны длиной от 300 нм и более, поскольку более короткие волны задерживаются атмосферой. Свет в диапазоне от 300 до 1000 нм, приходящийся в основном на видимый свет, оказывает заметное влияние на жизнь различных прокариотов, включая бактерии — возбудители болезней человека. Излучение в этом диапазоне индуцирует в бактериальной клетке процессы фотореактивации, необходимые для поддержания постоянства состава ДНК и повышения выживаемости (световая репарация ДНК), а также синтез некоторых макромолекул. В медицине излучение используется для дезинфекции воздуха, различных поверхностей оборудования и материалов. Источником излучения в этом случае являются специальные лампы, получившие название бактерицидных. Бактерицидное действие этих ламп связано с действием коротковолнового излучения от 220 до 300 нм. При этом излучение с длиной волны около 220 нм вызывает ионизацию молекул кислорода с образованием озона O_3 . Действие коротковолнового излучения в бактериальных клетках приводит к повреждениям ДНК, сопровождающимся или появлением мутаций, или гибелью клеток, и к изменению и разрушению других органических макромолекул. Среди бактерий наиболее устойчивыми к действию солнечной радиации и обработке ультрафиолетовым светом искусственного происхождения являются их споры.

Радиоактивное излучение в естественных условиях преимущественно связано с излучением горных пород и сильно варьирует в различных географических точках, а также в городах и сельской местности. В настоящее время мало известно о роли подобной радиации в изменении свойств бактерий, актуальных для практической медицины. Искусственная радиационная обработка, используемая для лечения ряда заболеваний (прежде всего злокачественных новообразований), может изменять состав нормальной микрофлоры, что требует коррекции для профилактики различных осложнений.

3.1.10. Рост и размножение

Рост бактериальных клеток связан с синтезом и накоплением всех компонентов, входящих в ее состав, и увеличением размера, характерного для данного вида. В условиях, обеспечивающих рост микробов, происходит и процесс их деления. Для большинства бактерий характерно поперечное бинарное деление, приводящее к образованию двух дочерних клеток. У грамположительных бактерий при этом происходит синтез перегородки между делящимися клетками. Перегородка начинает формироваться на периферии и «движется» к центру клетки. Для грамотрицательных бактерий характерно первоначальное формирование перетяжки, отделяющей клетки. После ее образования окончательное разделение дочерних клеток сопровождается синтезом перегородки между ними.

Деление бактериальной клетки начинается спустя некоторое время после завершения цикла репликации хромосомы, которая у бактерий протекает по полуконсервативному механизму. Это означает, что каждая из двух нитей ДНК хромосомы служит матрицей для синтеза комплементарной дочерней цепи ДНК. В процессе репликации бактериальной хромосомы участвует более 20 ферментов. Перед репликацией цепи родительской молекулы матричной цепи ДНК должны быть разделены. В этом процессе участвуют фермент хеликаза, которая в энергопоглощающей реакции расплетает двойную спираль, и фермент топоизомеразы (гираза), которая предотвращает образование вторичных завитков. SSB-белок связывается с одноцепочечной ДНК, предотвращая повторное скручивание в двойную спираль. В результате образуется репликативная вилка (рис. 3.7). Синтез новых цепей ДНК осуществляется ферментом ДНК-полимеразой. ДНК-полимераза не способна инициировать новые цепи ДНК, а может присоединять комплементарные матрице нуклеотиды к свободному 3'-концу растущей цепи. Поэтому для осуществления реакции полимеризации нуклеотидов на матрице родительской цепи полимеразе требуется затравка, праймер (от англ. *primer* — запал). Праймер представляет собой короткую нуклеотидную цепочку РНК, комплементарную матричной цепи, со свободным 3'-концом. Достраивание осуществляется присоединением к свободной гидроксильной группе 3'-конца затравки нового нуклеотида. Расплетенные цепи ДНК всегда содержат на 5'-конце несколько рибонуклеотидов, то есть синтез ДНК начинается с синтеза РНК. РНК-затравку для синтеза ДНК образует специальный фермент ДНК-праймаза, способная инициировать синтез РНК по одноцепочечной ДНК матрицы при отсутствии

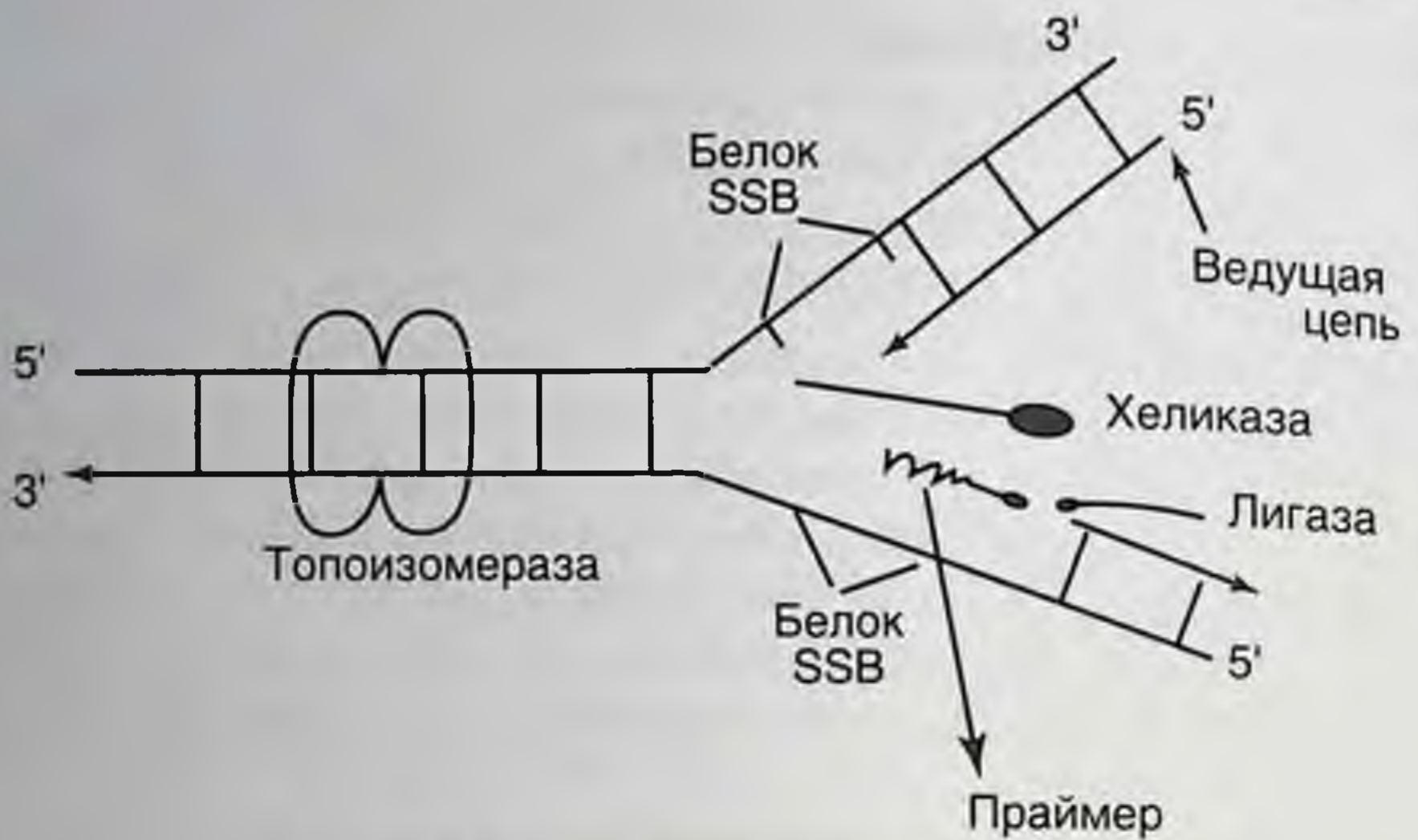


Рис. 3.7. Схема репликативной вилки

какой-либо затравки. После того как цепь ДНК начала синтезироваться, РНК-затравка удаляется, а удаляющиеся бреши застраиваются ДНК-полимеразой с высокой точностью. Сохранение высокой степени точности, необходимой при репликации, обеспечивается различными функциями ДНК-полимеразы. Кроме полимеразной активности она способна к проверке считывания. В ходе последней фермент проверяет, правильно ли осуществлено присоединение очередного нуклеотида. Если выявляется нарушение правила комплементарности, проявляется третья функция данного фермента — экзонуклеазная, и происходит отщепление неправильно присоединенного нуклеотида. После его удаления вновь осуществляется полимеразная реакция с последующей проверкой ее правильности. В целом в благоприятных условиях синтез ДНК в клетке значительно опережает скорость ее деления. В реальных условиях одна микробная клетка содержит от 2 до 10 копий хромосом. Показано, что многие бактерии без повреждения клетки выделяют избыток ДНК в окружающую среду. Этот процесс играет важную роль в обмене генетической информацией между бактериями.

Процесс репликации ДНК бактерии продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК. Репликация начинается в одной избранной области, называемой *origin* (от англ. *origin* — начало), имеющей определенную последовательность нуклеотидов. На *origin* могут возникать одна или две репликативные вилки. Последовательность нуклеотидов на *origin*-участке способствует необходимому для репликации ДНК

расплетанию двойной спирали и служит местом «посадки» на ДНК комплекса ферментов, участвующих в репликации. Правильное распределение вновь синтезированных нитей ДНК по дочерним клеткам достигается у бактерий за счет прикрепления ДНК к мембране. Пространственная организация участка прикрепления и зоны роста мембраны и клеточной стенки обеспечивает автоматическое растаскивание двух копий реплицированной ДНК по дочерним клеткам. Размножение бактерий бинарным делением приводит к росту числа бактериальных клеток в геометрической прогрессии.

При внесении бактерий в питательную среду они растут и размножаются до тех пор, пока содержание какого-нибудь из необходимых компонентов среды не достигает минимума, после чего рост и размножение прекращаются. Если на протяжении всего этого времени не прибавлять питательные вещества и не удалять конечные продукты обмена, то получаем *статическую бактериальную культуру*. Статическая (периодическая) культура бактерий ведет себя как многоклеточный организм с генетическим ограничением роста. Если построить график, по оси абсцисс которого отложить время, а по оси ординат — число клеток, то получим кривую, описывающую зависимость числа образующихся клеток от времени размножения, которая называется кривой роста (рис. 3.8).

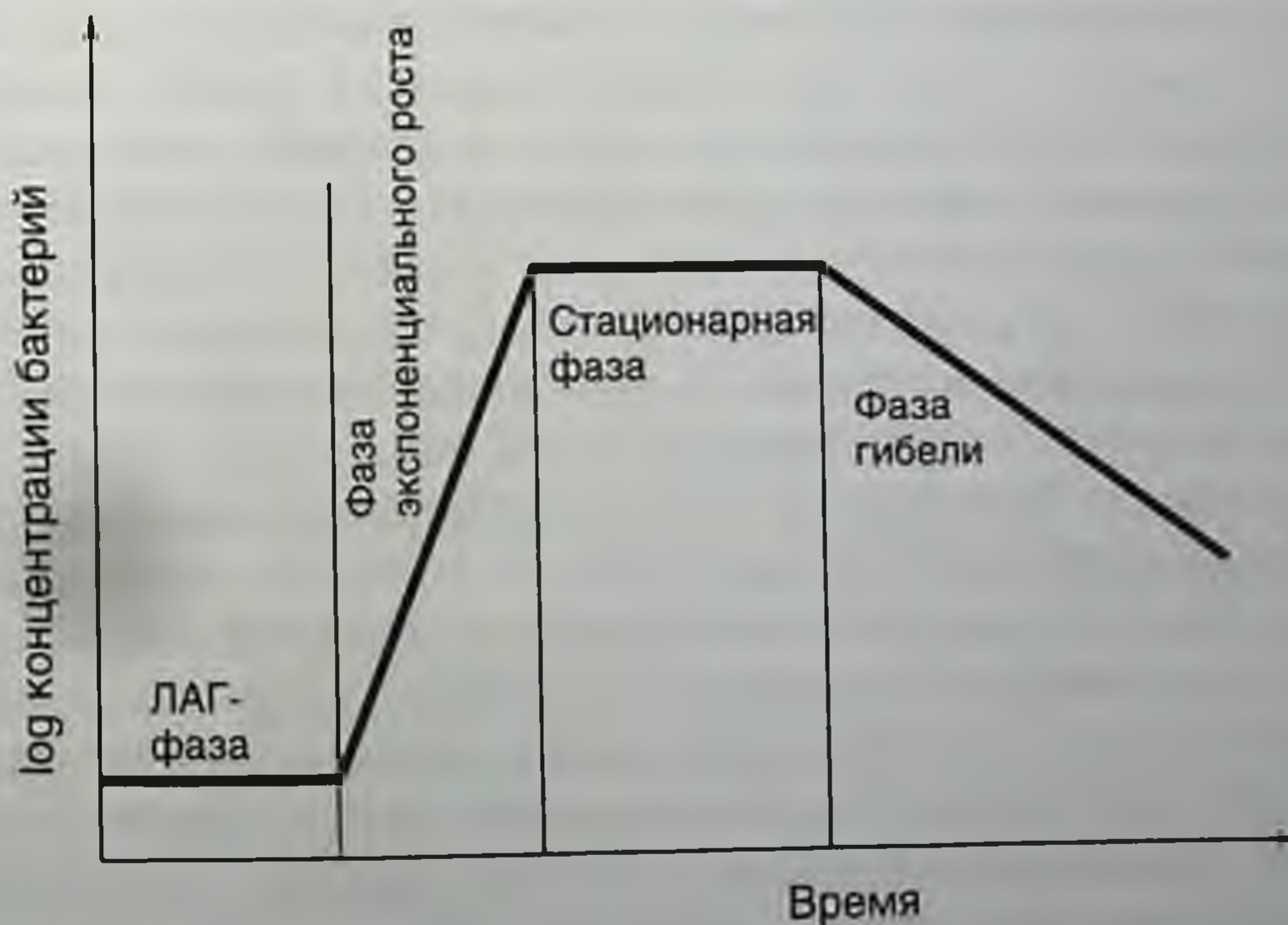


Рис. 3.8. Кривая бактериального роста

На кривой роста бактерий в жидкой питательной среде можно различить несколько фаз, сменяющих друг друга в определенной последовательности.

- Начальная лаг-фаза (от англ. *lag* — отставать) охватывает промежуток времени между инокуляцией (посевом бактерий) и началом размножения. Ее продолжительность в среднем 2–5 ч и зависит от состава питательной среды и возраста засеваемой культуры. Во время лаг-фазы происходит адаптация бактериальных клеток к новым условиям культивирования, идет синтез индуцибельных ферментов.
- Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется постоянной максимальной скоростью деления клеток. Эта скорость зависит от вида бактерий и питательной среды. Время удвоения клеток называется *временем генерации*, которое варьирует от вида бактериальной культуры: у бактерий рода *Pseudomonas* оно равняется 14 мин, а у *Mycobacterium* — 24 ч. Величина клеток и содержание белка в них во время экспоненциальной фазы остаются постоянными. Бактериальная культура в этой фазе состоит из стандартных клеток.
- Стационарная фаза наступает тогда, когда число клеток перестает увеличиваться. Поскольку скорость роста зависит от концентрации питательных веществ, то при уменьшении содержания последних в питательной среде уменьшается и скорость роста. Снижение скорости роста происходит также из-за большой плотности бактериальных клеток, снижения парциального давления кислорода, накопления токсичных продуктов обмена. Продолжительность стационарной фазы составляет несколько часов и зависит от вида бактерий и особенностей их культивирования.
- Фаза отмирания наступает вследствие накопления кислых продуктов обмена или в результате аутолиза под влиянием собственных ферментов. Продолжительность этой фазы колеблется от десятка часов до нескольких недель.

Продолжительность жизни бактерий мало изучена. Известно, что мезофилы на питательной среде при комнатной температуре в условиях, когда размножение бактерий минимально, могут сохранять свою жизнеспособность в течение 1–2 лет. Очевидно, что биологическая смерть бактерий в большей степени связана с ограничением числа возможных делений. Считается, что большинство бактерий могут делиться около 50 раз, после чего клетка погибает. Механизмы гибели остаются не до

конца изученными, но показано существование у бактерий генов, изменение активности которых специфически направлено на самоуничтожение клеток. Постоянное нахождение бактериальной популяции в логарифмической фазе роста наблюдается в непрерывной культуре, что достигается постепенным дозированием поступления питательных веществ, контролем плотности бактериальной суспензии и удалением метаболитов. Непрерывные бактериальные культуры используются в биотехнологических процессах.

Накопление бактериальной массы (числа бактерий) при культивировании зависит от многих факторов (качество питательных сред, посевная доза, температура выращивания, pH , наличие активирующих рост добавок и др.).

На жидких питательных средах рост и размножение бактерий проявляются в виде диффузного помутнения, образования придонного осадка или поверхностной пленки. Особенностью размножения бактерий роста *Leptospira* на жидких средах является отсутствие видимых проявлений роста.

На плотных питательных средах бактерии образуют скопление клеток — колонии, которые принято считать потомком одной клетки. Колонии различаются формой, размерами, поверхностью, прозрачностью, консистенцией и окраской. Колонии с гладкой блестящей поверхностью принято называть колониями в S-форме (от англ. *smooth* — гладкий). Колонии с матовой шероховатой поверхностью называют R-формами (от англ. *rough* — шероховатый).

Окраска колоний определяется способностью бактерий синтезировать пигменты. Пигменты различаются по цвету, химическому составу и растворимости. Пигменты предохраняют бактериальную клетку от ультрафиолетовых лучей, обезвреживают токсичные кислородные радикалы, обладают антибиотическими свойствами, принимают участие в реакциях, сопутствующих фотосинтезу в фототрофных бактериях.

Вид, форма, цвет и другие особенности колоний, а также характер роста на плотных питательных средах определяются как культуральные свойства бактерий и учитываются при их идентификации.

Помимо бинарного деления, некоторые представители царства *Procaryotae* имеют иные способы размножения.

Актиномицеты могут размножаться путем фрагментации гифов. Представители семейства *Streptomycetaceae* размножаются спорами.

Микоплазмы являются полиморфными бактериями, что обусловлено особенностями их размножения. Помимо поперечного деления,

если оно происходит синхронно с синтезом ДНК, микоплазмы могут размножаться почкованием. В этом случае основной морфологической репродуцирующей единицей являются элементарные тельца сферической или овоидной формы, размножающиеся фрагментацией и почкованием.

Хламидии не обладают способностью к бинарному делению. Они проходят через цикл развития, который предусматривает существование двух форм: внеклеточных инфекционных, малых размеров *элементарных телец*, не обладающих способностью к бинарному делению, и внутриклеточного, метаболически активного, крупных размеров *ретикулярного тельца*, способного к бинарному делению. В результате бинарного деления ретикулярного тельца формируются дочерние элементарные тельца, которые выделяются из клетки.

Некоторые спирохеты, например *Treponema pallidum*, способны образовывать в неблагоприятных условиях цисты, которые, распадаясь на зерна, дают потомство новым бактериальным клеткам.

Некультивируемые формы бактерий. Некоторые неспорообразующие бактерии способны переживать неблагоприятные для размножения условия окружающей среды, переходя в некультивируемое состояние. В этом состоянии бактериальные клетки сохраняют свою метаболическую активность, но не способны к непрерывному клеточному делению, необходимому для роста на жидких и плотных питательных средах. При смене условий существования, в частности при попадании в организм человека или животных, клетки вновь приобретают способность к размножению и сохраняют свой патогенный потенциал. Переход в некультивируемое (покоящееся) состояние обеспечивает сохранение патогенных бактерий в межэпидемические и межэпизоотические периоды. При переходе в некультивируемую форму бактериальные клетки уменьшаются в размерах, приобретают сферическую форму, меняют вязкость цитоплазматической мембраны. У них сохраняются транспорт электронов по дыхательной цепи и невысокий уровень метаболической активности. На переход в некультивируемую форму влияют температура, концентрация солей, свет, парциальное давление кислорода, содержание питательных веществ, а также метаболиты водорослей, находящиеся в биоценозе с бактериями. Выявить наличие бактерий, находящихся в некультивируемой форме, можно с помощью полимеразной цепной реакции (см. раздел 5.6.3) или красителей, меняющих окраску в окисленной и восстановленной формах. Возврат способности к размножению и росту находящихся в покоящейся форме клеток могут

вызвать естественные факторы: простейшие, обитатели почв и водоемов, фитогормоны, выделяемые корневыми волосками растений.

3.1.11. Условия культивирования бактерий

Для культивирования бактерий необходимо соблюдать ряд условий.

- Наличие полноценной питательной среды. Каждая питательная среда независимо от сложности состава и цели применения (см. раздел 3.1) должна обладать водной основой, органическим источником углерода и энергии, определенным pH , осмотическим давлением.
- Температура культивирования. Температура влияет на скорость размножения. Для поддержания требуемой температуры используют специальные приборы — термостаты.
- Атмосфера культивирования. Для роста и размножения строгих аэробов необходим кислород. Аэробы хорошо растут на поверхности агара на чашках Петри или в тонком верхнем слое жидкой среды. Для обеспечения роста и размножения строгих аэробов в глубинных слоях жидкой среды необходимо диффузное распределение кислорода по всему объему питательной среды. Это достигается непрерывным перемешиванием или встряхиванием питательной среды, то есть аэрированием. Аэрирование осуществляется на специальных аппаратах — встряхивателях.

Для культивирования *факультативных анаэробов* используют те же методы, так как в присутствии кислорода у них преобладает оксидативный метаболизм над ферментацией как наиболее энергетически выгодный.

Микроаэрофилы размножаются при пониженном парциальном давлении кислорода. Этого можно достичь повышением парциального давления CO_2 в атмосфере культивирования до 1–5% против 0,03% CO_2 в атмосфере воздуха. Для этих же целей используют специальные CO_2 -инкубаторы или же посеvy помещают в эксикаторы, в которых устанавливают горящую свечу.

Облигатные анаэробы для своего роста и размножения требуют исключения доступа кислорода воздуха. Это достигается следующими мерами:

- добавлением к питательным средам редуцирующих кислород веществ: тиогликолевой и аскорбиновой кислот, цистеина, сульфидов;

- регенерацией от кислорода воздуха жидких питательных сред путем их кипячения с последующим плотным закупориванием сосудов, в которые налиты среды, резиновыми пробками;
- использованием поглотителей кислорода, щелочного пирогаллола и других средств с помещением их в герметически закрываемые емкости — газ-паки. Этот метод используется для культивирования аэротолерантных бактерий;
- механическим удалением кислорода воздуха с последующим заполнением емкости инертным газом (для этих целей используют анаэроостаты и анаэробные боксы).

Для культивирования хемо- и фотоавтотрофных бактерий создается атмосфера, насыщенная CO_2 .

- Время культивирования зависит от времени генерации. Большинство бактерий культивируют для получения видимого роста в течение 18–48 ч. Для культивирования возбудителя коклюша требуется 5 сут, для культивирования *M. tuberculosis* — 3–4 нед.
- Освещение. Для выращивания фототрофных микроорганизмов необходим свет. Некоторые условно-патогенные микобактерии в зависимости от освещенности образуют пигмент, что используется при их идентификации. Культивирование абсолютных внутриклеточных паразитов, бактерий, относящихся к родам *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Coxiella*, *Chlamydia*, осуществляют на культурах клеток или в организме животных и членистоногих, а также в куриных эмбрионах (за исключением эрлихий). Куриные эмбрионы используют также для культивирования бактерий, обладающих высоким уровнем гетеротрофности, например родов *Borrelia*, *Legionella*.

3.1.12. Поведение бактерий в бактериальных сообществах

Популяция бактерий, будь то в окружающей среде или в организме хозяина, представляет собой не совокупность отдельных клеток, а сообщество, живущее по социальным законам, члены которого общаются между собой посредством понятного им языка. В настоящее время стало известно явление, получившее название *quorum sensing*, или чувство кворума.

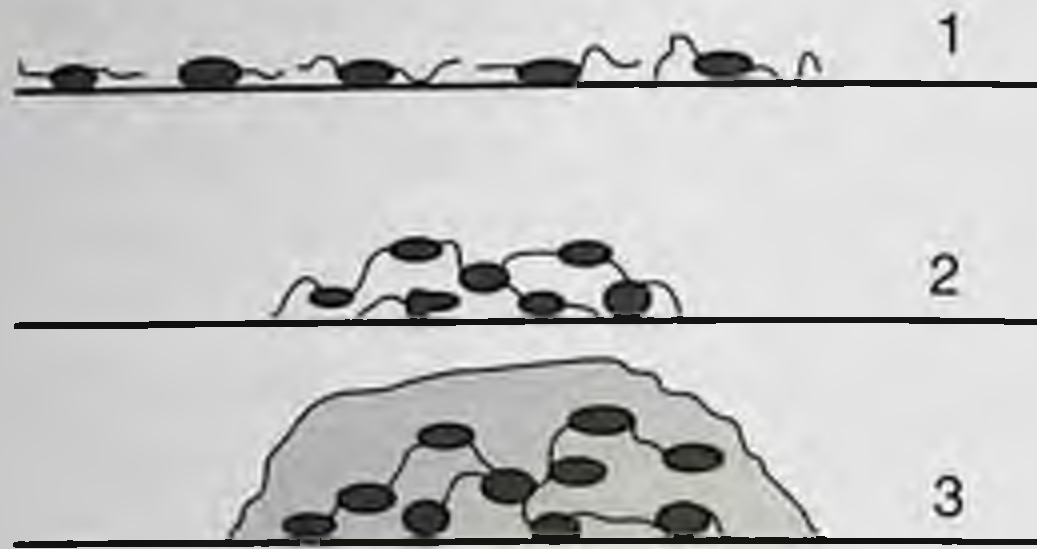
Quorum sensing — это межклеточный механизм бактериального общения, предназначенный для контроля экспрессии генов в зависимости от плотности бактериальной популяции.

Регуляторные системы *quorum sensing* обычно состоят из двух компонентов: небольшой диффундирующей сигнальной молекулы и транскрипционного активаторного белка. В грамотрицательных бактериях сигнальные молекулы называются «аутоиндукторы». По типу *quorum sensing* регулируется широкий ряд физиологических процессов, включая биoluminesценцию, синтез антибиотиков, детерминант вирулентности, перенос конъюгативных плазмид (см. раздел 5). Такой тип межклеточной коммуникации позволяет индивидуальным бактериям следить за плотностью собственной популяции в окружающей среде, будь то внешняя среда или организм хозяина, и регулировать экспрессию специфических генов. Патогенным бактериям, которые вызывают развитие заболевания, необходимо достичь критической плотности для эффективного распространения и заселения соответствующих ниш в организме хозяина. Патогенные бактерии чувствуют необходимость экспрессии детерминант вирулентности при достижении определенной концентрации.

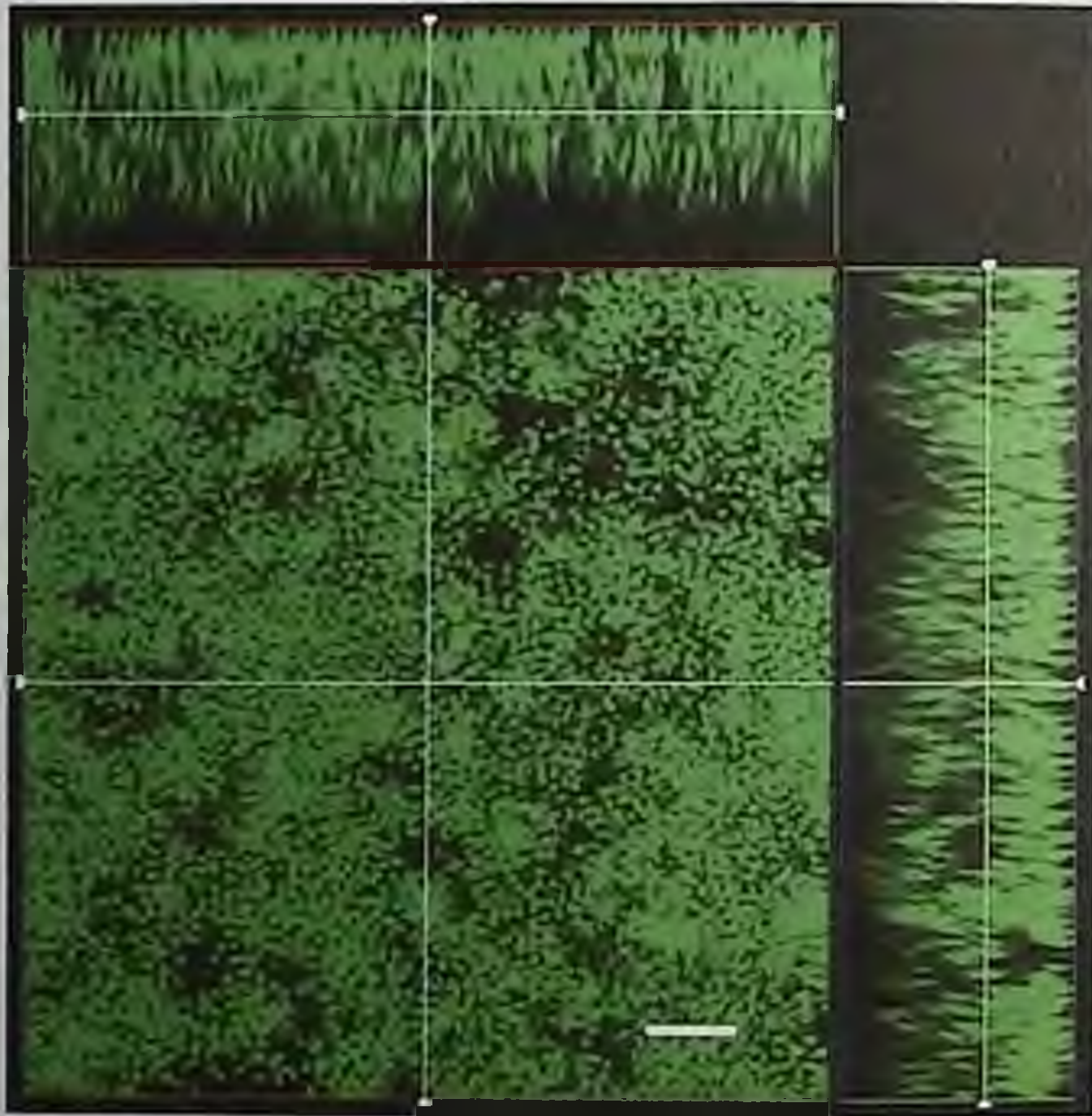
Социальным поведением патогенных бактерий объясняется такое важное для медицины явление, как образование *биопленок*. Биопленки представляют высокоорганизованные сообщества бактерий, необратимо прикрепленных к субстрату и друг к другу и защищенных продуцируемым этими клетками внеклеточным полимерным матриксом. Они снабжены каналами для водоснабжения, распределения питательных веществ между членами сообщества и удаления отходов жизнедеятельности. Биопленки могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоят из активно функционирующих и покоящихся (некультивируемых) клеток. Образование биопленки является одной из основных стратегий выживания бактерий в окружающей среде, поскольку в составе биопленки они защищены от антибактериальных препаратов, включая антибиотики, дезинфектанты, бактериофаги. Многие хронические инфекции, возникновение которых связано с использованием медицинского имплантированного оборудования — катетеров, протезов, искусственных клапанов сердца, обусловлены способностью бактерий расти в виде биопленок на поверхности этих устройств.

Образование биопленки начинается с прикрепления к твердой поверхности отдельной бактериальной клетки, которая выделяет полисахариды. Делящиеся затем клетки образуют микроколонию уже внутри полисахаридного матрикса. Эти микроколонии сливаются или включают в свой состав бактерии этого или другого вида, и процесс закан-

чивается образованием биопленки. В процессе образования биопленки важная роль принадлежит полярно расположенным пиллям IV типа (рис. 3.9).



а



б

Рис. 3.9. Образование биопленки: а — этапы образования биопленки: 1 — прикрепление к твердой поверхности отдельных бактериальных клеток; 2 — агрегация клеток с участием пилей IV типа; 3 — синтез экзополисахарида; б — микрофотография. Биопленка, образованная *B. cereus* на стекле (представлена С.А. Ермолаевой)

3.2. ФИЗИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

Вирусы растут только внутриклеточно, то есть являются облигатными внутриклеточными паразитами. В клетке они могут находиться в различных состояниях.

Нарушения, вызываемые вирусами, весьма разнообразны: от продуктивной инфекции с образованием вирусного потомства и гибелью клетки до продолжительного взаимодействия вируса с клеткой в виде латентной инфекции или злокачественной трансформации клетки. Инфицирование клетки вирусом может иметь следующие последствия.

- Разрушение клетки (**некроз**) в результате цитотоксической инфекции, то есть репродукция вируса приводит к цитотоксическому действию (в культуре клеток происходит цитопатический эффект — клетки округляются, отделяются от соседних клеток, образуются многоядерные гигантские клетки, вакуоли и включения).
- Разрушение клетки (**апоптоз**) в результате инициации вирусом запрограммированной клеточной гибели, при этом вирусный репликативный цикл часто прерывается.
- Разрушение клетки в итоге не самим вирусом, а иммунными реакциями организма.
- Вирус находится внутри клетки, но не разрушает ее (латентная инфекция).
- Вирус трансформирует клетку организма в раковую клетку.

Хорошо изучены три основных типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интегративный.

1. *Продуктивный тип* взаимодействия завершается воспроизводством вирусного потомства — многочисленных вирионов и гибелью зараженных клеток (*цитотоксическое действие*). Некоторые вирусы выходят из клеток, не разрушая их (*нецитотоксическое действие*).
2. *Abortивный тип* взаимодействия не завершается образованием новых вирионов, поскольку инфекционный процесс в клетке прерывается на одном из этапов.
3. *Интегративный тип* взаимодействия, или вирогенеза, характеризуется встраиванием (интеграцией), вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместной репликацией.

3.2.1. Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой

Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой, то есть *репродукция* вируса (от лат. *re* — повторение, *productio* — производство), проходит несколько стадий:

- 1) адсорбция вириона на клеточной мембране;
- 2) проникновение вириона в клетку, «раздевание» и высвобождение вирусного генома (депротеинизация вируса);
- 3) синтез вирусных компонентов;
- 4) сборка реплицированной нуклеиновой кислоты и новых капсидных белков;
- 5) выход вирусного потомства из клетки.

Адсорбция вириона, то есть его прикрепление к клеточной мембране, — первая стадия репродукции вирусов. Она происходит в результате взаимодействия поверхностных молекул (белковых лигандов) вируса с мембранными рецепторами клеток вирусов. Белки поверхности вирусов, например гликопротеины липопротеиновой оболочки, узнающие специфические клеточные рецепторы и взаимодействующие с ними, называются *прикрепительными* белками.

Лиганды вирусов и специфические рецепторы клеток имеют различную природу. Так, гемагглютининовые шипы вируса гриппа связываются с сиаловой кислотой в составе гликопротеинов и гликолипидов (ганглиозидов) клеток дыхательных путей. Гликопротеины вируса иммунодефицита человека взаимодействуют с CD4-молекулами и хемокиновыми рецепторами Т-хелперов, моноцитов и дендритных клеток. Капсидные белки вируса полиомиелита связываются с CD155-молекулой, а капсидные белки риновирусов — с *ICAM* (молекулой адгезии) клеток. На клетке находятся десятки тысяч специфических рецепторов, поэтому на ней могут адсорбироваться десятки и сотни вирионов, но проникают в клетку только определенные вирионы или их содержимое.

В основе избирательности поражения вирусами определенных клеток, тканей и органов (так называемого *тропизма*) лежат специфичность рецепторов поражаемой клетки и возможность развития в ней репродуктивного цикла вируса (пермиссивные условия клетки). Например, вирусы, репродуцирующиеся преимущественно в клетках печени, называются гепатотропными, в нервных клетках — нейротропными, в иммунокомпетентных клетках — иммунотропными и т.д.

Проникновение вирусов в клетку возможно в результате рецептор-зависимого эндоцитоза или слияния оболочки вируса с клеточной

мембраной. Возможно также сочетание этих механизмов. Рецепторзависимый эндоцитоз происходит в результате захватывания и поглощения вириона клеткой: клеточная мембрана с прикрепленным вирионом втягиваются с образованием эндосомы (внутриклеточной вакуоли). Эндоцитоз вирусов осуществляется с помощью везикул, покрытых клатрином («ямки, окаймленные клатрином»). Содержимое эндосомы закисляется, что приводит к слиянию липопротеиновой оболочки сложного вируса с мембраной эндосомы и к выходу вирусного нуклеокапсида в цитозоль клетки. Эндосомы объединяются с лизосомами, которые разрушают оставшиеся вирусные компоненты. Пенетрация компонентов вируса в цитозоль обычно происходит в ранних или поздних эндосомах при уменьшенном значении pH .

Стали известны новые клатриннезависимые, альтернативные пути соединения вируса с эндосомами. Одним из них может быть макропиноцитоз с образованием крупной вакуоли, окруженной плазматической мембраной, наполненной в основном жидкостью. Другим путем попадания вируса может быть вовлечение эндоплазматического ретикулума. Этот путь начинается с формирования различных везикул (кавеолярный эндоцитоз). Вируснесущие везикулы, сформированные в плазматической мембране, маленькие (диаметр около 70 нм). В результате проникновения вируса в цитозоль может происходить на уровне плазматической мембраны, эндосомы, кальвеосомы и эндоплазматического ретикулума.

Слияние вириона с клеточной мембраной характерно только для некоторых оболочечных вирусов (герпесвирусов, парамиксовирусов, ретровирусов), в составе которых имеются белки слияния. В результате взаимодействия вирусного белка слияния с липидами клеточной мембраны вирусная липопротеиновая оболочка интегрирует с клеточной мембраной, а внутренний компонент вируса попадает в цитозоль клетки.

Существует три варианта проникновения безоболочечных вирусов в клетку: мембранный прокол (вирион образует пору в мембране, через которую геном попадает в цитозоль, а капсид в него не попадает; перфорация (капсид переносится через мембрану без основного лизиса мембраны); лизис (вирионы индуцируют поломку мембраны цитоплазматических органелл, что способствует проникновению вируса и его компонентов в цитозоль). Выход безоболочечных (простых) вирусов из эндосомы в цитозоль остается малоизученным.

Попав в клетку, вирусы лишаются многих белков («раздевание», или депротенинизация вирусов). В результате депротенинизации удаляются

поверхностные структуры вируса и высвобождается его внутренний компонент, способный вызывать инфекционный процесс. Первые этапы «раздевания» вируса начинаются в процессе его проникновения в клетку путем слияния вирусных и клеточных мембран или же при выходе вируса из эндосомы в цитозоль. Последующие этапы «раздевания» вируса тесно взаимосвязаны с их внутриклеточным транспортом к местам депротенинизации. Для разных вирусов существуют свои специализированные участки «раздевания» в клетке: для пикорнавирусов — в цитоплазме с участием лизосом, аппарата Гольджи, для герпесвирусов — околядерное пространство или поры ядерной мембраны, для аденовирусов — сначала структуры цитоплазмы, а затем ядро клетки. Конечными продуктами «раздевания» могут быть нуклеиновая кислота, нуклеопротеид (нуклеокапсид) или сердцевина вириона. Так, конечным продуктом «раздевания» пикорнавирусов является нуклеиновая кислота, ковалентно связанная с одним из внутренних белков. А у многих оболочечных РНК-содержащих вирусов конечными продуктами «раздевания» могут быть нуклеокапсиды или сердцевинки, которые не только не препятствуют экспрессии вирусного генома, а, более того, защищают его от клеточных протеаз и регулируют последующие биосинтетические процессы.

Следующей стадией репродукции является синтез белков и нуклеиновых кислот вируса, который разобщен во времени и пространстве.

Синтез вирусных белков. В вирусинфицированной клетке синтезируются две группы белков: неструктурные белки, обслуживающие разные этапы репродукции вируса; структурные белки, которые входят в состав вириона (нуклеопротеины, связанные с геномом вируса, капсидные и оболочечные белки).

К *неструктурным белкам* относятся: ферменты синтеза нуклеиновых кислот (РНК- или ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома; белки-регуляторы; предшественники вирусных белков, отличающиеся своей нестабильностью в результате быстрого нарезания на структурные белки; ферменты, модифицирующие вирусные белки, например протеиназы и протеинкиназы.

Синтез белков в клетке осуществляется в соответствии с хорошо известными процессами *транскрипции* путем «переписывания» генетической информации с нуклеиновой кислоты в нуклеотидную последовательность иРНК или мРНК и *трансляции* — считывания иРНК на рибосомах с образованием белков. Передача наследственной информации в отношении синтеза иРНК у разных групп вирусов неодинакова.

- *ДНК-содержащие вирусы* имеют ДНК-геном, транскрибирующийся в ядре клетки с помощью клеточной РНК-полимеразы, в результате чего образуется иРНК, которая транслируется с образованием белка вируса. Особенностью этого процесса является синтез иРНК в ядре с помощью клеточной РНК-полимеразы (у аденовирусов, папилломавирусов, герпесвирусов) или в цитоплазме с помощью собственной РНК-полимеразы (у поксвирусов). Таким образом, синтез белка реализуется по схеме: геномная ДНК вируса — транскрипция иРНК — трансляция белка вируса.
- *Плюс-нитевые РНК-содержащие вирусы* (пикорнавирусы, флавивирусы, тогавирусы) имеют геном, выполняющий функцию иРНК; он распознается и транслируется рибосомами. Белки этих вирусов синтезируются без процесса транскрипции по схеме: геномная РНК вируса — трансляция белка вируса.
- *Минус-нитевые РНК-содержащие вирусы* (минус-однонитевые — ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы и двунитевые — реовирусы) имеют геном, выполняющий роль матрицы, с которой транскрибируется иРНК, при участии РНК-полимеразы, связанной с нуклеиновой кислотой вируса. Синтез белка у них происходит по схеме: геномная РНК вируса — транскрипция иРНК — трансляция белка вируса.
- *Ретровирусы* (ВИЧ, онкогенные ретровирусы) имеют диплоидный геном, состоящий из двух идентичных молекул РНК. В состав ретровируса включена вирионная обратная транскриптаза, или ревертаза, с помощью которой осуществляется процесс обратной транскрипции, то есть на матрице геномной РНК синтезируется комплементарная однонитевая ДНК. Комплементарная нить ДНК копируется с образованием двунитевой комплементарной ДНК, которая интегрирует в клеточный геном и в его составе транскрибируется в иРНК с помощью клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Синтез белков ретровирусов осуществляется по схеме: геномная РНК вируса — комплементарная ДНК-транскрипция иРНК-трансляция белка вируса.

Репликация вирусных геномов, то есть накопление копий вирусных геномов, которые используются при сборке вирионов в клетке, отличается у вирусов, имеющих двунитевую ДНК, однонитевую ДНК, плюс-однонитевую РНК, минус-однонитевую РНК, двунитевую РНК и идентичные плюс-нитевые РНК (ретровирусы).

- *Двунитевые ДНК-вирусы.* К ним относятся вирусы, содержащие двунитевую ДНК в линейной (герпесвирусы, аденовирусы и поксвирусы) или кольцевой (папилломавирусы и полиомавирусы) форме. В репликации вирусных геномов (см. табл. 2.2) участвуют вирусные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы (у аденовирусов, герпесвирусов и поксвирусов) или клеточные ДНК-зависимые ДНК-полимеразы (у папилломавирусов, полиомавирусов и анелловвирусов). Двунитевые вирусные ДНК реплицируются обычным полуконсервативным механизмом: после расплетения нитей ДНК к ним комплементарно достраиваются новые нити. Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити. У всех вирусов, кроме поксвирусов, транскрипция вирусного генома происходит в ядре. Своеобразный механизм репродукции с включением процесса обратной транскрипции имеют гепаднавирусы (см. ниже).
- *Однонитевые ДНК-вирусы* представлены парвовирусами, которые используют клеточную ДНК-полимеразу для создания двунитевого вирусного генома, так называемой репликативной формы последнего. При этом на исходной вирусной ДНК (плюс-нить) комплементарно синтезируется минус-нить ДНК, служащая матрицей для синтеза плюс-нити ДНК нового вириона. Параллельно синтезируется иРНК, происходит трансляция вирусных пептидов.
- *Плюс-однонитевые РНК-вирусы* включают большую группу вирусов (пикорнавирусы, флавивирусы, тогавирусы), у которых геномная плюс-нить РНК выполняет функцию иРНК — матрицы для синтеза белка. На ее основе синтезируется полипротеин, который расщепляется на фрагменты: вирусные РНК-зависимую РНК-полимеразу, протеазы и капсидные белки. Вирусная РНК-полимераза транскрибирует геномную плюс-нить РНК в минус-нить РНК, на матрице которой синтезируется геномная плюс-нить РНК. Вирионы формируются в цитоплазме.
- *Минус-однонитевые РНК-вирусы* (аренавирусы, борнавирусы, рабдовирусы, парамиксовирусы, ортомиксовирусы, филовирусы) имеют вирионную РНК-зависимую РНК-полимеразу. Проникшая в клетку геномная минус-нить РНК трансформируется вирионной РНК-зависимой РНК-полимеразой в неполные и полные плюс-нити РНК. Неполные копии выполняют роль иРНК для синтеза вирусных белков. Полные копии являются матрицей

(промежуточная стадия) для синтеза минус-нитей геномной РНК потомства. Вирионы формируются в цитоплазме.

- *Двунитевые РНК-вирусы.* Репликация этих вирусов (реовирусы и ротавирусы) сходна с репликацией минус-однонитевых РНК-вирусов. Образовавшиеся в процессе транскрипции плюс-нити РНК не только функционируют как иРНК, но и участвуют в репликации: они являются матрицами для синтеза минус-нитей РНК. Последние в комплексе с плюс-нитями РНК образуют геномные двунитевые РНК вирионов. Репликация вирусных нуклеиновых кислот этих вирусов происходит в цитоплазме клеток.
- *Вирусы с обратной транскрипцией.* К обратнотранскрибирующимся вирусам относятся представители семейств *Retroviridae* и *Hepadnaviridae*. Ретровирусы, в частности ВИЧ, являются плюс-нитевыми диплоидными РНК-содержащими вирусами. Вирионная обратная транскриптаза ретровирусов синтезирует (на матрице РНК вируса) минус-нить ДНК, с которой копируется плюс-нить ДНК с образованием двойной нити ДНК, замкнутой в кольцо. Далее двойная нить ДНК интегрирует с хромосомой клетки, образуя провирус. В результате транскрипции одной из нитей интегрированной ДНК при участии клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы образуются вирионные РНК.

Формирование вирионов. Белки и нуклеиновые кислоты вируса синтезируются в разных частях клетки, вследствие чего этот способ репродукции вирусов получил название «дизъюнктивный» (от лат. *disjunctus* — разобщенный). Синтезированные компоненты вириона транспортируются в различные участки ядра или цитоплазмы клетки — места сборки вируса, которая происходит с участием гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия. Формирование вирионов — многоступенчатый процесс с образованием промежуточных форм, отличающихся от зрелых вирионов по составу полипептидов. Сборка простых вирусов заключается во взаимодействии вирусных нуклеиновых кислот с капсидными белками и образовании нуклеокапсидов. У сложных вирусов сначала формируются нуклеокапсиды, которые окружаются модифицированной мембраной клетки (будущей липопротеиновой оболочкой вируса). В процессе сборки вирионов в их структуры включаются отдельные липиды и углеводы клетки-хозяина. Так, формирование вирионов в ядре клетки происходит с участием мембраны ядра, а формирование вирионов в цитоплазме — с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической

мембраны, куда встраиваются гликопротеины и другие белки оболочки вируса. У ряда сложных минус-нитевых РНК-вирусов (ортомиксовирусов, парамиксовирусов) в сборку вовлекается матриксный белок, расположенный под модифицированной клеточной мембраной — будущей оболочкой вириона. Обладая гидрофобными свойствами, он выполняет роль посредника между нуклеокапсидом и липопротеиновой оболочкой вируса.

Выход вирусов из клетки. Продолжительность цикла вирусной репродукции колеблется от 6–8 ч (вирус гриппа, пикорнавирусы) до более чем 40 ч (некоторые герпесвирусы). Вирусное потомство составляет 10–1000 зрелых вирионов и в несколько раз большее количество дефектных вирионов. Репродукция вирусов заканчивается выходом их из клетки, который происходит взрывным путем, почкованием, или экзоцитозом.

Взрывной путь характерен для простых (безоболочечных) вирусов: из погибающей клетки одновременно выходит большое количество вирионов.

Почкование, или *экзоцитоз*, присуще сложным вирусам, имеющим липопротеиновую оболочку, которая является производной от клеточных мембран. Сначала образовавшийся нуклеокапсид, или сердцевина вириона, транспортируется к участкам клеточных мембран, в которые уже встроены вирусспецифические белки, после чего начинается выпячивание этих участков. Сформировавшаяся почка отделяется от клетки в виде сложного вируса, а клетка может длительно оставаться жизнеспособной, продуцируя вирусное потомство. Вирусы, формирующиеся в ядре клетки (например, герпесвирусы), почкуются в перинуклеарное пространство через модифицированную ядерную мембрану, приобретая таким образом липопротеиновую оболочку. Затем они транспортируются в составе цитоплазматических везикул на поверхность клетки.

Почкование вирусов, формирующихся в цитоплазме, может происходить либо через плазматическую мембрану (например, парамиксовирусы, тогавирусы), либо через мембраны эндоплазматической сети с последующим их выходом на поверхность клетки (буньявирусы).

3.2.2. Программируемая клеточная смерть (апоптоз)

Вирусы могут вызывать апоптоз инфицированной клетки, предотвращая распространение инфекционного процесса на другие клетки. С другой стороны, многие вирусы имеют механизмы, предотвраща-

ющие апоптоз клетки. Так, некоторые ДНК-вирусы кодируют белки, сходные с клеточными *Bcl-2*-белками, контролирующими апоптоз в результате усиления клеточной пролиферации.

3.2.3. Непродуктивные инфекции

Иногда вирус заражает клетку, но его репродукция не завершается. Если вирусный геном персистирует в клетке, то говорят о латентной инфекции.

Латентная инфекция поддерживается в инфицированной клетке в виде последовательности вирусной ДНК, интегрированной в геном клетки, или в виде множественных копий ковалентно замкнутой циркулярной ДНК вируса. Например, герпесвирусы обычно вызывают латентные инфекции, при которых вирусный геном поддерживается как циркулярная эписома в ядре, экспрессируя только несколько вирусных генов и не образуя инфекционного вируса. В эукариотической клетке вирусная ДНК связана с гистонами этой клетки, которые играют стабилизирующую роль в латенции.

Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой не завершается образованием вирусного потомства. Причины развития абортивного типа разнообразны:

- заражение чувствительных клеток дефектными вирусами или дефектными вирионами;
- заражение стандартным вирусом генетически резистентных к нему клеток;
- заражение стандартным вирусом чувствительных клеток в непериодических (неразрешающих) условиях.

Различают дефектные вирусы и дефектные вирионы.

- *Дефектные вирусы* существуют как самостоятельные виды, которые репродуцируются лишь при наличии вируса-помощника (например, вирус гепатита D репродуцируется только в присутствии вируса гепатита В).
- *Дефектные вирионы* обычно лишены части генетического материала и могут накапливаться в популяции многих вирусов при множественном заражении клеток. Имеются дефектные интерферирующие частицы, которые интерферируют с репродукцией стандартного вируса и подавляют воспроизводство вирусного потомства. Таким образом, дефектные интерферирующие частицы могут защищать организм от болезнетворного вируса.

Абортивный тип взаимодействия чаще наблюдается при заражении непермиссивных (нечувствительных) клеток стандартным вирусом. Механизм генетически обусловленной резистентности клеток к вирусам широко варьирует. Он может быть связан: с отсутствием на плазматической мембране специфических рецепторов для вирусов; неспособностью данного вида клеток инициировать трансляцию вирусной иРНК; отсутствием специфических протеаз или нуклеаз, необходимых для синтеза вирусных макромолекул, и т.д. Абортивный тип взаимодействия может также возникать при изменении условий, в которых происходит репродукция вирусов: повышение температуры организма, изменение pH в очаге воспаления, введение в организм противовирусных препаратов и др. Некоторые абортивные инфекции могут приводить к уничтожению клетки-хозяина. При устранении неразрешающих условий абортивный тип переходит в продуктивный тип взаимодействия вирусов с клеткой.

Интегративный тип взаимодействия вирусов с клеткой (виrogenия) заключается во взаимном сосуществовании вируса и клетки в результате интеграции (встраивания) генома вируса в хромосому клетки хозяина. При этом интегрированный геном вируса реплицируется и функционирует как составная часть генома клетки.

Интегративный тип взаимодействия характерен для умеренных ДНК-содержащих бактериофагов, онкогенных вирусов и некоторых инфекционных вирусов, как ДНК-содержащих (например, вируса гепатита В), так и РНК-содержащих (например, ВИЧ). С геномом клетки интегрирует двунитевая ДНК вируса в кольцевой форме, которая прикрепляется к клеточной ДНК в месте гомологии нуклеотидных последовательностей и встраивается в определенный участок хромосомы при участии ферментов (рестриктаз, эндонуклеаз, лигаз).

Более сложным является процесс интеграции у РНК-содержащих вирусов. Он начинается с механизма обратной транскрипции, который заключается в синтезе комплементарной нити ДНК на матрице вирусной РНК с помощью вирионной обратной транскриптазы (ревертазы). После образования двунитевой ДНК и замыкания ее в кольцо происходит интеграция ДНК-транскрипта в хромосому клетки. Встроенная в хромосому клетки ДНК вируса называется *провирусом*, или провирусной ДНК. Провирус реплицируется в составе хромосомы и переходит в геном дочерних клеток, то есть состояние виrogenии наследуется. Однако под влиянием некоторых физических или химических факторов провирус может исключаться из хромосомы клетки и переходить

в автономное состояние с развитием продуктивного типа взаимодействия с клеткой.

Дополнительная генетическая информация провируса при вирогенезе сообщает клетке новые свойства, что может быть причиной онкогенной трансформации клеток и развития опухолей, а также развития аутоиммунных и хронических заболеваний. Сохранение вирусной информации в виде провируса в составе клеточного генома и передача ее потомству лежат в основе персистенции (от лат. *persistentia* — упорство, постоянство) вирусов в организме и развития латентных (скрытых) вирусных инфекций.

3.3. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ

Вирусы культивируют для лабораторной диагностики вирусных инфекций, изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения вакцин и диагностических препаратов. Поскольку вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами, их культивируют в организме лабораторных животных, развивающихся куриных эмбрионах и эмбрионах других птиц, а также на культурах клеток (тканей).

Присутствие вируса в исследуемом материале определяют с помощью методов индикации и идентификации.

Индикация вирусов, то есть неспецифическое обнаружение факта инфицирования, основано на выявлении биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками.

Идентификация означает установление вида или типа вируса. Она осуществляется в основном с помощью иммунных реакций или молекулярно-генетических методов (полимеразная цепная реакция и др.).

Вирусы можно культивировать в организме восприимчивых к ним лабораторных животных (белые мыши, хомячки, кролики, обезьяны и др.), которых заражают вирусосодержащим материалом различными способами в зависимости от тропизма вирусов (подкожно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и т.д.). Наличие вирусов обнаруживают по развитию у животных клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании реакции гемагглютинации с вирусосодержащим материалом. Реакция гемагглютинации основана на способности многих вирусов склеивать (агглютинировать) эритроциты своими гликопротеиновыми шипами (гемагглютинидами).

Другой моделью культивирования вирусов являются куриные эмбрионы (5–12-дневные), которых заражают исследуемым материалом в различные полости и ткани зародыша. Таким образом можно культивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Свидетельством репродукции вирусов в куриных эмбрионах являются специфические поражения оболочек и тела эмбриона (оспины, кровоизлияния), гибель эмбриона, положительная реакция гемагглютинации с вируссодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.

Часто вирусы культивируют на культуре клеток. Метод культур клеток был впервые разработан в 1949 г. Дж. Эндерсом и соавт., получившими за разработку техники культивирования вируса полиомиелита Нобелевскую премию в 1954 г. Изолированные клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биологических объектов, размножают на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде. Широко распространены культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерожденных) тканей, обладающих по сравнению с нормальными клетками взрослого организма более активной способностью к росту и размножению.

Культуры клеток обычно состоят из одного-двух основных типов клеток. Так, фибробласты имеют вытянутую форму, тогда как эпителиальные клетки имеют многоугольную форму.

Культуру клеток выращивают с соблюдением оптимальной температуры (36–38,5 °С) роста клеток и асептических условий в специальной лабораторной посуде (пробирки, флаконы, матрасы) или в реакторах для получения биотехнологической продукции. При этом используют сложную питательную среду Игла, среду 199 и другие среды, содержащие необходимые для роста клеток аминокислоты, минеральные соли, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека, буферные растворы для поддержания стабильного pH . Для подавления роста посторонней микрофлоры в среды для культивирования клеток добавляют антибиотики.

Различают однослойные, суспензионные и органные культуры клеток.

Клетки *однослойной культуры* прикрепляются и размножаются на поверхности лабораторной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение в вирусологии.

Клетки *суспензионных культур* размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью маг-

нитной мешалки или вращающегося барабана. Метод применяют для получения большого количества клеток, например при промышленном получении вирусных вакцин.

Органные культуры применяют ограниченно. Они представляют собой цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие при культивировании исходную структуру.

По свойствам жизнеспособных генераций культуры клеток подразделяют на первичные, или первично-трипсинизированные, перевиваемые, или стабильные, и полуперевиваемые.

Первичные культуры клеток размножаются только в первых генерациях, то есть выдерживают не более 5—10 пассажей после выделения из тканей. Их получают при обработке кусочков тканей (эмбриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, которые разрушают межклеточные связи в тканях и органах с образованием изолированных клеток.

Перевиваемые, или стабильные, культуры клеток способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), то есть выдерживают многочисленные пассажи. Их получают преимущественно из опухолевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста. Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными культурами: продолжительность их культивирования, высокую скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток, меньшую трудоемкость, способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии в течение многих лет, возможность использования международных линий культур во многих лабораториях мира. Однако злокачественный характер клеток и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе многочисленных генераций, ограничивают использование этого вида культур, в частности, их нельзя применять в производстве вирусных вакцин.

Полуперевиваемые культуры клеток имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40—50 пассажей. Их обычно получают из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры сохраняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток исходной ткани, и не претерпевают злокачественную трансформацию. Поэтому полуперевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагностике, так и в производстве вакцин. О репродукции вирусов в культуре клеток,

зараженных вирусосодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов:

- цитопатогенного действия вирусов, или цитопатического эффекта;
- образования внутриклеточных включений;
- образования бляшек;
- реакций гемадсорбции и гемагглютинации;
- цветной реакции.

Цитопатогенное действие, или цитопатический эффект, — видимые под микроскопом морфологические изменения клеток (вплоть до их отторжения от стекла), возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов. В зависимости от особенностей репродуцирующихся вирусов цитопатогенные действия могут различаться. В одних случаях быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются и гибнут клетки, в других — формируются гигантские многоядерные клетки (так называемые симпласты) или наблюдается явление клеточной пролиферации, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, характер цитопатогенного действия позволяет использовать этот феномен не только для индикации вирусов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток. Другим проявлением цитопатического эффекта служит образование внутриклеточных включений в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Часто включения представляют собой скопления вирионов или их компонентов, иногда они могут содержать клеточный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно анилиновыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться по величине (от 0,2 до 25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности (одиночные и множественные). Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, инфицированных вирусом натуральной оспы (тельца Гварниери), бешенства (тельца Бабеша–Негри), а внутриядерные включения — при заражении аденовирусами или вирусами герпеса.

Бляшки, или негативные колонии, представляют собой ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культур клеток (рис. 3.10). Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая бляшка образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество бляшек,



Рис. 3.10. Образование «бляшек» в культуре клеток, зараженных вирусом

можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кроме того, бляшки разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам появления. Поэтому метод бляшек используют для дифференциации вирусов, а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов. Однако не все вирусы могут вызывать цитопатический эффект, тогда их выявляют другими методами.

В основе *реакции гемадсорбции* лежит способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свойствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих вирусов даже при отсутствии выраженного цитопатогенного действия в культуре клеток. Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репродукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию гемагглютинации с культуральной жидкостью, то есть с питательной средой, содержащей размножившиеся вирусы.

Присутствие в культуре клеток популяции вирусов можно также выявить с помощью *цветной реакции*, которая регистрируется по цвету индикатора питательной среды для культур клеток. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут) и среда сохраняет свой первоначальный цвет. Если же вирусы не размножаются в культуре клеток, то клетки, оставаясь жизнеспособными,

в процессе метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие рН среды и соответственно цвета индикатора.

3.4. БАКТЕРИОФАГИ (ВИРУСЫ БАКТЕРИЙ)

Бактериофаги (от слова «бактерия» и греч. *phagos* — пожирающий) — вирусы, специфически проникающие в бактерии, использующие их биосинтетические системы для своей репродукции и вызывающие их лизис (растворение, разрушение клеток). Впервые явление самопроизвольного лизиса сибиреязвенных бактерий наблюдал один из основоположников отечественной микробиологии Н.Ф. Гамалея (1898). Английский бактериолог Ф. Туорт (1915) описал способность фильтрата стафилококков растворять свежую культуру этих же бактерий. Однако лишь французский ученый Ф. д'Эррель (1917) правильно оценил это явление, выделив фильтрующийся литический агент из испражнений больных дизентерией. Добавление литического агента к мутной бульонной культуре дизентерийных бактерий приводило к полному просветлению среды. Аналогичный эффект д'Эррель наблюдал и на плотных питательных средах, засеянных смесью литического агента с соответствующими бактериями. На фоне сплошного бактериального роста появлялись стерильные пятна круглой или неправильной формы — участки лизиса бактерий, названные негативными колониями, или бляшками. Предположив, что имеет дело с вирусами, д'Эррель выделил этот литический агент с помощью бактериальных фильтров и назвал его «бактериофаг» — *пожиратель бактерий*.

Бактериофаги широко распространены в природе. Они обнаружены в воде, почве, пищевых продуктах, различных выделениях из организма людей и животных (фекалии, моча, мокрота, гной и т.д.). Особенно большое количество бактериофагов выделяется в период выздоровления больного человека. В настоящее время эти вирусы выявлены у большинства бактерий, а также у некоторых других микроорганизмов, в частности у грибов. Поэтому бактериофаги в широком смысле слова часто называют просто фагами.

Бактериофаги принято обозначать буквами латинского, греческого или русского алфавита, часто с цифровым индексом, перед которым стоит название вида бактерий (например, фаги *E. coli* T2). Для обозначения группы родственных фагов используют родовые и видовые названия микробов, из которых выделены соответствующие фаги: колифаги, стафилофаги, актинофаги, микофаги и т.д.

Морфология и химический состав. Морфологию бактериофагов изучают с помощью электронной микроскопии. Фаги, как и просто организованные вирусы человека, состоят из нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) и белковой оболочки — капсида. Однако между собой они в значительной степени различаются по морфологии. В зависимости от формы, структурной организации и типа нуклеиновой кислоты фаги подразделяют на несколько морфологических типов (рис. 3.11). К I типу относятся нитевидные ДНК-содержащие фаги, взаимодействующие с мужскими особями бактерий (см. раздел 2.2 и гл. 5). Геном фагов представлен однонитевой ДНК, заключенной в спиральный капсид. II тип включает мелкие РНК-содержащие и однонитевые ДНК-содержащие фаги, геном которых находится внутри икосаэдрического капсида (головки) с аналогом отростка. К III типу относятся икосаэдрические фаги с коротким отростком, содержащие двунитевую ДНК. IV и V типы — сложные по морфологии ДНК-содержащие фаги, имеющие форму сперматозоида: икосаэдрический капсид головки соединен с длинным хвостовым отростком. V тип фагов отличается от VI типа тем, что чехол их отростков способен к сокращению. Размеры фагов колеблются от 20 до 800 нм (нитевидный тип).

Наиболее изучены крупные бактериофаги, имеющие форму сперматозоида и сокращающийся чехол отростка (рис. 3.12), например колифаги T2, T4, T6 (от англ. *type* — типовые). У этих фагов молекула двунитевой суперспирализованной ДНК находится внутри головки размером 65–100 нм и защищена капсидом. Капсид состоит из белковых молекул — идентичных полипептидных субъединиц, уложенных по икосаэдрическому (кубическому) типу симметрии. В состав головки также

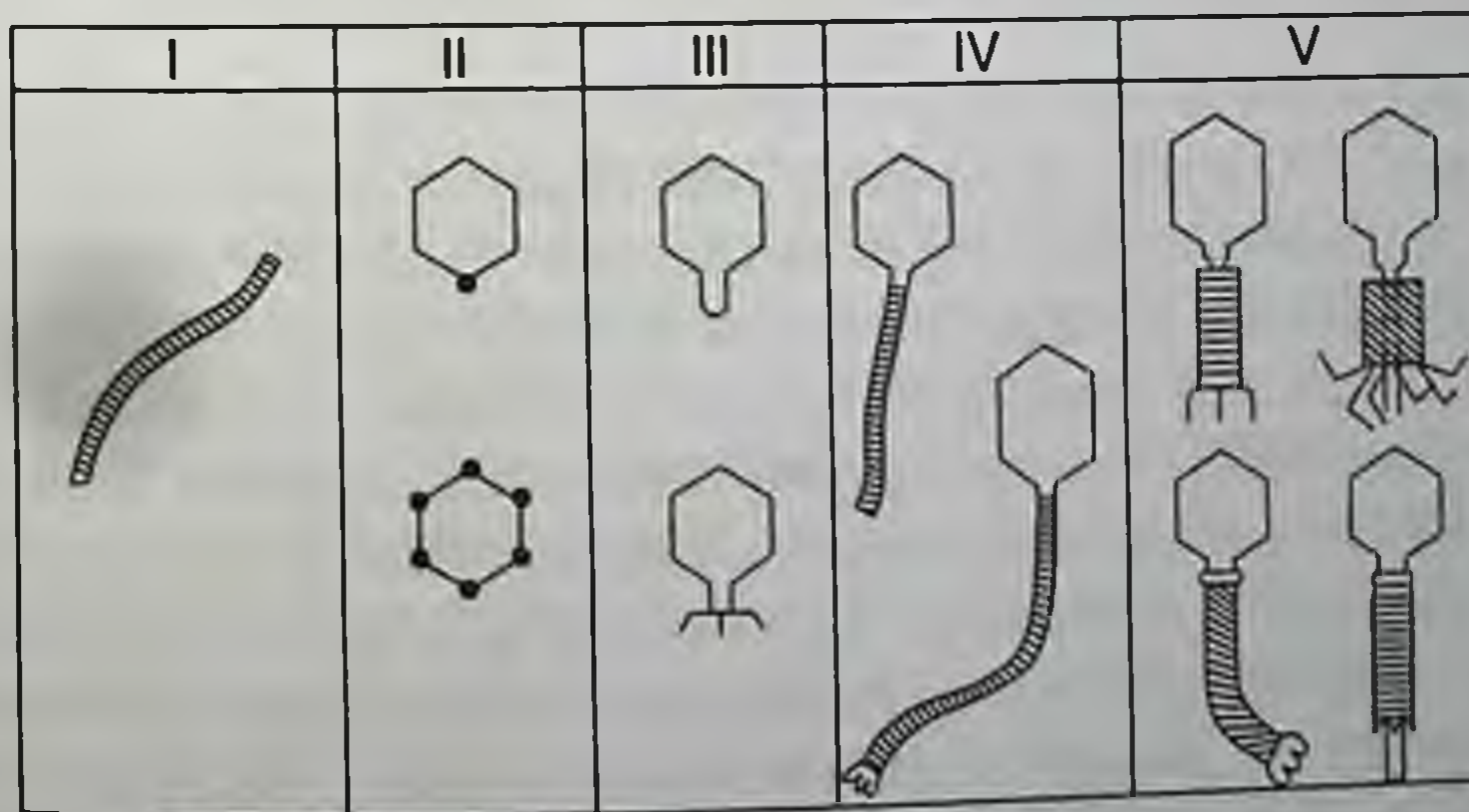


Рис. 3.11. Морфологические типы бактериофагов (см. пояснение в тексте)

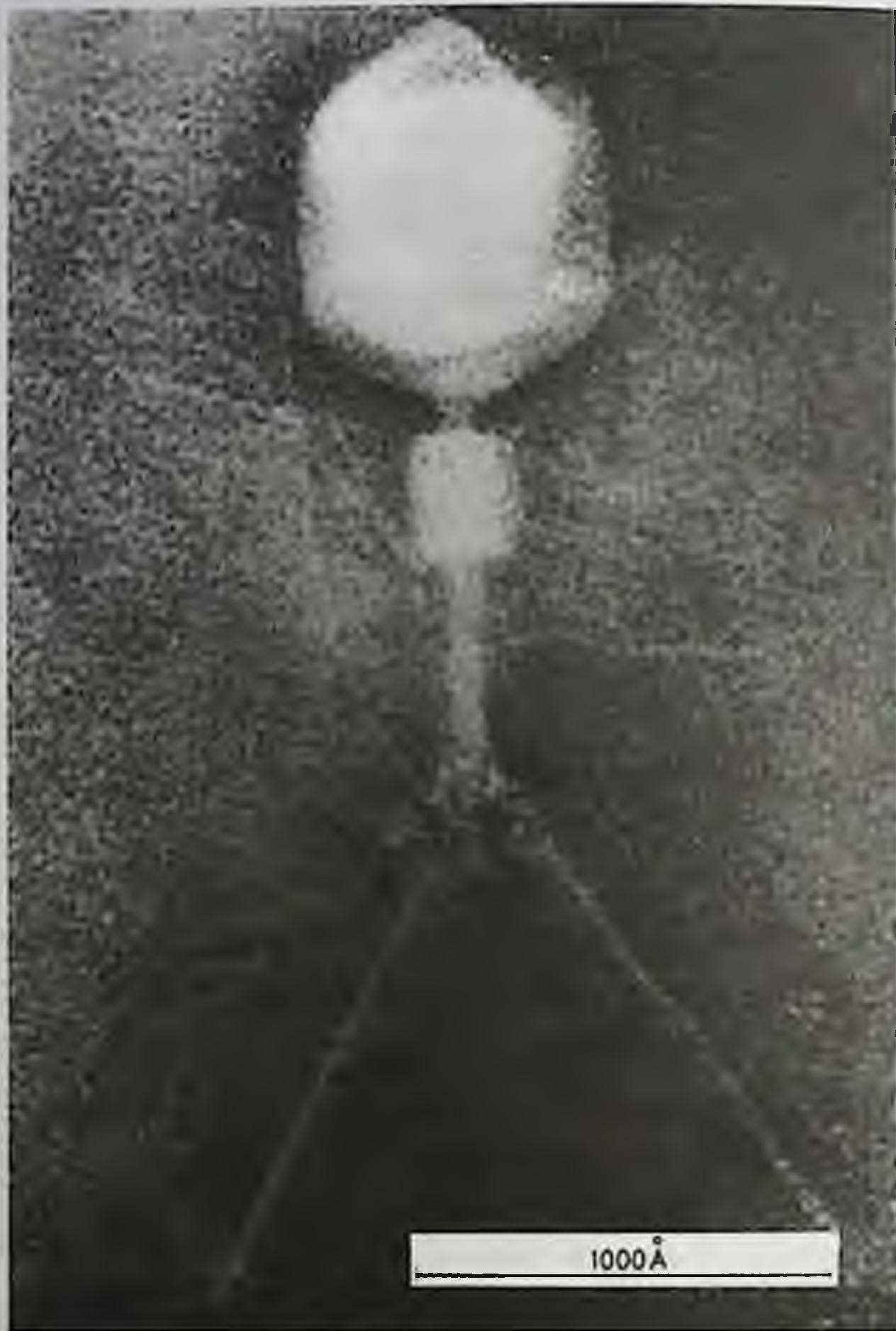


Рис. 3.12. Строение Т-четного фага (электронограмма)

входит полипептид, состоящий из аспарагиновой, глутаминовой кислот и лизина. У некоторых фагов внутри головки находится внутренний гистоноподобный белок, обеспечивающий суперспирализацию ДНК. Хвостовой отросток длиной более 100 нм имеет внутри полый цилиндрический стержень, сообщающийся с головкой, а снаружи — чехол (футляр), способный к сокращению наподобие мышцы. Чехол хвостового отростка образован белковыми субъединицами, уложенными по спиральному типу симметрии, содержит АТФ и ионы Са. На дистальном конце отростка имеется шестиугольная базальная пластинка с шипами, от которых отходят нитевидные структуры — фибриллы.

У некоторых фагов (например, Т2) в дистальной части отростка содержится фермент лизоцим.

Антигенные свойства. Бактериофаги содержат группоспецифические и типоспецифические антигены, обладают иммуногенными свойствами, вызывая синтез специфических антител в организме. Антитела, взаимодействуя с бактериофагами, могут нейтрализовать их литическую активность в отношении бактерий. По типоспецифическим антигенам фаги делят на серотипы.

Резистентность. По сравнению с вирусами человека бактериофаги более устойчивы к факторам окружающей среды. Они инактивируются под действием температуры 65–70 °С, ультрафиолетового облучения в высоких дозах, ионизирующей радиации, формалина и кислот. Длительно сохраняются при низкой температуре и высушивании.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой. Взаимодействие фагов с бактериями может протекать, как и у других вирусов, по продуктивному, abortивному и интегративному типам. При *продуктивном* типе взаимодействия образуется фаговое потомство, бактерии лизируются; при *abortивном* типе фаговое потомство не образуется и бактерии сохраняют свою жизнедеятельность, при *интегративном* типе геном фага встраивается в хромосому бактерии и сосуществует с ней.

В зависимости от типа взаимодействия бактериофаги делятся:

- на вирулентные;
- умеренные.

Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактерией по продуктивному типу. Проникнув в бактерию, они репродуцируются с образованием 200–300 новых фаговых частиц и вызывают лизис бактерий. Процесс взаимодействия с бактериями в достаточной мере изучен у бактериофагов, имеющих отросток с сокращающимся чехлом. Он состоит из последовательно сменяющих друг друга стадий и весьма схож с процессом взаимодействия вирусов человека и животных с клеткой хозяина. Однако имеются и некоторые особенности.

Специфическая адсорбция фагов происходит только при соответствии прикрепительных белков вирусов и рецепторов бактериальной клетки липополисахаридной или липопротеиновой природы, находящихся в ее клеточной стенке. Фаги, имеющие хвостовой отросток, прикрепляются к бактериальной клетке свободным концом отростка (фибриллами базальной пластинки). В результате активации АТФ чехол хвостового отростка сокращается, и стержень с помощью лизоцима, растворяющего прилегающий фрагмент клеточной стенки, как бы просверливает оболочку клетки. При этом ДНК фага, содержащаяся в его головке, проходит в форме нити через канал хвостового стержня и

инъецируется в клетку, а капсидные оболочки фага остаются снаружи бактерии.

Инъецированная внутрь бактерии нуклеиновая кислота подавляет биосинтез компонентов клетки, способствуя синтезу нуклеиновой кислоты и белков фага. Процесс синтеза вирусных белков и репликация фаговых геномов в бактериальной клетке аналогичны процессу репродукции других вирусов, содержащих двунитевую ДНК. РНК-полимераза клетки транскрибирует некоторые гены фаговой ДНК, в результате чего образуются ранние иРНК. Рибосомы клетки транслируют иРНК, при этом синтезируется целый ряд ферментов, включая те, которые необходимы для репликации фаговой ДНК. Репликация двунитевой ДНК фагов протекает в соответствии с общим механизмом репликации. После начала репликации фаговой ДНК начинается синтез поздних вирусных иРНК, в результате трансляции которых образуется второй набор вирусспецифических белков, в том числе капсидных белков фагов.

После образования компонентов фага происходит самосборка частиц: сначала пустотелые капсиды головок заполняются нуклеиновой кислотой, затем сформированные головки соединяются с хвостовыми отростками. При литической инфекции в клетке появляется еще один поздний вирусспецифический белок — фаговый лизоцим. Этот фермент воздействует на пептидогликановый слой стенки бактерии, делая ее менее прочной. В конце концов под действием внутриклеточного осмотического давления оболочка клетки разрывается и фаговое потомство выходит в окружающую среду вместе с остальным содержимым бактериальной клетки. Весь литический цикл от адсорбции бактериофага на бактерии до его выхода из нее занимает 20–40 мин.

У некоторых фагов механизм адсорбции, проникновения и высвобождения из клеток совершенно иной. Например, у нитевидных фагов на концах капсидной оболочки имеются минорные белки, с помощью которых эти фаги прикрепляются к половым пиям бактерии (см. гл. 5). Фаговая ДНК вместе с минорным белком проникают в цитоплазму клетки через ее половые пили. После репликации нуклеиновой кислоты фагов вновь синтезированные белки фаговой оболочки располагаются на клеточной мембране. Сборка и высвобождение нитевидных фагов происходят путем просачивания ДНК через цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку бактерии, во время которого они приобретают белковые капсиды. Бактериальная клетка при этом сохраняет свою жизнеспособность.

Взаимодействие фагов с бактериальной клеткой характеризуется определенной степенью специфичности, что стало основанием для под-

разделения их на *поливалентные фаги*, способные взаимодействовать с родственными видами бактерий, *моновалентные фаги*, взаимодействующие с бактериями определенного вида, и *типовые фаги*, взаимодействующие с отдельными типами (вариантами) данного вида бактерий.

Умеренные бактериофаги, в отличие от вирулентных, взаимодействуют с чувствительными бактериями либо по продуктивному, либо по интегративному типу. Продуктивный цикл умеренного фага идет в той же последовательности, что и у вирулентных фагов, и заканчивается лизисом клетки. При интегративном типе взаимодействия ДНК умеренного фага встраивается в хромосому бактерии, причем в строго определенную гомологическую область хромосомы, реплицируется синхронно с геномом размножающейся бактерии, не вызывая ее лизиса. ДНК бактериофага, встроенная в хромосому бактерии, называется «профаг», а культура бактерий, содержащих профаг, — «лизогенная». Само же биологическое явление сосуществования бактерии и умеренного бактериофага носит название «лизогения» (от греч. *lysis* — разложение, *genesis* — происхождение). Профаг, ставший частью хромосомы размножающейся бактерии, передается по наследству от клетки к клетке неограниченному числу потомков.

Лизогенные бактерии не образуют структурные вирусные белки и, следовательно, фаговое потомство. В основе сдерживающего механизма репродукции фагов лежит образование в бактерии специфического репрессора — низкомолекулярного белка, подавляющего транскрипцию фаговых генов. Биосинтез репрессора детерминируется генами профага. Наличием репрессора можно объяснить способность лизогенных бактерий приобретать иммунитет (невосприимчивость) к последующему заражению гомологичными или близкородственными фагами. Под *иммунитетом* в данном случае понимается такое состояние бактерии, при котором исключаются процесс вегетативного размножения указанных выше фагов и лизис клетки. Однако термин «лизогения» отражает потенциальную возможность лизиса бактерии, содержащей профаг. Действительно, профаги некоторой части лизогенной культуры бактерий могут спонтанно (самопроизвольно) или направленно под действием ряда физических или химических факторов дерепрессироваться, исключаться из хромосомы и переходить в вегетативное состояние. Этот процесс заканчивается продукцией фагов и лизисом бактерий. Частота спонтанного лизиса бактерий в лизогенных культурах весьма незначительна. Частоту лизиса бактерий можно существенно увеличить, воздействуя на лизогенную культуру

индуцирующими агентами: ультрафиолетовыми лучами, ионизирующим излучением, перекисными соединениями, митомицином С и др. Сам же феномен воздействия, приводящий к инактивации репрессора, называется *индукцией* профага. Явление индукции используют в генетической инженерии. Однако спонтанный лизис лизогенных культур может нанести вред микробиологическому производству. Так, если микроорганизмы — продуценты биологически активных веществ — оказываются лизогенными, существует опасность перехода фага в вегетативное состояние, что приведет к лизису производственного штамма этого микроба.

Геном профага может придавать бактерии новые, ранее отсутствовавшие у нее свойства. Этот феномен изменения свойств микроорганизмов под влиянием профага получил название «фаговая конверсия» (от лат. *conversion* — превращение). Конвертироваться могут морфологические, культуральные, биохимические, антигенные и другие свойства бактерий. Например, только лизогенные культуры дифтерийной палочки способны вызвать болезнь (дифтерию), так как содержат в хромосоме профаг, ответственный за синтез белкового экзотоксина.

Умеренные фаги могут быть дефектными, то есть неспособными образовывать зрелые фаговые частицы ни в естественных условиях, ни при индукции. Геном некоторых умеренных фагов (P1) может находиться в цитоплазме бактериальной клетки в так называемой плазмидной форме, не включаясь в ее хромосому. Такого рода умеренные фаги используют в качестве векторов в генетической инженерии.

Практическое применение фагов. Бактериофаги используют в лабораторной диагностике инфекций при внутривидовой идентификации бактерий, то есть определении фаговара (фаготипа). Для этого применяют метод *фаготипирования*, основанный на строгой специфичности действия фагов: на чашку Петри с плотной питательной средой, засеянной «газоном» чистой культурой возбудителя, наносят капли различных диагностических типоспецифических фагов. Фаговар бактерии определяется тем типом фага, который вызвал ее лизис (образование стерильного пятна, бляшки или негативной колонии). Метод фаготипирования позволяет выявить источник инфекции и проследить путь возбудителя от источника до восприимчивого организма (эпидемиологическое маркирование).

По содержанию бактериофагов в объектах окружающей среды можно судить о присутствии в них соответствующих патогенных бактерий.

Подобные исследования проводят при санитарно-микробиологическом исследовании воды. Например, в системах из поверхностных источников воды перед подачей ее в распределительную сеть определяют наличие колифагов. Колифаги являются одними из санитарно-показательных микроорганизмов (СПМО), характеризующих фекальное загрязнение воды.

Фаги применяют также для лечения и профилактики ряда бактериальных, чаще всего кишечных инфекций. Производят брюшнотифозный, дизентерийный, синегнойный, стафилококковый фаги и комбинированные препараты (колипротейный, пиобактериофаги и др.). Бактериофаги назначают по показаниям перорально, парентерально или местно в виде жидких, таблетированных форм, свечей или аэрозолей. Отличительной чертой фагов является полное отсутствие у них побочного действия. Однако лечебный и профилактический эффект фагов умеренный, поэтому их необходимо применять в комплексе с другими лечебными и профилактическими мероприятиями. Бактериофаги широко применяют в генетической инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Назовите процесс, при котором бактерии получают энергию путем ферментации глюкозы:

1. Гниение.
2. Брожение.
3. Денитрофикация.
4. Анаэробное дыхание.

Б. Большинство болезнетворных бактерий, называемых мезофилами, растут при температуре:

1. 15–20 °С.
2. 20–30 °С.
3. 30–37 °С.
4. 50–55 °С.

В. Назовите процесс, при котором в присутствии кислорода происходит минерализация белка:

1. Денитрофикация.
2. Брожение.
3. Лиофилизация.
4. Гниение.

Г. Назовите механизм, который используется бактериями для доставки внутрь цитозоля клетки эффекторных молекул:

1. Активный транспорт.
2. Секреция по III типу.
3. Секреция по II типу.
4. Транслокация радикалов.

Д. Некоторые вирусы в составе своих вирионов имеют РНК-зависимую РНК-полимеразу. Назовите тип нуклеиновой кислоты этих вирусов:

1. Двунитевая ДНК кольцевой формы.
2. Плюс-однонитевая РНК.
3. Минус-однонитевая РНК.
4. Двунитевая ДНК линейная.

Е. Назовите последствия интегративного типа взаимодействия вируса и клетки:

1. Вирусоносительство.
2. Трансформация клетки.
3. Гибель клетки.
4. Образование нового поколения вирионов.

Ж. Взвесь культуры *E. coli* была засеяна в 2 колбы, одна из которых содержала среду № 1, а другая — среду № 2. Посевы были поставлены в термостат с температурой 37 °С. Каждый час отбирали пробы для определения плотности бактериальной популяции, на основании чего были построены кривые роста, которые показали, что продолжительность лаг-фазы в среде № 1 равнялась 20 мин, а в среде № 2 — 50 мин. Назовите более эффективную среду.

З. На 3 чашки с кровяным агаром был произведен посев 4 бактериальных культур: А, Б, В, Г. Чашка № 1 была поставлена в термостат с температурой 37 °С. Чашка № 2 была помещена в анаэроустат, из которого откачали воздух, и ее поставили в термостат с температурой 37 °С. Чашка № 3 была поставлена в СО₂-инкубатор с температурой 37 °С. Через сутки инкубации были получены следующие результаты. Бактериальная культура А выросла на всех 3 чашках. Бактериальная культура Б выросла только на чашке № 3 (культивирование в атмосфере 5% СО₂). Бактериальная культура В выросла только на чашке № 1. Бактериальная культура Г выросла только на чашке № 2. Охарактеризуйте каждый тип культур. Ответ обоснуйте.

ЭКОЛОГИЯ МИКРОБОВ – МИКРОЭКОЛОГИЯ

4.1. РАСПРОСТРАНЕНИЕ МИКРОБОВ

Микроорганизмы распространены повсеместно. Они заселяют почву и воду, участвуя в круговороте веществ в природе, уничтожая остатки погибших животных и растений, повышая плодородие почвы и поддерживая устойчивое равновесие в биосфере. Многие из них формируют нормальную микрофлору¹ человека, животных и растений, выполняя полезные функции для своих хозяев.

4.1.1. Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе

Вещества растительного и животного происхождения минерализуются микроорганизмами до углерода, азота, серы, фосфора, железа и других элементов.

Круговорот углерода. В круговороте углерода, кроме растений, водорослей и цианобактерий, активное участие принимают микроорганизмы, разлагающие ткани отмерших растений и животных с выделением CO_2 . При аэробном разложении органических веществ образуются CO_2 и вода, а при анаэробном брожении — кислоты, спирты и CO_2 . Так, при спиртовом брожении дрожжи и другие микроорганизмы расщепляют углеводы до этилового спирта и диоксида углерода. Молочнокислое (вызываемое молочнокислыми бактериями), пропионовокислое (вызываемое пропионобактериями), маслянокислое и ацетонобутиловое (вызываемое клостридиями) брожение и другие виды брожения сопровождаются образованием кислот и диоксида углерода.

Круговорот азота. Клубеньковые бактерии и свободноживущие микроорганизмы почвы связывают атмосферный азот. Органические соединения растительных, животных и микробных остатков минерали-

¹ В настоящее время термин микрофлора заменен термином микробиота.

зуются микроорганизмами почвы, превращаясь в соединения аммония. Процесс образования аммиака при разрушении белка микроорганизмами получил название «аммонификация», или «минерализация азота». Белок разрушают псевдомонады, протей, бациллы и клостридии. При аэробном распаде белков образуются аммиак, сульфаты, диоксид углерода и вода, при анаэробном — аммиак, амины, диоксид углерода, органические кислоты, индол, скатол, сероводород. Уробактерии, выделяющиеся с мочой, расщепляют мочевины до аммиака, диоксида углерода и воды. Аммонийные соли, образующиеся при ферментации бактериями органических соединений, используются высшими зелеными растениями. Однако наиболее усвояемыми для растений являются нитраты — азотнокислые соли, которые образуются при распаде органических веществ в процессе окисления аммиака до азотистой, а затем азотной кислоты. Этот процесс называется «нитрификация», а микроорганизмы, его вызывающие, — «нитрифицирующие». Нитрификация проходит в две фазы: первую фазу осуществляют бактерии рода *Nitrosomonas* и др., при этом аммиак окисляется до азотистой кислоты, образуются нитриты; во второй фазе участвуют бактерии рода *Nitrobacter* и др., при этом азотистая кислота окисляется до азотной и превращается в нитраты. Нитрифицирующие бактерии выделил и описал русский ученый С.Н. Виноградский. Нитраты повышают плодородие почвы, однако существует и обратный процесс: нитраты могут восстанавливаться в результате процесса *денитрификации* до выделения свободного азота, что снижает его запас в виде солей в почве, приводя к снижению ее плодородия.

4.1.2. Микрофлора почвы

Количество только бактерий в 1 г почвы достигает 10 млрд. Микроорганизмы участвуют в почвообразовании и самоочищении почвы, кругообороте в природе азота, углерода и других элементов. В ней, кроме бактерий, обитают грибы, простейшие и лишайники, представляющие собой симбиоз грибов с цианобактериями. На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало из-за губительного действия ультрафиолетовых лучей, высушивания и других факторов. Пахотный слой почвы толщиной 10–15 см содержит наибольшее количество микроорганизмов. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшается вплоть до их исчезновения на глубине 3–4 м. Состав микрофлоры почвы зависит от ее типа и состояния, состава растительности, температуры, влажности и т.д.

Большинство микроорганизмов почвы способны развиваться при нейтральном pH , высокой относительной влажности, температуре 25–45 °С.

В почве живут спорообразующие палочки родов *Bacillus* и *Clostridium*. Непатогенные бациллы (*Bac. megaterium*, *Bac. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются аммонифицирующими, составляют группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ. Почва также служит местом обитания азотфиксирующих бактерий, усваивающих молекулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Азотфиксирующие разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для повышения плодородия рисовых полей. Патогенные спорообразующие палочки (возбудители сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) могут длительно сохраняться, даже размножаться в почве. Представители семейства кишечных бактерий (семейство *Enterobacteriaceae*) — кишечная палочка, возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов и дизентерии, попав в почву с фекалиями, отмирают. В чистых почвах кишечная палочка и протей встречаются редко; обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформные бактерии) в значительном количестве является показателем загрязнения почвы фекалиями человека и животных и свидетельствует об ее санитарно-эпидемиологическом неблагополучии из-за возможности передачи возбудителей кишечных инфекций. Количество простейших в почве колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы. Питаясь бактериями и органическими остатками, простейшие вызывают изменения в составе органических веществ почвы. В почве находятся также многочисленные грибы, токсины которых, накапливаясь в продуктах питания человека, вызывают интоксикации — микотоксикозы и афлатоксикозы.

4.1.3. Микрофлора воды

В воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения, то есть физико-химическим условиям, освещенности, степени растворимости кислорода и углекислого газа, содержания органических и минеральных веществ и т.д. Микрофлора воды активно участвует в процессе самоочищения от органических отходов. Утилизация органических отходов связана с деятельностью постоянно обитающих в воде микроорганизмов, то есть составляющих аутохтонную микрофлору. В пресных

водоемах находятся различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки), извитые и нитевидные (актиномицеты). На дне водоемов, в иле увеличивается количество анаэробов. При загрязнении воды органическими веществами появляется большое количество непостоянных (аллохтонных) представителей микрофлоры воды, которые исчезают в процессе самоочищения воды.

Вода — фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций, криптоспориоза и др.). Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы). Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, так как последние обычно задерживаются верхними слоями почвы.

Вода океанов и морей также содержит различные микроорганизмы, в том числе архебактерии, светящиеся и галофильные (солелюбивые) бактерии, например галофильные вибрионы, поражающие моллюски и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция. Кроме этого, отмечено большое количество нанобактерий, например *Sphingomonas*, которые проходят через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

4.1.4. Микрофлора воздуха

В воздух попадают микроорганизмы из почвы, воды, а также с поверхности тела, из дыхательных путей и с каплями слюны человека и животных. Много микроорганизмов содержится в воздухе закрытых помещений, микробная обсемененность которых зависит от условий уборки помещения, уровня освещенности, количества людей в помещении, частоты проветривания и др. Больше количество микроорганизмов присутствует в воздухе крупных городов, меньше — в воздухе сельской местности. Особенно мало микроорганизмов в воздухе над лесами, горами и морями.

Здесь обнаруживаются кокковидные и палочковидные бактерии, бациллы, клостридии, актиномицеты, грибы и вирусы. Воздух рассматривают как фактор передачи респираторных инфекций, при которых возбудитель передается воздушно-капельным или воздушно-пыле-

вым путем. Солнечные лучи и другие факторы способствуют гибели микрофлоры воздуха. Для снижения микробной обсемененности воздуха проводят влажную уборку помещения в сочетании с вентиляцией и очисткой (фильтрацией) поступающего воздуха. Применяют также аэрозольную дезинфекцию и обработку помещений лампами ультрафиолетового излучения (например, в микробиологических лабораториях и операционных блоках).

4.1.5. Микрофлора бытовых и медицинских объектов

В бытовых объектах встречаются микроорганизмы почвы, воды, воздуха, растений, выделений человека и животных. В формировании микрофлоры объектов медицинских учреждений может принимать участие патогенная и условно-патогенная микрофлора, выделяемая от больных или медицинского персонала, а также микрофлора, привносимая с перевязочным или другими материалами, лекарственными препаратами и т.д. В увлажненных участках (душевые, ванны, водосточные трубы, раковины и др.) могут размножаться возбудители сапронозных и оппортунистических инфекций — легионеллы, аэромонады, псевдомонады, клебсиеллы, протей.

4.2. МИКРОФЛОРА ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Микрофлора тела (или микробиота) человека играет чрезвычайно важную роль в поддержании его здоровья на оптимальном уровне. Нормальная микрофлора представляет собой совокупность множества *микробиоценозов* (сообществ микроорганизмов), характеризующихся определенным составом и занимающих тот или иной *биотоп* (кожу и слизистые оболочки) в организме человека и животных, сообщающийся с окружающей средой. Организм человека и его микрофлора находятся в состоянии динамического равновесия (эубиоза) и являются единой экологической системой.

В любом микробиоценозе следует различать так называемые характерные виды (облигатные, аутохтонные, индигенные, резидентные). Представители этой части микрофлоры постоянно присутствуют в организме человека и играют важную роль в метаболизме хозяина и защите его от возбудителей инфекционных заболеваний. Вторая составляющая нормальной микрофлоры — *транзиторная микрофлора* (аллохтонная, случайная). Представители *факультативной* части микрофлоры

достаточно часто встречаются у здоровых людей, но их качественный и количественный состав непостоянен и время от времени меняется. Количество характерных видов относительно невелико, зато численно они всегда представлены наиболее обильно.

Микробиота взрослого человека представлена шестью основными типами микроорганизмов: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* и *Fusobacteria*. Абсолютно доминирующими представителями микробиоты человека являются бактерии типов *Bacteroidetes* и *Firmicutes* (суммарно до 90%). Представленность доменов *Archaea* (преимущественно метаногенные микроорганизмы, такие как *Metanobrevibacterium smithia*) и *Eukarya* (дрожжеподобные грибы рода *Candida*) не превышает 1% всего микробного сообщества.

Функции нормальной микрофлоры

- Создание колонизационной резистентности.
- Регуляция газового состава, редокс-потенциала кишечника и других полостей организма хозяина.
- Продукция ферментов, участвующих в метаболизме белков, углеводов, липидов, а также улучшение пищеварения и усиление перистальтики кишечника.
- Участие в водно-солевом обмене.
- Участие в обеспечении эукариотических клеток энергией.
- Детоксикация экзогенных и эндогенных субстратов и метаболитов преимущественно за счет гидролитических и восстановительных реакций.
- Продукция биологически активных соединений (аминокислоты, пептиды, гормоны, жирные кислоты, витамины).
- Иммуногенная функция.
- Морфокинетическое действие (влияние на структуру слизистой оболочки кишечника, поддержание морфологического и функционального состояния желез, эпителиальных клеток).
- Мутагенная или антимутагенная функция.
- Участие в канцеролитических реакциях (способность индигенных представителей нормальной микрофлоры нейтрализовывать вещества, индуцирующие канцерогенез).

Важнейшая функция нормальной микрофлоры — ее участие в создании *колонизационной резистентности* (сопротивляемость, устойчивость к заселению посторонней микрофлорой) за счет антагонистической активности микроорганизмов и опосредованного воздействия через стимуляцию механизмов иммунной защиты). Механизм создания

колониционной резистентности комплексный. Колонизационная резистентность обеспечивается способностью некоторых представителей нормальной микрофлоры адгезироваться на эпителии слизистой оболочки кишечника, образуя на ней пристеночный слой и тем самым препятствуя прикреплению патогенных и условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний. Другой механизм создания колониционной резистентности связан с синтезом индигенными микроорганизмами ряда веществ, подавляющих рост и размножение патогенов, прежде всего органических кислот, перекиси водорода и других биологически активных субстанций, а также с конкуренцией с патогенными микроорганизмами за источники питания. Также значимую роль могут играть производимые микроорганизмами специфические антимикробные белки и пептиды (бактериоцины). Например, некоторые представители родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* способны синтезировать антибиотики — модифицированные пептиды, избирательно связывающиеся с липидом II в цитоплазматической мембране грамположительных бактерий и вызывающие нарушение ее целостности либо ингибирование синтеза пептидогликана. Выраженным антимикробным действием (в частности, в отношении основного возбудителя антибиотик-ассоциированной диареи *Clostridium difficile*) обладают вторичные желчные кислоты (например, дезоксихолат), которые образуются в результате деконъюгации и дегидроксилирования первичных желчных кислот различными представителями нормальной микрофлоры. Важный вклад в формирование колониционной резистентности вносят также стимулируемый нормальной микрофлорой синтез антимикробных пептидов и секреторного IgA.

Состав микрофлоры и размножение ее представителей контролируются прежде всего макроорганизмом (колонизационная резистентность, связанная с организмом хозяина) с помощью следующих факторов и механизмов:

- механических факторов (десквамация эпителия кожи и слизистых оболочек, удаление микробов секретами, перистальтикой кишечника, гидродинамической силой мочи в мочевом пузыре и т.д.);
- химических факторов — соляной кислоты желудочного сока, кишечного сока, желчных кислот в тонкой кишке, щелочного секрета слизистой оболочки тонкой кишки;
- бактерицидных секретов слизистых оболочек и кожи;
- иммунных механизмов — подавление адгезии бактерий на слизистых оболочках секреторными антителами класса IgA.

Различные области тела человека (биотопы) имеют свою характерную микрофлору, отличающуюся по качественному и количественному составу.

Микрофлора кожи. Основные представители микрофлоры кожи: коринеформные бактерии, плесневые грибы, спорообразующие аэробные палочки (бациллы), эпидермальные стафилококки, микрококки, стрептококки и дрожжеподобные грибы рода *Malassezia*.

Коринеформные бактерии представлены грамположительными палочками, не образующими спор. Аэробные коринеформные бактерии рода *Corynebacterium* обнаруживаются в кожных складках — подмышечных впадинах, промежности. Другие аэробные коринеформные бактерии представлены родом *Brevibacterium*. Они чаще всего встречаются на стопах ног. Анаэробные коринеформные бактерии представлены прежде всего видом *Propionibacterium acnes* — на крыльях носа, головы, спины (сальные железы). На фоне гормональной перестройки они играют значительную роль в возникновении юношеских *acne vulgaris*.

Микрофлора верхних дыхательных путей. В верхние дыхательные пути попадают пылевые частицы, нагруженные микроорганизмами, большая часть которых задерживается и погибает в носо- и ротоглотке. Здесь растут бактериоиды, коринеформные бактерии, гемофильные палочки, лактобактерии, стафилококки, стрептококки, нейссерии, пептококки, пептострептококки и др. На слизистых оболочках респираторного тракта больше всего микроорганизмов в области носоглотки до надгортанника. В носовых ходах микрофлора представлена коринебактериями, постоянно присутствуют стафилококки (резидентные *S. epidermidis*), встречаются также непатогенные нейссерии, гемофильные палочки.

Гортань, трахея, бронхи и альвеолы обычно стерильны.

Пищеварительный тракт. Качественный и количественный состав различных отделов пищеварительного тракта неодинаков.

Рот. В полости рта обитают многочисленные микроорганизмы. Этому способствуют остатки пищи во рту, благоприятная температура и щелочная реакция среды. Анаэробов больше, чем аэробов, в 10–100 раз. Здесь обитают разнообразные бактерии: бактериоиды, превотеллы, порфиромонады, бифидобактерии, зубактерии, фузобактерии, лактобактерии, актиномицеты, гемофильные палочки, лептотрихии, нейссерии, спирохеты, стрептококки, стафилококки, пептококки, пептострептококки, вейлонеллы и др. Анаэробы обнаруживаются прежде всего в карманах десен и зубных бляшках. Они представлены

родами *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* и др. Аэробы представлены *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.* Обнаруживаются также грибы рода *Candida* и простейшие (*Entamoeba gingivalis*, *Trichomonas tenax*). Ассоцианты нормальной микрофлоры и продукты их жизнедеятельности образуют зубной налет.

Антимикробные компоненты слюны, особенно лизоцим, антимикробные пептиды, антитела (секреторный IgA), подавляют адгезию посторонних микробов к эпителиоцитам. С другой стороны, бактерии образуют полисахариды (*S. sanguis* и *S. mutans*), преобразовывают сахарозу во внеклеточный полисахарид (глюканы, декстраны), участвующие в адгезии к поверхности зубов. Колонизации постоянной частью микрофлоры способствует фибронектин, покрывающий эпителиоциты слизистых оболочек.

Пищевод практически не содержит микроорганизмов.

Желудок. В желудке количество бактерий не превышает 10^3 КОЕ/мл. Размножение микроорганизмов в желудке происходит медленно из-за кислого значения *pH* окружающей среды. Чаще всего встречаются лактобактерии, поскольку они устойчивы в кислой среде. Нередки и другие грамположительные бактерии: микрококки, стрептококки, бифидобактерии.

Тонкая кишка. Проксимальные отделы тонкой кишки содержат небольшое количество микроорганизмов — не превышает 10^3 – 10^5 КОЕ/мл. Чаще всего встречаются представители типа *Firmicutes* (лактобактерии, стрептококки) и *Actinobacteria*, а также лактобактерии, стрептококки и актиномицеты. Это обусловлено, по-видимому, низким значением *pH* желудка, характером нормальной двигательной активности кишечника, антибактериальными свойствами желчи.

В дистальных отделах тонкой кишки количество микроорганизмов увеличивается, достигая 10^7 – 10^8 КОЕ/г, при этом качественный состав сопоставим с таковым микрофлоры толстой кишки.

Толстая кишка. В просвете дистального отдела толстой кишки количество бактерий резко увеличивается, достигая 10^{12} – 10^{13} КОЕ/г исследуемого материала. Соотношение строго анаэробных микроорганизмов к аэробным бактериям составляет 1000:1. Разнообразие представленных видов бактерий в толстой кишке превышает 3000.

Около 30% общей численности бактерий, населяющих толстый кишечник здорового взрослого человека, принадлежат к порядку *Bacteroidales* типа *Bacteroidetes*. Данная таксономическая группа включает в свой состав облигатно анаэробные, неспорообразующие, непод-

вижные, грамотрицательные бактерии, в основном с ферментирующим типом метаболизма.

Колонизация желудочно-кишечного тракта микроорганизмами, относящимися к порядку *Bacteroidales*, происходит уже в первые месяцы жизни ребенка, поскольку олигосахариды грудного молока создают селективные преимущества не только для представителей рода *Bifidobacterium*, но и *Bacteroides*.

Более 60% общей численности бактерий, населяющих толстый кишечник здорового взрослого человека, принадлежат типу *Firmicutes* (преимущественно грамположительных бактерий с низким содержанием G—C пар оснований в геноме), большинство из них не культивируется. Среди них в кишечнике наиболее широко представлены классы *Clostridia*, *Bacilli*, *Erysipelotrichia* и *Negativicutes*. Определенная часть представителей типа *Firmicutes*, в частности бактерии родов *Clostridium* и *Bacillus*, способны образовывать споры, что обеспечивает им возможность выживания и за пределами желудочно-кишечного тракта. Представители семейства *Lachnospiraceae* (из класса *Clostridia*), включающие роды *Dorea*, *Coprococcus* и *Roseburia*, эффективно ферментируют пектин и целлюлозу — важнейшие пищевые волокна. Они одними из первых, как и руминококки (*Ruminococcus*), колонизируют пищеварительный тракт человека. Многие представители семейства *Lachnospiraceae* способны продуцировать масляную кислоту (бутират), обеспечивающую широкий спектр биологических эффектов. Одними из крупнейших производителей бутирата в желудочно-кишечном тракте являются фекалибактерии (*Faecalibacterium prausnitzii*), содержание которых в дистальных отделах пищеварительного тракта достигает 10^{11} КОЕ/г фекалий. Снижение бутират-продуцирующих представителей в микробиоте пищеварительного тракта обнаружено у пациентов, страдающих колоректальным раком, неспецифическим язвенным колитом, болезнью Крона.

Следующим представителем типа *Firmicutes* является порядок *Lactobacillales* класса *Bacilli*, включающий роды *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* и др. Эта таксономическая группа бактерий преобладает в основном в верхних отделах пищеварительного тракта. Лактобациллы осуществляют гомо- и гетероферментативное брожение, основным продуктом которых является молочная кислота. При гетероферментативном брожении возможно образование и этанола, и диоксида углерода.

Класс *Negativicutes* включает бактерии родов *Veilonella*, *Megamononas*, *Megasphaera*, представляющие собой грамотрицательные анаэробные

кокки. Как правило, эта таксономическая группа микроорганизмов колонизирует полость рта или проксимальные отделы тонкой кишки, но репрезентативные виды этой группы могут быть обнаружены в высоких концентрациях и в дистальных отделах кишечного тракта. В этой таксономической группе *Veilonella parvula* может достигать концентраций 10^{11} КОЕ/г фекалий. Данные бактерии способны метаболизировать молочную и уксусную кислоту, произведенные другими симбионтами, до пропионовой кислоты, обладающей противовоспалительным потенциалом и влияющей на чувствительность к инсулину. Важной частью микрофлоры желудочно-кишечного тракта являются бактерии типа *Actinobacteria* (грамположительные бактерии с высоким содержанием G–C пар оснований в ДНК), хорошо изученным представителем которого является род *Bifidobacterium*. У младенцев, находящихся на грудном вскармливании, бифидобактерии могут составлять до 90% общего количества микроорганизмов желудочно-кишечного тракта.

Другой представитель типа *Actinobacteria* — порядок *Coriobacteriales*, который включает 12 родов (*Collinsella*, *Eggerthella*, *Atopobium* и др.).

Преобладающим видом протеобактерий в кишечнике являются *E. coli* и другие представители условно-патогенных энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*).

Основными источниками углерода и энергии для микроорганизмов толстой кишки являются неперевариваемые организмом человека сложные углеводы растительного и животного происхождения, а также вырабатываемый бокаловидными клетками муцин. Основной путь катаболизма данных субстратов — брожение, сопровождаемое выработкой короткоцепочечных жирных кислот (масляной, пропионовой и уксусной).

Короткоцепочечные жирные кислоты могут использоваться клетками человека в катаболизме, вступая в цикл Кребса и служа источниками энергии в процессе окислительного фосфорилирования. Так, вырабатываемая интестинальной микробиотой масляная кислота является основным источником энергии для колоноцитов. Во-вторых, короткоцепочечные жирные кислоты осуществляют дозозависимое ингибирование деацетилаз гистонов, что приводит к широкому спектру низкоспецифических эффектов. В-третьих, данные вещества служат специфическими лигандами для таких ассоциированных с G-белками рецепторов, как GPR41, GPR43 и GPR109A.

Наиболее изучено влияние короткоцепочечных жирных кислот на процессы регуляции иммунной системы. Для них характерен общий

противовоспалительный эффект, связанный со снижением активности NF-κB. Данные вещества индуцируют дифференцировку и усиливают иммуносупрессирующее действие T-регуляторных клеток. Помимо этого, наблюдаются стимуляция хемотаксиса нейтрофилов и замедление созревания дендритных клеток. Также короткоцепочечные жирные кислоты оказывают регулирующее влияние на функционирование желудочно-кишечного тракта. Так, они приводят к усилению секреции муцина бокаловидными клетками. Опосредовано через индукцию синтеза пептида YY и глюкагоноподобного пептида-1 L-клетками гастроэнтеропанкреатической эндокринной системы короткоцепочечные жирные кислоты способны уменьшать моторную активность желудочно-кишечного тракта и снижать аппетит.

Облигатная микрофлора представлена в основном бифидобактериями, эубактериями, лактобактериями, бактероидами, фузобактериями, пропионобактериями, пептострептококками, пептококками, клостридиями, вейлонеллами. Все они высокочувствительны к действию кислорода.

Аэробные и факультативно анаэробные бактерии представлены энтеробактериями, энтерококками и стафилококками.

В пищеварительном тракте микроорганизмы локализуются на поверхности эпителиальных клеток, в глубоком слое мукозного геля крипт, в толще мукозного геля, покрывающего кишечный эпителий, в просвете кишечника и в бактериальной биопленке.

Микрофлора желудочно-кишечного тракта новорожденных. Известно, что желудочно-кишечный тракт новорожденного стерилен, но уже через сутки начинает заселяться микроорганизмами, попадающими в организм ребенка от матери, медицинского персонала и окружающей среды. Первичная колонизация кишечника новорожденного включает несколько фаз:

- 1-я фаза — 10–20 ч после рождения — характеризуется отсутствием микроорганизмов в кишечнике (асептическая);
- 2-я фаза — через 48 ч после рождения — общее количество бактерий достигает 10^9 и более в 1 г испражнений. Эта фаза характеризуется заселением кишечника лактобактериями, энтеробактериями, стафилококками, энтерококками, вслед за ними появляются анаэробы (бифидобактерии и бактероиды). Данный этап еще не сопровождается формированием постоянной флоры;
- 3-я фаза — стабилизации — наступает, когда бифидофлора становится основной флорой микробного пейзажа. У большинства

новорожденных первой недели жизни формирования стабильной бифидофлоры не происходит. Преобладание бифидобактерий в кишечнике отмечается только на 9–10-е сутки жизни.

В ротовой полости новорожденных обычно выявляются бактерии рода *Lactobacillus* и *Streptococcus salivarius*. Оральные анаэробные микроорганизмы заселяют ротовую полость ребенка во время прорезывания зубов. Доминирующими микроорганизмами, заселяющими карманы десен, являются грамотрицательные неспорообразующие анаэробы (такие как *Porphyromonas gingivalis*), которые нередко вовлекаются в развитие воспалительных заболеваний периодонта.

Характеристика основных представителей микрофлоры кишечника. Бифидобактерии — грамположительные, неподвижные, неспорообразующие палочки, облигатные анаэробы. У человека идентифицированы более десяти видов бифидобактерий, в том числе *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. longum* и *B. Pseudocatenulatum*, которые преобладают в толстой кишке с первых дней и на протяжении всей жизни. Бифидобактерии выделяют большое количество кислых продуктов, бактериоцинов, лизоцима, что позволяет им проявлять антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам, поддерживать колонизационную резистентность, препятствовать транслокации условно-патогенных микроорганизмов.

Лактобактерии — грамположительные неспорообразующие палочки, микроаэрофилы. Являются представителями индигенной микрофлоры толстой кишки, полости рта и влагалища, обладают выраженной способностью к адгезии к эпителиоцитам кишечника, входят в состав мукозной флоры, участвуют в создании колонизационной резистентности, обладают иммуномодулирующим свойством, способствуют выработке секреторных иммуноглобулинов.

Количество в большей степени зависит от вводимых кисломолочных продуктов и составляет 10^6 – 10^8 в 1 г.

Зубактерии — грамположительные неспорообразующие палочки, строгие анаэробы. У детей, находящихся на грудном вскармливании, встречаются нечасто. Принимают участие в деконъюгации желчных кислот.

Клостридии — грамположительные, спорообразующие палочки, строгие анаэробы. Лецитиназоотрицательные клостридии появляются у новорожденных уже в конце 1-й недели жизни, а их концентрация достигает 10^6 – 10^7 КОЕ/г. Лецитиназоположительные клостридии

(*C. perfringens*) встречаются у 15% детей раннего возраста. Эти бактерии исчезают при достижении ребенком возраста 1,5–2,0 года.

Бактероиды — грамотрицательные, неспорообразующие облигатно-анаэробные бактерии. В кишечнике преобладают бактероиды, относящиеся к группе *B. fragilis*. Это прежде всего *B. thetaiotaomicron*, *B. vulgatus*. Доминирующими в кишечнике ребенка эти бактерии становятся после 8–10 мес жизни: их количество достигает 10^{10} КОЕ/г. Они участвуют в деконъюгации желчных кислот, обладают иммуногенными свойствами, высокой сахаралитической активностью, способны расщеплять углеводсодержащие компоненты пищи, продуцируя большое количество энергии.

Эшерихии — грамотрицательные палочки, появляются в первые дни жизни и сохраняются на протяжении всей жизни в количестве 10^7 – 10^8 КОЕ/г. Эшерихии, отличавшиеся сниженными ферментативными свойствами, а также способностью к продукции гемолизинов, как и другие бактерии (клебсиеллы, энтеробактеры, цитробактеры, протей и др.), составляют значительную часть как качественного, так и количественного состава энтеробактерий у детей первого года жизни, но в последующем к концу первого года жизни по мере созревания иммунной системы ребенка происходит частичная или полная элиминация условно-патогенных бактерий.

Стафилококки — грамположительные кокки, коагулазоотрицательные стафилококки колонизируют кишечник ребенка с первых дней жизни. Коагулазоположительные (*S. aureus*) в настоящее время обнаруживаются более чем у 50% детей в возрасте 6 мес и после 1,5–2,0 года. Источником колонизации детей бактериями вида *S. aureus* является флора кожи людей, окружающих ребенка.

Стрептококки и энтерококки — грамположительные кокки. Заселяют кишечник с первых дней жизни, количество достаточно стабильное на протяжении жизни — 10^6 – 10^7 КОЕ/г. Они участвуют в создании колонизационной резистентности кишечника.

Грибы рода *Candida* — транзиторная микрофлора. У здоровых детей встречаются нечасто.

Микрофлора мочеполового тракта. Почки, мочеточники, мочевого пузыря обычно стерильны.

В уретре встречаются коринеформные бактерии, эпидермальный стафилококк, сапрофитные микобактерии (*M. smegmatis*), неклостридиальные анаэробы (превотеллы, порфиромонады), энтерококки.

Основными представителями микрофлоры влагалища у женщин репродуктивного возраста являются лактобактерии, их количество дости-

гает 10^7 – 10^8 в 1 мл вагинального отделяемого. Колонизация влагалища лактобактериями обусловлена высоким уровнем эстрогенов у женщин детородного возраста. Эстрогены индуцируют накопление в вагинальном эпителии гликогена, являющегося субстратом для лактобактерий, и стимулируют образование рецепторов для лактобактерий на клетках вагинального эпителия. Лактобактерии расщепляют гликоген с образованием молочной кислоты, которая поддерживает pH влагалища на низком уровне (4,4–4,6) и является важнейшим контролирующим механизмом, препятствующим колонизации патогенными бактериями этой экологической ниши. Продукция перекиси водорода, лизоцима, лактацинов способствует поддержанию колонизационной резистентности.

Нормальная микрофлора влагалища включает бифидобактерии (встречаются редко), пептострептококки, пропионибактерии, превотеллы, бактероиды, порфиромонасы, коринеформные бактерии, коагулазоотрицательные стафилококки. Преобладающими микроорганизмами являются анаэробные бактерии, соотношение анаэробы/аэробы составляет 10:1. Примерно у 50% здоровых сексуально активных женщин обнаруживаются *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, а у 5% — бактерии рода *Mobiluncus*.

В состав нормальной флоры мочеполовой системы женщин может входить *Atopobium vaginae*; это один из основных видов бактерий, ассоциированных с вагинозом, помимо других анаэробов, таких как *G. vaginalis* и др.

На состав микрофлоры влагалища оказывают влияние беременность, роды, возраст. Во время беременности количество лактобактерий повышается и достигает максимума в III триместре беременности. Доминирование лактобактерий у беременных снижает риск патологической колонизации новорожденного при прохождении через родовые пути.

Роды приводят к резким изменениям в составе микрофлоры влагалища. Снижается количество лактобактерий и существенно увеличивается количество бактероидов, эшерихий. Данные нарушения микробиоценоза транзиторны, и к 6-й неделе после родов состав микрофлоры возвращается к норме.

После наступления менопаузы в генитальном тракте снижаются уровни эстрогенов и гликогена, уменьшается количество лактобактерий, преобладают анаэробные бактерии, pH приобретает нейтральное значение. Полость матки в норме стерильна.

Дисбактериоз

Дисбактериоз — это клинико-лабораторный синдром, возникающий при целом ряде заболеваний и клинических ситуаций, который характеризуется изменением качественного и количественного состава нормофлоры определенного биотопа, а также транслокацией определенных ее представителей в несвойственные биотопы с последующими метаболическими и иммунными нарушениями.

При дисбиотических нарушениях, как правило, происходят снижение колонизационной резистентности, угнетение функций иммунной системы, повышается восприимчивость к инфекционным заболеваниям.

Причины, приводящие к возникновению дисбактериозов.

- Длительная антибиотико-, химио- или гормонотерапия. Чаще всего дисбиотические нарушения возникают при использовании антибактериальных препаратов, относящихся к группе аминопенициллинов [ампициллин, амоксициллин, линкозамины (клиндамицин и линкомицин)]. В этом случае наиболее тяжелым осложнением следует считать возникновение псевдомембранозного колита, ассоциированного с *Clostridium difficile*.
- Воздействие жесткого γ -излучения (лучевая терапия, облучение).
- Заболевания желудочно-кишечного тракта инфекционной и неинфекционной этиологии (дизентерия, сальмонеллезы, онкологические заболевания).
- Стрессовые и экстремальные ситуации.
- Длительное пребывание в стационаре (инфицирование госпитальными штаммами), в условиях замкнутого пространства (космические станции, подводные лодки).

При бактериологическом исследовании регистрируется снижение количества или исчезновение одного или нескольких видов микроорганизмов — представителей индигенной микрофлоры, прежде всего бифидобактерий, лактобактерий. При этом увеличивается количество условно-патогенных микроорганизмов, которые относятся к факультативной микрофлоре (цитратассимилирующие энтеробактерии, протеи), при этом они могут распространяться за пределы характерных для них биотопов.

Различают несколько стадий дисбактериоза.

- I стадия — компенсированная, фаза латентная (субклиническая). Происходит уменьшение количества одного из представителей

индигенной микрофлоры без изменения других составляющих биоценоза. Клинически не проявляется — компенсированная форма дисбактериоза. При этой форме дисбактериоза рекомендуется диета.

- **II стадия** — субкомпенсированная форма дисбактериоза. Происходят снижение количества или элиминация отдельных представителей индигенной микрофлоры и увеличение содержания транзитной условно-патогенной микрофлоры. Для субкомпенсированной формы характерны дисфункция кишечника и местные воспалительные процессы, энтерит, стоматит. При этой форме рекомендуются диета, функциональное питание, а для коррекции — пре- и пробиотики.
- **III стадия** — декомпенсированная. Основные тенденции изменения микрофлоры нарастают, условно-патогенные микроорганизмы становятся доминирующими, и отдельные представители распространяются за пределы биотопа и появляются в полостях, органах и тканях, в которых они обычно не встречаются, например *E. coli* в желчных путях, *Candida* в моче. Развивается декомпенсированная форма дисбактериоза вплоть до тяжелых септических форм. Для коррекции этой стадии нередко приходится прибегать к так называемой селективной деконтаминации — к назначению антибактериальных препаратов из группы фторхинолонов, монобактамов, аминогликозидов *per os* с последующей длительной коррекцией микрофлоры с помощью диетического питания, пре- и пробиотиков.

Существует несколько подходов в коррекции дисбиотических нарушений:

- устранение причины, вызвавшей изменения микрофлоры кишечника;
- коррекция диеты (использование кисломолочных продуктов, продуктов питания растительного происхождения, диетических добавок, функционального питания);
- восстановление нормальной микрофлоры с помощью селективной деконтаминации — назначению про-, пре- и синбиотиков.

Пробиотики — живые микроорганизмы (молочнокислые бактерии, иногда дрожжи), которые относятся к обитателям кишечника здорового человека, оказывают положительное воздействие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма, через оптимизацию

микрофлоры хозяина. В РФ зарегистрированы и широко используются следующие группы пробиотиков.

- **Бифидосодержащие препараты.** Их действующим началом являются живые бифидобактерии, обладающие высокой антагонистической активностью против широкого спектра патогенных и условно-патогенных бактерий. Эти препараты повышают колонизационную резистентность, нормализуют микрофлору кишечника. Например, бифидобактерии бифидум (Бифидумбактерин[®]), который содержит живые лиофильно высушенные бифидобактерии — *B. bifidum*.
- **Лактосодержащие препараты.** Действующим началом этих препаратов являются живые лактобактерии, обладающие широким спектром антагонистической активности в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, за счет продукции органических кислот, перекиси водорода, лизоцима; например, препарат лактобактерии ацидофильные (Ацилакт[®]), содержащий 3 штамма *L. acidophilus*.
- **Колисодержащие препараты,** например кишечные палочки (Колібактерин[®]). Имеются также поликомпонентные препараты: бифидобактерии бифидум + кишечные палочки (Бификол[®]) (содержит бифидобактерии и *E. coli*; линекс, содержащий *B. infantis*, *L. acidophilus*, *E. faecium*).

Пребиотики — препараты немикробного происхождения, не способные адсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта. Они способны стимулировать рост и метаболическую активность нормальной микрофлоры кишечника. Чаще всего вещества, составляющие основу пребиотика, являются низкомолекулярными углеводами (олигосахариды, фруктоолигосахариды), содержащимися в грудном молоке и некоторых пищевых продуктах.

Синбиотики — комбинация пробиотиков и пребиотиков. Эти вещества избирательно стимулируют рост и метаболическую активность индигенной микрофлоры. Например, препарат биовестинлакто содержит бифидогенные факторы и биомассу *B. bifidum*, *L. adolescentis*, *L. plantarum*.

При тяжелых нарушениях микробиоценоза используется селективная деконтаминация. Препаратами выбора при этом могут быть антибактериальные препараты, применение которых не нарушает колонизационную резистентность, — фторхинолоны, азтреонам, перорально аминогликозиды.

4.3. УНИЧТОЖЕНИЕ МИКРОБОВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

4.3.1. Дезинфекция

Дезинфекция (от лат. *infectia* — инфекция и французской отрицательной приставки *des*) — комплекс мероприятий по уничтожению во внешней среде не всех, а только определенных возбудителей инфекционных заболеваний.

Различают механический, физический и химический способы дезинфекции.

Механический метод заключается в удалении микроорганизмов без их гибели путем встряхивания, выколачивания, влажной уборки и вентиляции помещений и т.д. Он не позволяет достигнуть полного обеззараживания обрабатываемых объектов, однако приводит к значительному уменьшению числа патогенных микроорганизмов во внешней среде. К механическому методу относится и использование мембранных фильтров (см. раздел 4.3.2).

Физический метод предполагает воздействие на микроорганизмы физических агентов — высокой температуры, ультрафиолетового излучения.

Кипячение применяют для дезинфекции хирургических инструментов, игл, резиновых трубок. Однако даже кипячение в течение 30 мин в специальных аппаратах-стерилизаторах не уничтожает споры и некоторые вирусы.

Пастеризация — это обеззараживание многих пищевых продуктов (вино, пиво, соки), при этом достигается только частичная стерильность; споры микроорганизмов и ряд вирусов не уничтожаются.

Ультрафиолетовые лучи применяют для дезинфекции воздуха в микробиологических лабораториях, боксах, операционных. Ее проводят, как правило, ртутными бактерицидными лампами различной мощности (БУВ-15, БУВ-30 и др.) с длиной волны излучения 253–265 нм. В настоящее время широко используют импульсные ксеноновые лампы, которые отличаются от ртутных тем, что при их разрушении в окружающую среду не попадают пары ртути.

В микробиологической практике широкое применение нашли способы **химической дезинфекции** рабочего места, отработанного патологического материала, градуированных и пастеровских пипеток, стеклянных шпателей, стекол.

Галогенсодержащие соединения. Хлорсодержащие вещества, такие как гипохлориты (соли натрия или калия хлорноватистой кислоты),

органические соединения хлора (хлорамин Б, дихлорризоциануровая кислота), хлороформ и другие, оказывают выраженное антимикробное действие на большинство бактерий, вирусов и простейших. Антимикробный эффект растворов хлорсодержащих веществ связан с наличием активного хлора, который вступает во взаимодействие с белками микробов, вызывая их повреждение. Хлорную известь обычно используют только для дезинфекции, хлорамин Б в виде 1–3% раствора — для дезинфекции, а более слабые растворы — в качестве антисептического вещества: 0,25–0,5% растворы для обработки рук медицинского персонала, 1,5–2% растворы для промывания инфицированных ран.

Окислители. Механизм антимикробного действия окислителей связан с выделением атомарного кислорода, который оказывает на микроорганизмы сильное повреждающее действие. Водорода пероксид (3% раствор) обладает относительно слабым антимикробным действием и используется в хирургической практике для обработки инфицированных ран в качестве антисептика. В более высокой концентрации водорода пероксид уничтожает практически все микроорганизмы и вирусы и может использоваться для химической стерилизации.

Поверхностно-активные вещества — катионные, анионные и амфолиты, их антимикробный эффект связан с изменением проницаемости цитоплазматической мембраны и нарушением осмотического равновесия. Поверхностно-активные вещества обладают выраженной активностью в отношении бактерий, грибов, вирусов и некоторых простейших.

Наибольшей антимикробной активностью обладают катионные вещества, из которых широкое применение получили четвертичные аммониевые соединения (цетримид, цетилпиридиния хлорид и др.). Они широко используются в качестве антисептиков (для обработки рук хирурга и операционного поля и др.) и дезинфектантов (для обработки помещений и предметов ухода за больными и др.).

Спирты. Чаще всего используются в медицине алифатические спирты (этанол и изопропанол) как антисептическое средство (70% спирт для обработки рук хирурга, 90–95% спирт для дезинфекции хирургических инструментов). Спирты вызывают коагуляцию белков микробной клетки, однако грибы, вирусы и споры бактерий обладают к спиртам выраженной устойчивостью.

Альдегиды характеризуются дезинфицирующими, антисептическими и химиотерапевтическими свойствами. Механизм бактерицидного действия связан с алкилированием amino-, сульфгидрильных и карбоксильных групп белков. Для обработки рук и стерилизации инстру-

ментов (0,5–1,0% растворы), а также для дезинфекции белья, одежды и особенно обуви используют 40% водный раствор формальдегида (Формалин^{*}).

Фенолы. Механизм их антимикробной активности связан с денатурацией белков клеточной стенки. Одним из наиболее известных препаратов этой группы является карболовая кислота (в настоящее время применяется крайне редко). При оценке антимикробной активности новых антисептиков и дезинфектантов фенол используется в качестве эталона (фенольный коэффициент). Его применяют в виде 2–5% мыльно-карболовой смеси для дезинфекции одежды, выделений и предметов ухода за больным. Для консервации широко используют также эфиры *p*-гидроксibenзойной кислоты (парабены).

При испытании антимикробной активности дезинфектантов и антисептиков используют стандартные тест-культуры микроорганизмов (золотистый стафилококк, кишечная палочка, бациллы, микобактерии, грибы-трихофитоны и кандиды). Для определения вирулицидной активности применяют тест-вирусы гепатита А и полиомиелита.

4.3.2. Стерилизация

Стерилизация (от лат. *sterilis* — бесплодный) — освобождение от всего живого, полное уничтожение в материалах всех микроорганизмов и их спор.

Различают физические, химические и механические способы стерилизации.

Прокаливанием на пламени спиртовки стерилизуют металлические инструменты, бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла.

Стерилизация сухим жаром применяется для обеспложивания стеклянной посуды, пробирок, колб, чашек Петри и пипеток. Для этой цели используют сухожаровые шкафы (печи Пастера), в которых необходимый эффект достигается при температуре 160 °С в течение 2 ч или при температуре выше 170 °С в течение 40 мин.

Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды нелетучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительность стерилизации; при использовании сухого жара более

высокие температуры (выше 170 °С) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Стерилизация паром под давлением — один из наиболее эффективных методов, основанный на сильном гидролизующем действии насыщенного пара. Паром под давлением стерилизуют различные питательные среды (кроме содержащих нативные белки), жидкости, приборы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Для этой цели применяют паровые стерилизаторы (автоклавы) с вертикальным или горизонтальным размещением котла.

Большинство паровых стерилизаторов относятся к гравитационным: пар движется в них сверху вниз под действием разности плотностей пара и воздуха.

Питательные среды, перевязочные материалы и белье стерилизуют при 1 атм в течение 15 мин, питательные среды с углеводами — при 0,5 атм в течение 15 мин, патогенный материал обеззараживают при 1,5–2,0 атм.

Контроль режима стерилизации осуществляется с помощью химических термотестов и искусственных биотестов. Химические термотесты представляют собой вещества, изменяющие свой цвет или физическое состояние при стерилизации и имеющие разную температуру плавления.

Бактериологический контроль режима стерилизации заключается в том, что в стерилизационную камеру помещают полоски с нанесенными на них спорами одного или двух видов бактерий, со спорами известной численности, со спорами и определенным количеством культуральной среды, суспензиями спор и т.д.

Стерилизация текущим паром (дробная стерилизация) — это обеспложивание объектов, разрушающихся при температуре выше 100 °С (питательные среды с аммиачными солями, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Обеспложивание проводят в паровом стерилизаторе при открытом спускном кране и незавинченной крышке или в аппарате Коха по 15–30 мин в течение 3 дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микробов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре. Последующая

стерилизация обеспечивает достаточно надежное обеспложивание объекта.

Тиндализация — это стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины); стерильность достигается повторным прогреванием объекта при 60 °С по 1 ч ежедневно в течение 5–6 дней подряд.

Лучевая стерилизация осуществляется либо с помощью γ -излучения, либо с помощью ускоренных электронов, под влиянием которых повреждаются нуклеиновые кислоты. Проводится в промышленных условиях для стерилизации одноразовых инструментов и белья, лекарственных препаратов.

Химическая стерилизация предполагает использование токсичных газов: окиси этилена, смеси ОБ (смесь оксида этилена и бромистого метила в весовом соотношении 1:2,5) и формальдегида. Глутаровый альдегид после активирования буферными системами используется для химической стерилизации тех материалов, которые нельзя стерилизовать другими методами. Эти вещества являются алкилирующими агентами, способными инактивировать активные группы в ферментах, ДНК, РНК, приводя к гибели микробов. Стерилизация газами проводится в специальных камерах. Используется для стерилизации изделий из термолабильных материалов, снабженных оптическими устройствами. Метод небезопасен для людей и окружающей среды, так как стерилизующие агенты остаются на объекте стерилизации.

Механические методы стерилизации. Фильтрование применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко повлиять на качество стерилизуемых материалов (питательные среды, сыворотки, антибиотики), а также для очистки бактериальных токсинов, фагов и различных продуктов жизнедеятельности бактерий. Как окончательный процесс оно менее надежно, чем стерилизация паром, из-за большой вероятности прохождения микроорганизмов через фильтры.

Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их материала. Существуют два основных типа фильтров — глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокнистых или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, получают их из нитроклетчатки, и захват ими частиц определяется в основном размером пор. Они пропу-

скают вирусы и микоплазмы, поэтому фильтрование через мембранные фильтры относят к механическим методам дезинфекции.

4.3.3. Асептика и антисептика

Асептика, основоположником которой является Д. Листер (1867), — это комплекс мероприятий, направленных на предупреждение попадания возбудителя инфекции в рану, органы больного при операциях, лечебных и диагностических процедурах. Асептику применяют для борьбы с экзогенной инфекцией, источниками которой служат больные и бактерионосители. Асептика включает стерилизацию и сохранение стерильности инструментов, перевязочного материала, операционного белья, перчаток и всего того, что приходит в соприкосновение с раной, а также дезинфекцию рук хирурга, операционного поля, аппаратуры, операционной и других помещений, применение специальной спецодежды, масок. К мерам асептики относятся также планировка операционных, систем вентиляции и кондиционирования воздуха. Методы асептики применяются также на фармацевтических и микробиологических производствах, в пищевой промышленности.

Антисептика — совокупность мер, направленных на уничтожение микробов в ране, патологическом очаге или организме в целом, на предупреждение или ликвидацию воспалительного процесса. Первые элементы антисептики были предложены И. Земмельвейном в 1847 г.

Антисептику проводят механическими (удаление некротизированных тканей), физическими (дренирование ран, введение тампонов, введение гигроскопических повязок), биологическими (использование протеолитических ферментов для лизиса нежизнеспособных клеток, применение бактериофагов и антибиотиков) и химическими (применение антисептиков) методами.

Антисептические средства убивают или подавляют рост микроорганизмов, находящихся в контакте с поверхностью кожных покровов, слизистых оболочек и соприкасающихся с ними тканей (раны, полости тела). Эти вещества должны характеризоваться выраженным антимикробным эффектом, но не должны обладать токсическими для макроорганизма свойствами (не должны вызывать повреждение и значительное раздражение тканей, задерживать регенераторные процессы и т.д.).

Разделение антимикробных средств на антисептики и дезинфицирующие вещества во многом условно. Так, некоторые антисептики (водорода пероксид и др.) в более высоких концентрациях могут использо-

ваться для дезинфекции помещений, белья, посуды и др. В то же время некоторые дезинфектанты (хлорамин Б и др.) в невысоких концентрациях применяют для орошения и промывания ран, обработки рук хирургов и т.д. В качестве антисептиков используют следующие группы соединений.

Йодсодержащие соединения обладают широким спектром антимикробной активности. Они вызывают коагуляцию белков микроорганизмов и применяются только в качестве антисептиков. Спиртовой раствор йода (3–5%) используют для обработки операционного поля, мелких порезов и ссадин, раствор Люголя* (йод + [калия йодид + глицерол]) — для обработки слизистых оболочек гортани и глотки. За последние годы большое распространение в медицинской практике получили комплексные соединения йода с высокомолекулярными поверхностно-активными веществами (йодофорами), которые характеризуются высокой бактерицидной и спороцидной активностью, не обладают красящим свойством, хорошо растворяются в воде, не раздражают кожу и не вызывают аллергических реакций [Йодиол*, Йодонат*, повидон-йод (Йодовидон*)]. Эти препараты широко используют для обработки операционного поля, лечения гнойных ран, трофических язв, ожогов и др.

Спирты. В качестве антисептического средства используют 70% спирт для обработки рук хирурга.

Калия перманганат (0,04–0,5% растворы) применяют для полосканий, промываний и спринцеваний при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей, в урологической и гинекологической практике.

Красители. В эту группу входят производные трифенилметана (бриллиантовый зеленый, Метиленовый синий* и др.) и акридиновые красители (профлавин, аминоакрин). Их используют в основном как антисептические средства. Так, например, бриллиантовый зеленый применяют для обработки кожных покровов при небольших травмах, порезах и пиодермиях, Метиленовый синий* — для лечения циститов и уретритов.

Кислоты, щелочи и эфиры. Действие препаратов этой группы связано с резким изменением pH среды, оказывающим неблагоприятное действие на большинство микроорганизмов. Чаще всего применяют борную (для полоскания полости рта и зева, промывания глаз), уксусную (обладает хорошей активностью в отношении грамотрицательных бактерий, особенно псевдомонад), бензойную (характеризуется антибактериальным и фунгицидным эффектом) и салициловую (используют

в клинике кожных болезней для лечения дерматомикозов) кислоты. Из щелочей наибольшее распространение получил 0,5% раствор аммиака, применяемый для обработки рук хирурга.

Фенол и близкие к нему вещества входят в состав дегтя березового и ихтаммола (Ихтиола^{*}), назначаемых для лечения инфицированных ран, пролежней, ожогов. Производные фенола (резорцинол, хлорофен, триклозан, тимол, салол) применяют в виде мазей, водных и спиртовых растворов при лечении инфекционно-воспалительных заболеваний в дерматологии и хирургии.

Гексамин (метенамин) расщепляется в кислой среде очага воспаления с освобождением формальдегида. Этот препарат применяют внутрь и внутривенно для лечения заболеваний мочевыводящих путей, холециститов, менингитов. К группе *альдегидов* относятся также *лизоформ* (для спринцеваний в гинекологической практике), *циминаль* (для лечения трофических язв, ожогов, пиодермий), *Цимезоль*⁹ (для лечения гнойных ран и пролежней) и *Ципидол*⁹ (для обработки уретры после случайных половых связей).

Соединения тяжелых металлов. Тяжелые металлы вызывают коагуляцию белков микробной клетки. В связи с аккумуляцией в организме эти соединения редко применяются в медицинской практике. Соединения ртути (тиомерсаль, соли фенилртути) назначают при блефаритах и конъюнктивитах; серебра нитрат — при трахоме; серебра протеинат (Протаргол^{*}) и серебро коллоидное (Колларгол^{*}) — при конъюнктивитах, циститах, уретритах и для обработки гнойных ран; цинка оксид (Цинка окись^{*}), пластырь свинцовый, Ксероформ^{*} — как антисептические средства при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи. Сулема из-за высокой токсичности в настоящее время для лечения больных не используется.

4.4. САНИТАРНАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Для разработки экологически обоснованных мероприятий по защите окружающей среды от биологического загрязнения патогенными микроорганизмами, а также для изучения влияния микрофлоры внешней среды на здоровье человека была создана самостоятельная медико-биологическая дисциплина — санитарная микробиология.

Санитарная микробиология — это наука, которая изучает микрофлору (микробиоту) окружающей среды и ее вредное влияние на организм человека.

Основные задачи санитарной микробиологии

- Гигиеническая и эпидемиологическая оценка объектов внешней среды по микробиологическим показателям.
- Разработка нормативов, определяющих соответствие микрофлоры исследуемых объектов гигиеническим требованиям.
- Разработка и экспертиза методов микробиологических и вирусологических исследований разнообразных объектов внешней среды в целях оценки их санитарно-гигиенического состояния.
- Разработка рекомендаций по оздоровлению объектов внешней среды путем воздействия на их микрофлору и оценка эффективности проводимых мероприятий.
- Изучение закономерностей жизнедеятельности микрофлоры окружающей среды как в самой экосистеме, так и во взаимоотношениях с человеком.

Объектами санитарно-микробиологического исследования являются вода, воздух, почва и другие объекты окружающей среды, а также пищевые продукты, оборудование пищеблоков и т.п.

Санитарная микробиология располагает двумя методами, с помощью которых можно определить санитарно-эпидемическое состояние внешней среды:

- прямое обнаружение патогенных микроорганизмов во внешней среде;
- косвенная индикация возможного их присутствия во внешней среде.

Прямой метод более надежный, но трудоемкий и недостаточно чувствительный. Трудности выделения патогенных микроорганизмов из внешней среды обусловлены их незначительной концентрацией, неравномерностью распределения, конкуренцией между патогенными микроорганизмами и сапрофитной микрофлорой. Огромное значение имеет изменчивость возбудителя во внешней среде. Поэтому прямое выделение патогенных микроорганизмов проводят только по эпидемиологическим показаниям.

Второй метод (косвенной индикации) более прост и доступен. Он располагает двумя показателями — критериями, которые позволяют определить санитарно-эпидемическую ситуацию. К ним относят общее микробное число и концентрацию санитарно-показательных микроорганизмов.

Общее микробное число — это число всех микроорганизмов в 1 см³ (мл) или в 1 г субстрата. При этом исходят из предположения, что чем больше микроорганизмов обнаруживается во внешней среде, тем вероятнее

загрязнение патогенными микроорганизмами. Поэтому общее микробное число дает представление об эпидемической обстановке.

Существуют три метода определения общего микробного числа:

- 1) оптический метод прямого подсчета бактерий под микроскопом в камере Горяева;
- 2) бактериологический метод (менее точный);
- 3) измерение биомассы.

Оптический метод обычно используют на водопроводных станциях при оценке эффективности работы очистных сооружений, но он не позволяет отличить живые бактерии от мертвых. Исследование можно выполнить в течение 1 ч, поэтому метод незаменим в аварийных ситуациях. Он позволяет судить о самоочищении воды. В начальной стадии процесса самоочищения грамотрицательных бактерий больше, чем грамположительных, а палочковидных форм больше, чем кокковых. На завершающей стадии соотношение меняется на обратное.

Бактериологическим методом выявляют определенную физиологическую группу бактерий, растущих при данных условиях. Например, обнаружение вегетативных форм микроорганизмов в прошедшем термическую обработку пищевом продукте свидетельствует о повторном заражении продукта после термической обработки или же о неэффективности последней. Обнаружение спор подтверждает удовлетворительную термическую обработку.

Измерение биомассы может проводиться только в специализированных лабораториях путем взвешивания остатков бактериальной массы, определения показателей клеточного обмена и т.д. На практике этот метод не применяется.

Критерий общего микробного числа имеет большое значение при проведении сравнительных исследований. В этих случаях внезапное повышение общего микробного числа указывает на микробную обсемененность объекта (например, кухонного инвентаря в столовой).

Термин «санитарно-показательные микроорганизмы» (СПМО) обозначает такие микроорганизмы, которые постоянно обитают в естественных полостях тела человека (животных) и постоянно выделяются во внешнюю среду.

Для признания бактерии в качестве СПМО необходимо соблюдение ряда требований, которым должен удовлетворять данный микроорганизм.

- Постоянное обитание в естественных полостях человека и животных и постоянное выделение во внешнюю среду.
- Отсутствие размножения во внешней среде.

- Длительность выживания и устойчивость во внешней среде не меньше или даже выше, чем у патогенных микроорганизмов.
- Отсутствие двойников, с которыми СПМО можно перепутать.
- Относительно низкая изменчивость во внешней среде.
- Наличие простых в исполнении и вместе с тем надежных методов индикации.

Чем выше концентрация СПМО, тем больше вероятность присутствия патогенных микроорганизмов. Их количество выражают в титрах и индексах.

Титр — это минимальное количество субстрата (в см³ или г), в котором еще обнаруживаются СПМО.

Индекс — это количество СПМО, которое содержится в 1 л воды или в 1 см³ другого субстрата.

Наиболее вероятное число означает количество СПМО в 1 л воды или в 1 г (см³) другого субстрата. Это более точный показатель, так как он имеет доверительные границы, в пределах которых может колебаться с вероятностью 95%.

Общая характеристика санитарно-показательных микроорганизмов

В качестве СПМО предложено довольно много микроорганизмов, их можно условно разделить на три группы.

1. Индикаторы фекального загрязнения (представители микрофлоры кишечника человека и животных).
2. Индикаторы воздушно-капельного загрязнения (комменсалы верхних дыхательных путей).
3. Индикаторы процессов самоочищения (обитатели внешней среды).

В состав первой группы СПМО входят:

- бактерии группы кишечных палочек;
- энтерококки;
- протей;
- сульфитредуцирующие клостридии;
- термофилы, бактериофаги кишечные, сальмонеллы;
- бактериоиды, бифидо- и лактобактерии;
- синегнойная палочка;
- кандида;
- ацинетобактер.

В состав второй группы входят:

- стрептококки;
- стафилококки.

В ответах следует указывать: обнаружен санитарно-показательный стафилококк.

В третью группу входят:

- протеолиты;
- аммонификаторы и нитрификаторы;
- аэромонады и бделловибрионы;
- споровые микроорганизмы;
- грибы и актиномицеты;
- целлюлозобактерии.

В действующих нормативных документах по контролю за санитарно-бактериологическими показателями воды, пищевых продуктов, почвы предусмотрен учет бактерий группы кишечных палочек. Следует отметить, что понятие «бактерии группы кишечных палочек» — утилитарное (санитарно-бактериологическое и экологическое), но не таксономическое. Эта группа представлена микроорганизмами родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, экологические особенности которых определяют их индикаторную значимость.

Бактерии группы кишечных палочек — это грамотрицательные, не образующие спор короткие палочки, сбраживающие глюкозу и лактозу с образованием кислоты и газа при $37 \pm 0,5$ °C в течение 24–48 ч, не обладающие оксидазной активностью. В некоторых официальных документах (по воде, почве, пищевым продуктам) имеются свои особенности формулировки понятия «бактерии группы кишечных палочек», не имеющие, однако, принципиального значения.

Еще одним показателем являются **общие колиформные бактерии** — это грамотрицательные оксидазоотрицательные палочки, которые на среде Эндо расщепляют лактозу при 37 °C в течение 48 ч.

Род *Escherichia*, включающий типовой вид *E. coli*, служит показателем свежего фекального загрязнения, являясь возможной причиной пищевых токсикоинфекций. Для идентификации используют биохимические тесты с учетом способности к ферментации лактозы при $44 \pm 0,5$ °C и отсутствия роста на цитратсодержащих средах. В воде их трактуют как термотолерантные колиформные бактерии, в лечебных грязях — как фекальные колиформные бактерии, в пищевых продуктах — как *E. coli*.

Этиологическая значимость бактерий рода *Citrobacter* доказана при эпидемических вспышках, протекающих по типу диспепсий, гастроэнтероколитов, пищевых токсикоинфекций.

Пищевые токсикоинфекции, обусловленные этими микроорганизмами, возникают при употреблении в пищу продуктов, в которых воз-

будители размножились в течение какого-то времени и накопились в достаточно большом количестве. Источниками инфекции обычно являются больные или бактерионосители. Заболевания, как правило, возникают после употребления зараженных пищевых продуктов (мясных, молочных).

Необходимо отметить, что кишечная палочка не является идеальным СПМО.

Недостатки кишечной палочки как СПМО

- Обилие аналогов во внешней среде.
- Изменчивость во внешней среде.
- Недостаточная устойчивость к неблагоприятным воздействиям.
- Недостаточно длительное выживание в продуктах по сравнению с шигеллами Зонне, сальмонеллами, энтеровирусами.
- Способность к размножению в воде.
- Нечеткий индикатор даже в отношении присутствия сальмонелл.

Все эти факты вынудили искать замену кишечной палочке. В 1910 г. на роль СПМО были предложены энтерококки (*Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*).

Преимущества энтерококка как СПМО

- Постоянно находится в кишечнике человека и постоянно выделяется во внешнюю среду. При этом *E. faecalis* в основном обитает в кишечнике человека, поэтому обнаружение его свидетельствует о загрязнении фекалиями людей. В меньшей степени у человека встречается *E. faecium*. Последний в основном обнаруживается в кишечнике животных, хотя сравнительно редко также отмечается и *E. faecalis*.
- Не способен размножаться во внешней среде. Во внешней среде в основном размножается *E. faecium*, но он имеет меньшее эпидемиологическое значение.
- Не изменяет своих свойств во внешней среде.
- Не имеет аналогов во внешней среде.
- Устойчив к неблагоприятным воздействиям внешней среды. Энтерококк в 4 раза устойчивее к хлору по сравнению с кишечной палочкой. Это главное его достоинство. Благодаря этому признаку энтерококк используют при проверке качества хлорирования воды, а также как индикатор качества дезинфекции. Выдерживает температуру 60 °С, что позволяет применять его как показатель качества пастеризации. Устойчив к концентрациям поваренной соли 6,5–17,0%, поэтому может быть использован в качестве индикатора

при исследовании соленых продуктов, морской воды, в которых кишечная палочка гибнет или становится атипичной. Устойчив к pH 3–12, что делает его индикатором фекального загрязнения при исследовании кислых продуктов.

- Для индикации энтерококков разработаны высокоселективные среды.

В настоящее время энтерококкометрия узаконена в Международном стандарте на воду как показатель свежего фекального загрязнения. При обнаружении в воде атипичных кишечных палочек присутствие энтерококков становится главным показателем свежего фекального загрязнения. В настоящее время узаконена энтерококкометрия молока, котлет в целях выяснения эффективности их термической обработки.

Для воды открытых водоемов определяют соотношение ФКП/ФЭ, где ФКП — фекальная кишечная палочка, ФЭ — фекальные энтерококки. При значении ФКП/ФЭ > 10 подозревают сброс в водоем нехлорированных сточных вод. Если показатель находится в пределах 0,1–1, имеет место достаточное хлорирование сточных вод, так как фекальные энтерококки в 4 раза устойчивее к хлору, чем кишечная палочка.

Протей. В настоящее время показано, что бактерии рода *Proteus* встречаются в 98% случаев в выделениях кишечника человека и животных, из них в 82% случаев — *P. mirabilis*. Обнаружение протей в воде и продуктах указывает на загрязнение объектов разлагающимися субстратами и свидетельствует о крайнем санитарном неблагополучии. При обнаружении протей в пищевых продуктах их бракуют, а воду не разрешают употреблять для питья.

***Clostridium perfringens*.** Следующим СПМО является *C. perfringens*. Однако у *C. perfringens* как СПМО есть свои достоинства и недостатки:

- непостоянно обнаруживается в кишечнике человека;
- длительно сохраняется во внешней среде за счет спорообразования, поэтому не свидетельствует о свежем фекальном загрязнении;
- на эти бактерии губительно действует сопутствующая микрофлора;
- споры устойчивы к концентрациям активного хлора 1,2–1,7 мг/л воды;
- *C. perfringens* может служить косвенным показателем наличия в воде энтеровирусов.

Для прорастания спор клостридий необходим температурный шок (прогревание при 75 °С в течение 15–20 мин). В методических указаниях 4.2.1018-01 по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды температурная проба воды является обязательной.

Определение титра этого СПМО рекомендовано при текущем санитарном надзоре за состоянием территории. Тесты на обнаружение сульфитредуцирующих клостридий в воде предусматривают стандарты России, Румынии, США. Определение *C. perfringens* проводят в воде открытых водоемов, почве, лечебных грязях, мясных продуктах.

Термофилы. Это целая группа СПМО, в основном споровых, растущих при 55–60 °С. Обитают во внешней среде и являются показателем загрязнения навозом и компостом. При гниении навоза или компоста температура повышается выше 60 °С и термофилы бурно размножаются. О степени загрязнения судят по количеству термофилов. В России их определяют при исследовании почвы, а также в консервах как индикатор термической обработки, особенно при хранении их в условиях жаркого климата.

Бактериофаги. В качестве СПМО используют бактериофаги кишечной палочки — колифаги, фаги сальмонелл и шигелл. Они обнаруживаются там, где есть соответствующие бактерии, к которым эти фаги адаптированы. Фаги выживают во внешней среде более 9 мес.

Фаги ценны как показатель фекального загрязнения, особенно энтеровирусами, так как они выделяются из сточных вод с той же частотой, что и энтеровирусы. По устойчивости к хлору фаги сравнимы с энтеровирусами. Обнаружение фагов по методу Грациа несложно, вычисляют так называемые бляшкообразующие единицы — БОЕ/см³, БОЕ/л.

В Санитарных нормах и правилах 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества» введено определение колифагов и установлены нормы.

Сальмонеллы. В 1930-х годах У. Вильсон и Э. Блер в качестве СПМО предложили сальмонеллы. Сальмонеллы — наиболее распространенные микроорганизмы, вызывающие острые кишечные заболевания, могут служить индикатором других острых кишечных заболеваний с аналогичными патогенезом и эпидемиологией. Поступают во внешнюю среду только с фекалиями человека и животных. Размножаются в почве при наличии в ней большого количества органических веществ, однако могут размножаться даже в чистой воде. При определении сальмонелл в воде следует вычислять не только процент положительных обнаружений, но и наиболее вероятное число. По этому показателю можно оценить эпидемиологическую ситуацию.

Синегнойная палочка. Способна размножаться во внешней среде. Обнаруживается в фекалиях здоровых людей в 11%, у животных в 7%

(то есть непостоянно). Методы индикации просты, но только в отношении пигментных форм, а во внешней среде преобладают беспигментные формы, которые распознавать трудно. Обнаруживается в 90% случаях в сточных водах, в больничных палатах. Наличие синегнойной палочки свидетельствует о неблагоприятном санитарном состоянии лечебного учреждения. Роль ее выросла в связи с распространением антибиотикоустойчивых штаммов и появлением большого количества носителей на коже и в моче.

Грибы рода *Candida*. Постоянно присутствуют в организме человека: в фекалиях в 10–90% случаев, в слизи верхних дыхательных путей в 15–50%, на коже в 1–100%. Они обнаруживаются везде, где есть сахаросодержащие вещества. Первоисточниками в природе являются человек и животные. Они очень устойчивы к неблагоприятным воздействиям внешней среды, даже более, чем патогенные бактерии. Их можно использовать в качестве индикаторов эффективности дезобработки.

Выше уже указывалось, что представители второй группы СПМО определяются в воздухе, молочных продуктах, воде. К ним относится α -зеленящий стрептококк (*S. salivarius*). У него есть двойники, такие как *S. lactis*, *bovis*, *equinus*, *cremoris*. Однако эти двойники редко обнаруживаются в жилых помещениях. Зеленящими могут быть и энтерококки, но они сами являются СПМО. Другим санитарно-показательным стрептококком является β -гемолитический стрептококк, который обнаруживается у 80% людей, в основном страдающих воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. Он обладает гемолитическими свойствами.

Показателем санитарного неблагополучия является и золотистый стафилококк. Именно этот вид стафилококка связан с присутствием людей и некоторых животных. В среднем у здоровых людей золотистый стафилококк обнаруживается в 30% случаев, а у медицинского персонала — до 96%. Этот вид стафилококка отличается длительностью выживания и устойчивостью во внешней среде. Он может быть косвенным индикатором загрязнения воздуха вирусами. Использование золотистого стафилококка как наиболее информативного СПМО рекомендовано при исследовании воздуха жилых помещений, жилых отсеков космических кораблей, подводных лодок, лечебно-профилактических учреждений.

На роль СПМО выдвигаются также антибиотикорезистентные стафилококки и микрококки, 5–6-кратное превышение указанных СПМО в воздухе больничных помещений по сравнению с воздухом внеболь-

ничных помещений следует оценивать как плохой прогностический признак.

Бделловибрионы предложены в качестве СПМО в 1962 г. Это аэробные грамотрицательные палочки, подвижные, имеют жгутики, размер 0,25–1,2 мкм. Являются хищниками по отношению к другим бактериям, поражают только грамотрицательные палочки. На одном из полюсов бделловибрионов есть полость, где скапливаются экзотоксин и липолитический фермент, который и растворяет клеточную стенку бактерий. Отличают их друг от друга по литической активности: одни лизируют только псевдомонады, а другие — только аэромонады. Бделловибрионы применяют для биологической очистки воды (искусственно выпускают в воду плавательных бассейнов), используют и как СПМО по загрязнению воды. В местах сброса сточных вод количество бделловибрионов достигает 3000 КОЕ/см³, а дальше от сброса — 10 КОЕ/см³. Выделяют бделловибрионы по методу Грация, но для постановки пробы необходимо иметь индикаторный штамм *E. coli* К-12. Количество их выражают в БОЕ/см³.

Аэромонады. Они в большом количестве содержатся в сточных водах и обладают большой энергией размножения. Служат показателем нагрузки сточных вод на водоем и имеют такое же значение, как общее микробное число. При большой концентрации аэромонад в воде может наступить пищевое отравление.

4.4.1. Санитарно-микробиологическое исследование воды

В воде формируются определенные биоценозы с преобладанием микроорганизмов, адаптировавшихся к условиям местонахождения, то есть к физико-химическим условиям, освещенности, степени растворимости кислорода и диоксида углерода, содержанию органических и минеральных веществ и т.д. Микрофлора воды представляет собой микробный планктон, играющий роль активного фактора ее самоочищения от органических отходов. Утилизация органических отходов связана с деятельностью постоянно обитающих в воде микроорганизмов, то есть составляющих аутохтонную микрофлору. В пресных водоемах находятся различные бактерии: палочковидные (псевдомонады, аэромонады и др.), кокковидные (микрококки), извитые и нитевидные (актиномицеты). На дне водоемов в иле увеличивается количество анаэробов. Загрязнение воды органическими веществами сопровождается увеличением численности бактерий, грибов и простейших. Появля-

ется большее количество непостоянных (аллохтонных) представителей микрофлоры воды, которые исчезают в процессе самоочищения воды.

Вода — фактор передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний. Вместе с загрязненными ливневыми, талыми и сточными водами в озера и реки попадают представители нормальной микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактер, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшного тифа, паратифов, дизентерии, холеры, лептоспироза, энтеровирусных инфекций, криптоспориоза и др.). Некоторые возбудители могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы). Вода артезианских скважин практически не содержит микроорганизмов, так как последние обычно задерживаются верхними слоями почвы.

Вода океанов и морей также содержит различные микроорганизмы, в том числе архебактерии, светящиеся и галофильные (солелюбивые) бактерии, например галофильные вибрионы, поражающие моллюски и некоторые виды рыб, при употреблении которых в пищу развивается пищевая токсикоинфекция. Кроме этого, отмечено большое количество нанобактерий, например *Sphingomonas*, которые проходят через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм.

Вода абсолютно необходима для нормального функционирования организма человека, животных и растений, поскольку составляет основу внутренней среды живой материи. Тем не менее именно через воду могут передаваться самые разные инфекционные заболевания. При решении вопроса снабжения населения доброкачественной водой необходимо учитывать возможность водного пути передачи, актуального для инфекций, в частности брюшного тифа (паратифов), дизентерии, холеры, лептоспироза, туляремии, полиомиелита, вирусных гепатитов А и Е. В зависимости от предназначения вода может быть классифицирована:

- на питьевую воду централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения;
- воду подземных и поверхностных источников централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения;
- децентрализованную питьевую воду (при использовании колодцев, артезианских скважин и родников);
- воду водных объектов в зонах рекреации;
- воду плавательных бассейнов с пресной и морской водой;
- хозяйственно-бытовые сточные воды после обеззараживания и очистки.

Для всех видов водопользования имеется нормативно-техническая документация — Государственные стандарты, Санитарные нормы и правила, методические указания, методические рекомендации, информационные письма и т.д. Нормативно-техническая документация включает гигиенические требования, нормативы качества воды и методы исследования.

Среди многочисленных нормируемых показателей особо следует выделить **микробиологические** и **паразитологические**. Косвенно данные показатели отражаются и при проведении химического анализа воды. Так, например, органические соединения азота (альбуминоидный азот) — показатель загрязнения воды органическими веществами белковой природы, в том числе и за счет сапрофитных и патогенных микроорганизмов. Ионы аммония, азотной и азотистой кислот также являются конечными продуктами распада микроорганизмов. Окисляемость воды и биохимическая потребность ее в кислороде косвенно свидетельствуют о возможном загрязнении воды патогенными микроорганизмами.

Санитарно-микробиологическое исследование воды включает определение как патогенных микроорганизмов, так и СПМО (косвенно свидетельствующих о возможном присутствии в воде и патогенных микроорганизмов). Определение патогенных микроорганизмов проводят по эпидемиологическим показаниям, а при плановых санитарно-микробиологических исследованиях воды централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения анализ включает, согласно требованиям Санитарных норм и правил 2.1.4.1074-01, следующие показатели (табл. 4.1).

Колифаги определяют только в системах водоснабжения из поверхностных источников передподачей воды в распределительную сеть, то же касается и наличия цист лямблий. Содержание спор сульфитредуцирующих клостридий определяют только при оценке эффективности технологии обработки воды. В случае обнаружения термотолерантных, общих колиформных бактерий, колифагов или хотя бы одного из указанных показателей проводят повторное экстренное исследование воды на термотолерантные колиформные бактерии, общие колиформные бактерии и колифаги. Параллельно проводят исследование воды на хлориды, аммонийный азот, нитраты и нитриты. Если и в повторно взятой пробе выявляются общие колиформные бактерии более 2 в 100 см³, и/или термотолерантные колиформные бактерии, и/или колифаги, то проводят исследование на патогенные бактерии кишечной группы

Таблица 4.1. Санитарно-показательные микроорганизмы в воде централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения

Показатели	Единицы измерения	Нормативы
Термотолерантные колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствуют
Общие колиформные бактерии	Число бактерий в 100 см ³	Отсутствуют
Общее микробное число	КОЕ в 1 см ³	Не более 50
Колифаги	БОЕ в 100 см ³	Отсутствуют
Споры сульфитредуцирующих клостридий	Число спор в 20 см ³	Отсутствуют
Цисты лямблий	Число цист в 50 см ³	Отсутствуют

Примечание. Оценивая количество общих и термотолерантных колиформных бактерий в 100 см³ воды, следует анализировать не менее 3 объемов воды (по 100 см³ каждый). При оценке общих колиформных бактерий и общего микробного числа превышение норматива не допускается в 95% проб, отбираемых в течение года.

и/или энтеровирусы. Такое же исследование на патогенные энтеробактерии и энтеровирусы проводят по эпидемиологическим показаниям по решению территориальных центров Роспотребнадзора.

Термотолерантные колиформные бактерии входят в состав общих колиформных бактерий и обладают всеми их признаками, но, в отличие от них, способны ферментировать лактозу до кислоты, альдегида и газа при 44 °С в течение 24 ч. Таким образом, термотолерантные колиформные бактерии отличаются от общих колиформных бактерий способностью ферментировать лактозу до кислоты и газа при более высокой температуре.

Определяемые показатели, количество и периодичность исследований зависят от типа источника водоснабжения, численности населения, обеспечиваемого водой из данной системы водоснабжения. Эти данные приведены в Санитарных нормах и правилах 2.1.4.1074-01. В Методических указаниях по санитарно-микробиологическому анализу питьевой воды (методические указания 4.2.1018-01 Министерства здравоохранения РФ) регламентированы методы санитарно-микробиологического контроля качества питьевой воды.

Общее число микроорганизмов — это общее число видимых при двукратном увеличении мезофильных (имеющих температурный оптимум 37 °С), аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, которые способны образовывать колонии на питательном агаре при 37 °С

в течение 24 ч. Для определения этого показателя в стерильную чашку Петри вносят 1 мл воды и заливают расплавленным (температура не выше 50 °С) мясопептонным агаром, а через сутки подсчитывают количество выросших колоний.

Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий методом мембранных фильтров

Метод основан на фильтровании определенных объемов воды через мембранные фильтры. Для этих целей используют фильтры диаметром 35 или 47 мм с диаметром пор 0,45 мкм (отечественные фильтры «Владипор» МФАС-ОС-1, МФАС-ОС-2, МФАС-МА (№ 4–6) или зарубежные ISO 9000 или EN 29 000). Мембранные фильтры подготавливают к анализу в соответствии с инструкциями завода-изготовителя.

Определение общих и термотолерантных колиформных бактерий титрационным методом

Метод основан на накоплении бактерий после посева определенных объемов воды в жидкие питательные среды с последующим пересевом на дифференциальную плотную среду с лактозой и идентификации колоний по культуральным и биохимическим тестам. При исследовании питьевой воды качественным методом (текущий санэпиднадзор) засевают 3 объема по 100 см³. При исследовании воды в целях количественного определения общих и термотолерантных колиформных бактерий (повторный анализ) засевают соответственно 100, 10 и 1 см³ — по 3 объема каждой серии.

4.4.2. Санитарно-микробиологическое исследование почвы

Почва дает приют разнообразным микроорганизмам. Так, количество только бактерий в почве достигает 10 млрд в 1 г. Микроорганизмы участвуют в почвообразовании и самоочищении почвы, в кругообороте в природе азота, углерода и других элементов. В ней, кроме бактерий, обитают грибы, простейшие и лишайники, представляющие собой симбиоз грибов с цианобактериями. На поверхности почвы микроорганизмов относительно мало из-за губительного действия ультрафиолетовых лучей, высушивания и других факторов. Пахотный слой почвы толщиной 10–15 см содержит наибольшее число микроорганизмов. По мере углубления количество микроорганизмов уменьшается вплоть до их исчезновения на глубине 3–4 м. Состав микрофлоры почвы зависит от ее типа и состояния, состава растительности, температуры.

влажности и т.д. Большинство почвенных микроорганизмов способны развиваться при нейтральном pH , высокой относительной влажности, температуре от 25 до 45 °С.

В почве живут спорообразующие палочки родов *Bacillus* и *Clostridium*. Непатогенные бациллы (*Bac. megaterium*, *Bac. subtilis* и др.) наряду с псевдомонадами, протеем и некоторыми другими бактериями являются аммонифицирующими, составляя группу гнилостных бактерий, осуществляющих минерализацию органических веществ. Патогенные спорообразующие палочки (возбудители сибирской язвы, ботулизма, столбняка, газовой гангрены) способны длительно сохраняться, а некоторые даже размножаться в почве (*Clostridium botulinum*). Почва также является местом обитания азотфиксирующих бактерий, усваивающих молекулярный азот (*Azotobacter*, *Azomonas*, *Mycobacterium* и др.). Азотфиксирующие разновидности цианобактерий, или сине-зеленых водорослей, применяют для повышения плодородия рисовых полей.

Представители семейства кишечных бактерий (семейство *Enterobacteriaceae*) — кишечная палочка, возбудители брюшного тифа, сальмонеллезов и дизентерии, попав в почву с фекалиями, отмирают. В чистых почвах кишечная палочка и протей встречаются редко. Обнаружение бактерий группы кишечной палочки (колиформных бактерий) в значительном количестве является показателем загрязнения почвы фекалиями человека и животных и свидетельствует об ее санитарно-эпидемиологическом неблагополучии из-за возможности передачи возбудителей кишечных инфекций. Количество простейших в почве колеблется от 500 до 500 000 на 1 г почвы. Питаясь бактериями и органическими остатками, простейшие вызывают изменения в составе органических веществ почвы. В почве находятся также многочисленные грибы, токсины которых, накапливаясь в продуктах питания человека, вызывают интоксикации — микотоксикозы и афлатоксикозы.

Результаты исследования почв учитывают при определении и прогнозе степени их опасности для здоровья и условий проживания населения в населенных пунктах (по эпидемиологическим показаниям), профилактике инфекционной и неинфекционной заболеваемости (предупредительный санитарный надзор), текущем санитарном контроле за объектами, прямо или косвенно воздействующими на окружающую среду.

При проведении текущего санитарного надзора за состоянием почвы ограничиваются кратким санитарно-микробиологическим анализом, указывающим на наличие и степень фекального загрязнения.

Показатели, включенные в эту группу, также характеризуют процессы самоочищения почвы от загрязнителей органической природы и энтеробактерий. Полный санитарно-микробиологический анализ почвы проводят в форме предупредительного санитарного надзора. По эпидемиологическим показаниям проводят индикацию патогенной микробиоты.

В лаборатории из 5 точечных проб почвы, взятых с одного участка, готовят усредненную пробу, тщательно перемешивая и растирая в стерильной фарфоровой чашке резиновым пестиком в течение 5 мин. Посторонние примеси (корни растений, камни, щепки) удаляют путем просеивания почвы через сито, которое предварительно протирают ватным тампоном, смоченным 96% этиловым спиртом. Из усредненной пробы отбирают навески (от 1 до 50–55 г в зависимости от перечня определяемых показателей) и готовят суспензию 1:10 на стерильной водопроводной воде (10 г почвы на 90 см³ воды). Для десорбции микроорганизмов с поверхности почвенных частиц приготовленную почвенную суспензию встряхивают в течение 3 мин на мешалке механического диспергатора. После отстаивания суспензии в течение 30 с готовят последовательные 10-кратные разведения почвы до концентрации 10⁻⁴–10⁻⁵ г/см³.

Оценку результатов санитарно-микробиологического исследования почв проводят путем сопоставления данных, полученных на опытных и контрольных участках почв одинакового состава, расположенных в непосредственной территориальной близости. Схемы оценки санитарного состояния почвы на основании отдельных санитарно-микробиологических критериев представлены в Методических указаниях № 1446-76 (табл. 4.2).

Таблица 4.2. Схема оценки санитарного состояния почвы по микробиологическим показателям (по Методическим указаниям № 1446-76)

Категории почв	Титр, г			Индекс термофильных микроорганизмов (число клеток/г)
	бактерии группы кишечных палочек	нитрифицирующие бактерии	клубоцидии	
Чистая	1,0 и выше	0,1 и выше	0,01 и выше	102–103
Загрязненная	0,9 и выше	0,09–0,001	0,009–0,0001	103–105
Сильно загрязненная	0,009 и ниже	0,0009 и ниже	0,00009 и ниже	105–4–106

В Методических указаниях 2.1.7.730-99 «Гигиеническая оценка качества почвы населенных мест» представлена схема оценки эпидемической опасности почв населенных мест. В данном документе для оценки интенсивности биологической нагрузки на почву используются такие показатели, как бактерии группы кишечных палочек и индекс энтерококков, а для оценки эпидемической опасности почвы — патогенные энтеробактерии и энтеровирусы.

4.4.3. Исследование микробной обсемененности воздушной среды

Микробиологическое исследование воздуха предусматривает определение общего содержания микроорганизмов, а также стафилококков в 1 м³ воздуха. В отдельных случаях проводят исследование воздуха на грамотрицательные бактерии, плесневые и дрожжеподобные грибы. По эпидемиологическим показаниям спектр выявляемых в воздухе возбудителей может быть расширен.

Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с использованием аппарата Кротова. Вполне допускается использование седиментационного метода Коха. Исследованию подлежат следующие помещения лечебно-профилактического учреждения: операционные блоки, перевязочные и процедурные кабинеты, асептические палаты (боксы), палаты отделения анестезиологии и реанимации, палаты и коридоры лечебных отделений, помещения аптек, стерилизационных и акушерско-гинекологических отделений и станций (отделений) переливания крови. Исследование воздуха методом Коха используют в исключительно редких случаях для ориентировочной оценки степени микробного загрязнения воздуха. Для определения общего количества микроорганизмов в воздухе операционных до начала работы открывают чашки с питательным агаром и устанавливают их примерно на высоте операционного стола — 1 чашку в центре и 4 в углах помещения («метод конверта») на 10 мин, а для выявления золотистого стафилококка используют чашки с желточно-солевым агаром на 40 мин. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С, сутки при комнатной температуре, затем подсчитывают количество колоний. *При этом исходят из классической формулы В.Л. Омелянского: на 100 см² поверхности питательной среды за 5 мин экспозиции оседает такое количество бактерий, которое содержится в 10 л воздуха (в 1 м³ — 1000 л). При этом на чашках с питательным агаром не должно вырастать более 5 колоний микроорганизмов, а на желточно-солевом агаре золотистый стафилококк не должен обнаруживаться.*

4.4.4. Санитарно-микробиологический контроль объектов продовольственного назначения

Пищевые продукты могут обсеменяться различными микроорганизмами, что приводит к их порче, развитию пищевых токсикоинфекций и интоксикаций, а также таких инфекций, как сибирская язва, бруцеллез, туберкулез и др. Заболевания животного, травмы или неблагоприятные условия его содержания способствуют нарушению защитных барьеров организма и транслокации (переносу) микроорганизмов в обычно стерильные ткани и органы (прижизненное обсеменение). В результате происходят обсеменение тканей забитого животного протейями, клостридиями и другими микробами, попадание при маститах в молоко стафилококков и стрептококков. Возможно и вторичное обсеменение микроорганизмами пищевых продуктов. В этом случае источником загрязнения являются объекты окружающей среды (почва, вода, транспорт и т.д.), а также больные люди и бактерионосители. При низкой температуре хранения мяса и мясных продуктов даже в замороженном мясе могут находиться микробы, способные к размножению в психрофильных условиях (псевдомонады, протей, аспергиллы, пенициллы и др.). Микробы, обитающие в мясе, вызывают его ослизнение; в нем развиваются процессы брожения и гниения, вызванные клостридиями, протеем, псевдомонадами и грибами.

Злаковые культуры, орехи в условиях повышенной влажности могут загрязняться грибами (аспергиллами, пенициллами, рода фузариум и др.), что служит причиной развития пищевых микотоксикозов.

Мясные блюда (студни, салаты из мяса, блюда из мясного фарша) могут быть причиной заболеваний, связанных с размножившимися в них сальмонеллами, шигеллами, диареегенными кишечными палочками, протеем, энтеротоксигенными штаммами стафилококков, энтерококками, *Clostridium perfringens* и *Bacillus cereus*.

Молоко и молочные продукты могут быть фактором передачи возбудителей бруцеллеза, туберкулеза и шигеллеза. Возможно также развитие пищевых отравлений в результате размножения в молочных продуктах сальмонелл, шигелл и стафилококков. Яйца, яичный порошок и меланж при эндогенном первичном инфицировании сальмонеллами яиц, особенно утиных, являются причиной сальмонеллеза.

Рыба и рыбные продукты чаще загрязняются бактериями *Clostridium botulinum* и *Vibrio parahaemolyticus* — возбудителями пищевых интоксикаций и токсикоинфекций. Эти заболевания наблюдаются и при

употреблении рыбных продуктов, загрязненных большим количеством сальмонелл, протей, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

Овощи и фрукты могут загрязняться и обсеменяются диареегенными кишечными палочками, шигеллами, протеем, энтеропатогенными штаммами стафилококков. Соленые огурцы могут быть причиной токсикоинфекции, вызванной *Vibrio parahaemolyticus*.

Все результаты микробиологического анализа пищевых продуктов могут быть получены не ранее 48–72 ч, то есть когда продукт уже может быть реализован. Поэтому контроль по этим показателям носит ретроспективный характер и служит целям санитарно-гигиенической оценки предприятия, производящего или реализующего пищевые продукты.

Обнаружение повышенной общей микробной обсемененности, колIFORMных бактерий позволяет предположить нарушение температурного режима при приготовлении и/или хранении готового продукта. Обнаружение патогенных микроорганизмов расценивают как показатель эпидемиологического неблагополучия столовой, предприятия торговли.

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу, то есть нормируется масса продукта, в которой не допускаются бактерии группы кишечных палочек, большинство условно-патогенных микроорганизмов, а также патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество КОЕ в 1 г (см³) продукта.

В продуктах массового потребления, для которых в таблицах Санитарных норм и правил 2.3.2.1078-01 гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов отсутствуют микробиологические нормативы, патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы, не допускаются в 25 г продукта.

Санитарно-бактериологическому контролю в обязательном порядке должны подвергаться объекты приготовления и реализации пищевой продукции.

Данные санитарно-микробиологического исследования дают возможность объективно оценить санитарно-гигиеническое состояние обследуемых объектов, выявить нарушения санитарного режима и оперативно проводить целенаправленные мероприятия по их устранению.

Различают несколько способов отбора проб с различного оборудования и инвентаря для микробиологического исследования: способы

тампонных смывов, отпечатков, агаровой заливки. Из них наиболее часто используют способ тампонных смывов. Санитарно-микробиологический контроль основан на обнаружении в смывах бактерий группы кишечных палочек — показателей фекального загрязнения исследуемых предметов. Исследования на стафилококк, патогенные бактерии семейства кишечных, определение общей микробной обсемененности проводят по показаниям. Например, взятие смывов для обнаружения стафилококков необходимо при обследовании кондитерских цехов, молочных кухонь и пищеблоков лечебных учреждений.

Объекты санитарно-микробиологического контроля:

- смывы с рук и спецодежды работников питания (водоснабжения);
- оборудование, инвентарь, посуда и другие объекты;
- готовые блюда, кулинарные и скоропортящиеся изделия;
- сырье и полуфабрикаты по ходу технологического процесса (по эпидемиологическим показаниям);
- питьевая вода централизованного и особенно децентрализованных источников водоснабжения.

Смывы с рук персонала, занятого обработкой сырых продуктов, забирают до начала работы. Смывы доставляют в бактериологическую лабораторию в течение 2 ч. Допускаются их хранение и транспортирование не более 6 ч при 1–10 °С.

В лаборатории производят посеvy смывов на среды Кесслер с лактозой или КОДА, при этом в пробирку со средой опускают тампон и переносят оставшуюся смывную жидкость. Посевы на средах Кесслер и КОДА инкубируют при 37 °С. Через 18–24 ч из всех пробирок со средой Кесслер производят высев на секторы чашек со средой Эндо, со среды КОДА высев производят только в случае изменения окраски среды (из исходной фиолетовой до желтой или зеленой) или ее помутнения. Посевы на среде Эндо выращивают при 37 °С 18–24 ч.

Из колоний, характерных для бактерий группы кишечных палочек, готовят мазки, окрашивают по Граму, микроскопируют, при необходимости дополнительно идентифицируют по общепринятым тестам для бактерий группы кишечных палочек. При оценке результатов санитарно-микробиологического обследования исходят из нормативов, что в смывах, взятых с объектов продовольственного назначения, бактерии группы кишечных палочек должны отсутствовать. Обнаружение бактерий группы кишечных палочек в смывах с поверхностей чистых, подготовленных к работе предметов, инвентаря, оборудования, рук и санитарной одежды персонала свидетельствует о нарушении санитарного

режима. В случае повторного обнаружения бактерий группы кишечных палочек в значительном проценте смывов рекомендуется провести исследование смывов на наличие патогенных энтеробактерий. При этом производят посев тампона и смывной жидкости на среды обогащения — селенитовый бульон или магниевую среду (возможно использование сред Мюллера и Кауфмана). Дальнейшее исследование проводят по общепринятой методике.

Исследование молока и молочных продуктов

Микрофлора молочных продуктов

Молоко является весьма благоприятной питательной средой для развития многих микроорганизмов. После употребления в пищу инфицированного молока и молочных продуктов могут возникать такие инфекции, как брюшной тиф, дизентерия, холера, эшерихиозы, бруцеллез, туберкулез, скарлатина, ангина, ку-лихорадка, ящур, клещевой энцефалит, сальмонеллезные токсикоинфекции, отравление стафилококковым энтеротоксином и др.

Различают специфическую и неспецифическую микрофлору молока и молочных продуктов. К **специфической микрофлоре** молока и молочных продуктов относят микробов-возбудителей молочнокислого, спиртового и пропионовокислого брожения. Микробиологические процессы за счет жизнедеятельности этих микроорганизмов лежат в основе приготовления кисломолочных продуктов (творога, кефира, простокваши, ацидофилина и др.). Бактерии молочнокислого брожения считаются **нормальной микрофлорой** молока и молочных продуктов. Главную роль при скисании молока и молочных продуктов играют молочнокислые стрептококки *S. lactis*, *S. cremaris* и др. Менее активные расы молочнокислых стрептококков (*S. citrovorus*, *S. lactis subsp. diacetylactis*) продуцируют летучие кислоты и ароматические вещества и поэтому широко используются при получении сыров. В группу молочнокислых бактерий также входят молочнокислые палочки: *Lactobacterium bulgaricum*, *Lactobacterium casei*, *Lactobacterium acidophilus* и т.д.

Основными возбудителями спиртового брожения в молоке и молочных продуктах являются дрожжи (*Saccharomyces lactis* и др.).

Неспецифическую микрофлору молока составляют гнилостные бактерии (*Proteus*), аэробные и анаэробные бациллы (*B. subtilis*, *B. megatherium*, *C. putrificum*) и многие другие. Эти микроорганизмы разлагают белок молока, участвуют в молочнокислом брожении и придают молоку неприятный вкус и запах. Поражение молочнокислых продуктов плесенью

(*Mucor*, *Oidium*, *Aspergillus* и др.) придает им вкус прогорклого масла. Бактерии кишечной группы, попадая в молоко, вызывают изменение вкуса и запаха молока. Микробное обсеменение молока начинается уже в вымени. В процессе дойки происходит добавочное его обсеменение с поверхности кожи вымени, с рук, из сосуда, куда оно поступает, и из воздуха помещения. Интенсивность этого добавочного обсеменения в общем зависит от того, насколько соблюдаются элементарные санитарно-гигиенические условия при получении молока. Плохие условия хранения молока также могут способствовать дальнейшему нарастанию в нем микрофлоры.

1. Бактерицидная фаза. Свежевыдоенное молоко, хотя и содержит уже сотни микробов в 1 см³ (главным образом стафилококки и стрептококки), обладает бактерицидными свойствами за счет присутствия в нем нормальных антител, поэтому в течение некоторого периода развитие бактерий в молоке задерживается. Этот период называют бактерицидной фазой. Длительность бактерицидной фазы колеблется в пределах 2–36 ч в зависимости от физиологических особенностей животного (в раннем периоде лактации бактерицидность молока выше). Хранение молока при повышенной температуре (30–37 °С) резко сокращает продолжительность бактерицидной фазы. Такое же влияние оказывает и интенсивное добавочное обсеменение молока микробами.

После того как бактерицидная фаза закончилась, наступает развитие микрофлоры. Видовой состав ее меняется во времени под влиянием изменений биохимических свойств среды и вследствие антагонистических и симбиотических взаимоотношений между микробными видами.

2. Фаза смешанной микрофлоры длится около 12 ч. В этот период еще не наступает преобладания каких-либо видовых групп микробов, так как обилие питательного субстрата и пространственные возможности позволяют достаточно свободно развиваться многим видам микроорганизмов.

3. Фаза молочнокислых стрептококков. В этой фазе получают преобладание микроорганизмы названной группы (*S. lactis*, *S. termophilus*, *S. cremoris* и др.). Лактоза усиленно превращается ими в молочную кислоту, реакция изменяется в кислую сторону. Накопление молочной кислоты ведет в дальнейшем к отмиранию молочнокислых стрептококков и смене их более кислотоустойчивыми молочнокислыми бактериями. Это наступает через 48 ч, знаменуя начало 3-й фазы.

4. Фаза молочнокислых палочек. В ней господствующее положение приобретают палочковидные формы молочнокислых бактерий

(*L. lactis*, *L. crusei*, *L. bulgaricum* и др.). Образующаяся кислая реакция среды приводит к угнетению роста и постепенному отмиранию других видов бактерий. К концу 3-й фазы дальнейшие возможности развития молочнокислой микрофлоры исчерпываются, а на смену приходят грибы, для которых молочная кислота служит питательным субстратом.

5. Фаза грибковой микрофлоры. В этот период развиваются плесени и дрожжи, жизнедеятельность которых приводит к утрате продуктом своей пищевой ценности. Дрожжи представлены главным образом видами из рода *Torula*, реже обнаруживаются некоторые виды сахаромицетов. Из плесеней встречаются молочная плесень (*Oidium lactis*), покрывающая в виде пушка поверхность простокваши и сметаны, а также аспергилловые, пеницилловые и мукоровые плесени. Действие грибковой флоры ведет к нейтрализации среды, а это делает ее вновь пригодной для бактерий. Наступает развитие гнилостных бактерий, вызывающих протеолиз казеина, и, наконец, группы анаэробных спорообразующих маслянокислых бактерий.

Деятельность сменяющейся микрофлоры прекращается только с наступлением полной минерализации всех органических веществ молока. При некоторых условиях процесс смены микробных биоценозов может отклоняться от приведенной выше схемы. Так, молочнокислые бактерии могут быть с самого начала угнетены микробами группы кишечных палочек, если последние присутствуют в большом количестве. Дрожжи могут вырабатывать заметные концентрации спирта, что имеет место в таких продуктах, как кефир (0,2—0,6%) и особенно кумыс (0,9—2,5%). Наличие спирта создает условия для последующего развития уксуснокислых бактерий, сбрасывающих спирт в уксусную кислоту. Наличие в молоке антибиотиков и других ингибирующих и нейтрализующих микрофлору веществ также может замедлять молочнокислые процессы.

Санитарно-гигиенический контроль молочных продуктов. Кисломолочные продукты получают в основном путем внесения в молоко особых заквасок, представляющих собой чистые или смешанные культуры определенных микроорганизмов (например, при приготовлении кефира так называемые зерна кефира, при приготовлении ацидофильного молока — культура *L. acidophilum*).

Ослизнение молока вызывается *B. viscosus lactis*, *B. cloacae*, *B. aerogenes*, *S. cremoris* и др. Вкус молока при этом не изменяется. В то же время для некоторых молочнокислых продуктов тягучая консистенция является нормальной. Она достигается искусственным внесением культуры слизиобразующих штаммов молочнокислых бактерий.

При продолжительном хранении молока в условиях относительно низкой температуры молочнокислые бактерии не могут развиваться, а некоторые виды дрожжей и гнилостных бактерий находят возможность развития. Они вызывают пептонизацию белков, в результате которой молоко приобретает горький вкус (*Torula amara*, *B. fluorescens liquifaciens*, а в сгущенном молоке — *Torula lactis condensis*).

Прогоркание сливок и сливочного масла обусловлено жизнедеятельностью липолитических микроорганизмов (гриба *Oidium lactis*, *B. fluorescens*, *B. liquifaciens*).

В результате того что в молоке патогенные бактерии находят условия для обильного размножения, при употреблении зараженного молока доза попадающих внутрь микроорганизмов может оказаться огромной. Таким образом, санитарный контроль за молочной продукцией, включающий бактериологическое исследование, имеет большое профилактическое значение.

Для сохранения молока его подвергают стерилизации или пастеризации. При этом не только гибнет микрофлора молока, но и разрушаются витамины, нарушается агрегатное состояние белков и жиров, и тем самым снижается питательная ценность продукта.

Эффективность пастеризации зависит от заданного температурного режима и степени микробного загрязнения молока. При очень высокой обсемененности бактериями часть микробов переживает пастеризацию, в результате чего порча молока происходит быстрее. Наибольшую опасность представляет сохранение в пастеризованном молоке патогенных энтеробактерий и энтеротоксигенных стафилококков.

В последнее время нашел применение и другой метод обработки молока — бактофугирование, позволяющее проводить освобождение молока от микроорганизмов путем обработки на специальных центрифугах.

В Санитарных нормах и правилах 2.3.2.1078-01 нормированы следующие показатели, характеризующие санитарно-бактериологическое состояние молока и молочных продуктов: мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы, бактерии группы кишечных палочек (коли-формы) и патогенные (в том числе сальмонеллы). В мороженом и ряде заквасок для кисломолочных продуктов также нормируется масса продукта, в которой не допускается содержание *S. aureus*, а также дрожжей и плесеней.

Методы микробиологического анализа предусматривают определение мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КОЕ/г) и определение бактерий группы кишечных палочек.

Определение количества аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов производят по общим правилам путем посева указанных разведений в количестве 1 см³ в чашки Петри с последующей заливкой плотным питательным агаром. Посевы выдерживают в термостате при 30±1 °С в течение 72 ч.

Число выросших на чашке колоний подсчитывают. Общее количество в 1 см³ (в 1 г) находят по формуле:

$$X = n \times 10m,$$

где n — количество сосчитанных колоний; m — число десятикратных разведений.

Бактерии группы кишечных палочек — бесспорные грамотрицательные, аэробные и факультативно-анаэробные палочки, в основном являющиеся представителями родов *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, сбразивающие в питательной среде лактозу с образованием кислоты и газа при 37±1 °С в течение 24 ч. Объем (масса) молокопродуктов, засеваемых в среду Кесслер, представлен в табл. 4.3.

Из каждого разведения засевают по одной пробирке. При наличии газообразования в наименьшем из засеваемых объемов считают, что бактерии группы кишечных палочек в нем обнаружены. Для ориентировочной характеристики микрофлоры кисломолочных продуктов дополнительным методом является микроскопия мазка, приготовленного из цельного или разведенного материала. Мазки фиксируют и окра-

Таблица 4.3. Количество продукта при посеве на среду Кесслера для определения бактерий группы кишечных палочек

Наименование продукта	Засеваемый объем или масса продукта, см ³ , г
Молоко и сливки сырые	0,1–0,00001
Молоко и сливки пастеризованные, кисломолочные продукты	1; 0,1; 0,01
Масло	1; 0,1; 0,01
Мороженое	0,1
Сыр	0,1–0,001
Творог и сметана	0,1–0,001
Молоко или сливки сгущенные с сахаром, какао и кофе со сгущенным молоком и сахаром	0,1
Молоко сухое, сливки сухие	0,1

шивают 10% Метиленовым синим*. Кисломолочные продукты имеют свою специфическую микрофлору, которую используют для их приготовления (табл. 4.4).

На сырое молоко нормативов нет, но как косвенный показатель бактериальной обсемененности используют редуктазную пробу (Государственный стандарт 9225-84). Принцип метода состоит в том, что в процессе жизнедеятельности бактерии выделяют в окружающую среду ферменты (редуктазы). Для исследования пробы на редуктазу в пробирки наливают по 1 см³ рабочего раствора Метиленового синего* и по 20 см³ молока, закрывают, трижды переворачивают пробирки, затем помещают в водяную баню (38 °С). Изменение окраски молока фиксируют через 40 мин, 2,5 и 3,5 ч. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания окраски молока. В зависимости от продолжительности обесцвечивания молоко относят к одному из 4 классов (табл. 4.5).

Исследование для выявления *S. aureus* проводят в соответствии с Государственным стандартом 30347-97, а плесеней и дрожжей — с Государственным стандартом 10444.12-88.

В процессе получения растительного лекарственного сырья возможно его инфицирование через воду, нестерильную аптечную посуду, воздух производственных помещений и руки персонала. Обсеменение происходит также за счет нормальной микрофлоры растений и фито-

Таблица 4.4. Характеристика микрофлоры кисломолочных продуктов

Наименование продукта	Ориентировочный состав микрофлоры
Творог, сметана, сыр домашний, простокваша обыкновенная	Молочнокислые стрептококки
Ацидофилин	Молочнокислые стрептококки и палочки, возможно наличие дрожжей
Кефир	Молочнокислые стрептококки и палочки, единичные дрожжи

Таблица 4.5. Оценка редуктазной пробы

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания	Ориентировочное количество бактерий, КОЕ/см ³ молока
Высший	Более 3,5 ч	Менее 300 тыс.
I	3,5 ч	300–500 тыс.
II	2,5 ч	500 тыс. — 4 млн
III	40 мин	4–20 млн

патогенных микроорганизмов — возбудителей заболеваний растений. Микроорганизмы находятся на поверхности (на листьях, стеблях, семенах) и на корнях растений.

Микроорганизмы на поверхности растений относятся к эпифитам (от греч. *epi* — над, *phyton* — растение). Они не наносят вреда, являются антагонистами некоторых фитопатогенных микроорганизмов, растут за счет обычных выделений растений и органических загрязнений поверхности растений. Эпифитная микрофлора усиливает иммунитет растений, защищая их от фитопатогенных микроорганизмов. Наибольшее количество эпифитной микрофлоры составляют грамотрицательные палочковидные бактерии *Erwinia herbicola* (новое название *Pantoea agglomerans*), служащие антагонистами возбудителя мягкой гнили овощей. Обнаруживают в норме и другие бактерии — *Pseudomonas fluorescens*, реже *Bacillus mesentericus* и небольшое количество грибов.

Состав микрофлоры растений зависит от вида, возраста растений, типа почвы и температуры окружающей среды. Нарушение поверхности растений и их семян способствует накоплению на них большого количества пыли и микроорганизмов. При повышении влажности численность эпифитных микроорганизмов возрастает, при понижении влажности — уменьшается.

Около корней растений в почве находится значительное количество микроорганизмов. Эта зона называется *ризосферой* (от греч. *rhiza* — корень, *sphaira* — шар). В ризосфере часто присутствуют псевдомонады и микобактерии, встречаются также актиномицеты, спорообразующие бактерии и грибы. Микроорганизмы ризосферы переводят различные субстраты в соединения, доступные для растений, синтезируют биологически активные соединения (витамины, антибиотики и др.), вступают в симбиотические взаимоотношения с растениями, обладают антагонистическими свойствами против фитопатогенных бактерий.

Микроорганизмы поверхности корня растений (микрофлора ризопланы) в большей степени, чем ризосфера, представлены псевдомонадами. Симбиоз мицелия грибов с корнями высших растений называют «микориза», то есть грибокорнем (от греч. *mykes* — гриб, *rhiza* — корень). Микориза улучшает рост растений.

Более загрязнены микроорганизмами растения окультуренных почв, чем растения лесов и лугов. Их много появляется на растениях, растущих на полях орошения, свалках, вблизи складирования навоза, в местах выпаса скота. При этом растения могут загрязняться патогенными микроорганизмами и при неправильной заготовке сырья являются

хорошей питательной средой для размножения микроорганизмов. Высушивание растений препятствует росту в них микроорганизмов.

К фитопатогенным микроорганизмам относят бактерии, вирусы и грибы. Болезни, вызываемые бактериями, называют *бактериозами*. К бактериозам относятся различные виды гнилей, некрозы тканей, увядание растений, развитие опухолей и др. Среди возбудителей бактериозов встречаются псевдомонады, микобактерии, эрвинии, коринебактерии, агробактерии и др. Возбудители бактериозов передаются через зараженные семена, остатки больных растений, почву, воду, воздух или путем переноса насекомыми, моллюсками, нематодами. Бактерии проникают в растения через устьица, нектарники и другие части растений, а также через небольшие повреждения. Представители рода *Erwinia* вызывают болезни типа ожога, увядания, мокрой или водянистой гнили, например *E. amylovora* — возбудитель ожога яблонь и груш, *E. carotovora* (новое название *Pectobacterium carotovorum*) — возбудитель мокрой бактериальной гнили. Псевдомонады (род *Pseudomonas*) вызывают бактериальную пятнистость (*P. syringae* и др.), при этом на листьях образуются разнообразные пятна. Поражают листья и бактерии рода *Xanthomonas*, которые, проникая в сосудистую систему растения и закупоривая ее элемент, вызывают пятнистость и гибель растения. Некоторые представители рода *Corynebacterium* и виды *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Clavibacter michiganensis* вызывают сосудистые и паренхиматозные заболевания растений. Гликопептиды этих бактерий повреждают клеточные мембраны сосудов, в результате чего происходят закупорка сосудов и гибель растения. Агробактерии рода *Agrobacterium* способствуют развитию различных опухолей у растений (корончатый галл, корень волосистой, рак стеблей), что обусловлено онкогенной плазмидой, передаваемой агробактериями в растительные клетки.

Вирусы вызывают болезни растений в виде мозаики и желтухи. При мозаичной болезни растений появляется мозаичная (пятнистая) расцветка пораженных листьев и плодов, растения отстают в росте. Желтуха проявляется карликовостью растений, измененными многочисленными боковыми побегами, цветками и т.д.

При употреблении продуктов питания из пораженного грибами зерна могут возникать пищевые отравления — микотоксикозы, например эрготизм — заболевание, возникающее при употреблении продуктов, приготовленных из зерна, зараженного спорыньей (гриб *Claviceps purpurea*). Гриб поражает в поле колоски злаковых: образуются склероции гриба, называемые рожками. В условиях повышенной влажности, низкой температуры

на вегетирующих или скошенных растениях могут развиваться грибы родов *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspeigillus* и др., вызывающие у людей микотоксикозы.

Для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами выращивают выносливые растения, очищают и обрабатывают семена, обеззараживают почву, удаляют пораженные растения, уничтожают переносчиков возбудителей болезней, обитающих на растениях.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Отметьте представителей микрофлоры кожи человека.

1. Коринеформные бактерии.
2. Эпидермальный стафилококк.
3. Кишечная палочка.
4. Дрожжеподобные грибы.

Б. Отметьте бактерии, определяющие колонизационную резистентность кишечника.

1. Бифидобактерии.
2. Лактобактерии.
3. Кандида.
4. Энтерококки.
5. Кишечная палочка.

В. Препарат Биовестин-лакто[®] состоит из бифидогенных факторов и биомассы *B. bifidum*, *L. plantarum*. Назовите группу препаратов, к которой он относится.

Г. Отметьте процессы, применяемые для стерилизации.

1. Автоклавирование.
2. Пастеризация.
3. Обработка сухим жаром.
4. Облучение γ -излучением.

Д. Отметьте вещества, применяемые для дезинфекции.

1. Пары этиленгликоля.
2. Четвертичные аммониевые соединения.
3. Хлорная известь.
4. 90–95% этиловый спирт.

Е. Санитарно-показательными микроорганизмами воды являются все, кроме (выберите):

1. Общих колиформных бактерий.
2. Термотолерантных колиформных бактерий.
3. Колифагов.
4. Гемолитических стрептококков.

Ж. При оценке качества питьевой воды централизованного водоснабжения определяют следующие микробиологические показатели.

1. Общее микробное число.
2. Общие колиформные бактерии.
3. Термотолерантные колиформные бактерии.
4. Холерные вибрионы.

З. С помощью аппарата Кротова осуществлен посев пробы воздуха. Скорость пробоотбора 20 л/мин, время работы 5 мин. На чашке выросло 70 колоний. Каково общее микробное число воздуха?

1. 700.
2. 1400.
3. 100.

И. Общая бактериальная обсемененность воздуха — это суммарное количество мезофильных микроорганизмов, содержащихся:

1. В 1 м³.
2. 100 см³.
3. 1 см³.

К. Укажите характер загрязнения почвы при наличии в ней большого количества энтерококков и колиформных бактерий.

1. Свежее фекальное.
2. Давнее фекальное.
3. Органическое.

Л. Плановое бактериологическое исследование объектов внешней среды лечебно-профилактического учреждения не предусматривает выявление:

1. Общей микробной обсемененности.
2. Золотистого стафилококка.
3. Синегнойной палочки.
4. Микроорганизмов семейства энтеробактерий.

М. При текущем санитарном надзоре за предприятиями общественного питания и торговли исследование смывов проводят на присутствие:

1. Колиформных бактерий.
2. Золотистого стафилококка.
3. Протеев.
4. Сальмонелл.



Глава 5

ГЕНЕТИКА МИКРОБОВ

5.1. СТРОЕНИЕ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ

Наследственная информация хранится у бактерий в форме последовательности нуклеотидов ДНК, которые определяют последовательность аминокислот в белке (строение ДНК изложено в разделе 3.1 и показано на рис. 3.1).

Каждому белку соответствует свой ген, то есть дискретный участок на ДНК, отличающийся числом и специфичностью последовательности нуклеотидов.

Совокупность всех генов бактерий называется *геномом*. Размеры генома определяются количеством нуклеотидных пар оснований (н.п.). Геном бактерий имеет гаплоидный набор генов. Бактериальный геном состоит из генетических элементов, способных к самостоятельной репликации (воспроизведению), то есть репликонов. Репликонами являются бактериальная хромосома и плазмиды.

5.1.1. Бактериальная хромосома

Бактериальная хромосома представлена одной двухцепочечной молекулой ДНК. Размеры бактериальной хромосомы у различных представителей домена *Procaryotae* варьируют. Например, у *E. coli* бактериальная хромосома содержит $4,7 \times 10^6$ н.п. На ней располагается около 4300 генов. Для сравнения: размеры ДНК вирусов составляют порядка 10^3 н.п., дрожжей — 10^7 н.п., а суммарная длина хромосомных ДНК человека составляет 3×10^9 н.п.

Бактериальная хромосома у *E. coli* представлена одной кольцевой молекулой ДНК. Одну кольцевую хромосому имеет также ряд других бактерий: *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*. Однако такое строение генома не является универсальным. У некоторых бактерий,

в частности у *V. cholerae*, *L. interrhogans*, *Brucella spp.*, имеется две кольцевых хромосомы. У ряда других бактерий (*B. burgdorferi*, *Streptomyces spp.*) обнаружены линейные хромосомы.

Бактериальная хромосома формирует компактный нуклеоид бактериальной клетки. Она кодирует жизненно важные для бактериальной клетки функции.

5.1.2. Плазмиды бактерий

Плазмиды представляют собой двухцепочечные молекулы ДНК размером от 10^3 до 10^6 н.п. Они могут быть кольцевой формой и линейными. Плазмиды кодируют не основные для жизнедеятельности бактериальной клетки функции, но придающие бактерии преимущества при попадании в неблагоприятные условия существования.

Среди фенотипических признаков, сообщаемых бактериальной клетке плазмидами, можно выделить следующие:

- устойчивость к антибиотикам;
- продукцию факторов патогенности;
- способность к синтезу антибиотических веществ;
- образование колицинов;
- расщепление сложных органических веществ;
- образование ферментов рестрикции и модификации. Репликация плазмид происходит независимо от хромосомы с участием того же набора ферментов, который осуществляет репликацию бактериальной хромосомы (см. раздел 3.1.7 и рис. 3.5).

Некоторые плазмиды находятся под строгим контролем. Это означает, что их репликация сопряжена с репликацией хромосомы так, что в каждой бактериальной клетке присутствует одна или, по крайней мере, несколько копий плазмид.

Число копий плазмид, находящихся под слабым контролем, может достигать от 10 до 200 на бактериальную клетку.

Для характеристики плазмидных репликонов их принято разбивать на группы совместимости. Несовместимость плазмид связана с неспособностью двух плазмид стабильно сохраняться в одной и той же бактериальной клетке. Несовместимость свойственна тем плазмидам, которые обладают высоким сходством репликонов, поддержание которых в клетке регулируется одним и тем же механизмом.

Плазмиды, которые могут обратимо встраиваться в бактериальную хромосому и функционировать в виде единого репликона, называются «интегративные», или «эписомы».

Плазмиды, способные передаваться из одной клетки в другую, иногда даже принадлежащую иной таксономической единице, называются «трансмиссивные» («конъюгативные»). Трансмиссивность присуща лишь крупным плазмидам, имеющим *tra*-оперон, в который объединены гены, ответственные за перенос плазмиды. Эти гены кодируют половые пили, которые образуют мостик с клеткой, не содержащей трансмиссивную плазмиду, по которой плазмидная ДНК передается в новую клетку. Этот процесс называется *конъюгацией* (подробно он будет рассмотрен в разделе 5.4.1). Бактерии, несущие трансмиссивные плазмиды, чувствительны к «мужским» нитевидным бактериофагам.

Мелкие плазмиды, не несущие *tra*-гены, не могут передаваться сами по себе, но способны к передаче в присутствии трансмиссивных плазмид, используя их аппарат конъюгации. Такие плазмиды называют «мобилизуемые», а сам процесс — «мобилизация» нетрансмиссивной плазмиды.

Особое значение в медицинской микробиологии имеют плазмиды, обеспечивающие устойчивость бактерий к антибиотикам, которые получили название R-плазмид (от англ. *resistance* — противодействие), и плазмиды, обеспечивающие продукцию факторов патогенности, способствующих развитию инфекционного процесса в макроорганизме. R-плазмиды содержат гены, детерминирующие синтез ферментов, разрушающих антибактериальные препараты (например, антибиотики). В результате наличия такой плазмиды бактериальная клетка становится устойчивой (резистентной) к действию целой группы лекарственных веществ, а иногда и к нескольким препаратам. Многие R-плазмиды являются трансмиссивными, распространяясь в популяции бактерий, делая ее недоступной к воздействию антибактериальных препаратов. Бактериальные штаммы, несущие R-плазмиды, очень часто являются этиологическими агентами внутрибольничных инфекций.

Плазмиды, детерминирующие синтез факторов патогенности, в настоящее время обнаружены у многих бактерий, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний человека. Патогенность возбудителей шигеллезов, иерсиниозов, чумы, сибирской язвы, иксодового бореллиоза, кишечных эшерихиозов связана с наличием у них и функционированием плазмид патогенности.

Некоторые бактериальные клетки содержат плазмиды, детерминирующие синтез бактерицидных по отношению к другим бактериям веществ. Например, некоторые *E. coli* владеют *Col*-плазмидой, определяющей синтез колицинов, обладающих микробоцидной активностью

по отношению к колиформным бактериям. Бактериальные клетки, несущие такие плазмиды, обладают преимуществами при заселении экологических ниш.

Плазмиды используются в практической деятельности человека, в частности в генной инженерии при конструировании специальных рекомбинантных бактериальных штаммов, вырабатывающих в большом количестве биологически активные вещества (см. гл. 6).

5.1.3. Подвижные генетические элементы

Подвижные генетические элементы обнаружены в составе бактериального генома как в бактериальной хромосоме, так и в плазмидах. К подвижным генетическим элементам относятся:

- вставочные последовательности;
- транспозоны.

Вставочные (инсерционные) последовательности — IS-элементы (от англ. *insertion sequences*) — это участки ДНК, способные как целое перемещаться из одного участка репликона в другой, а также между репликонами. IS-элементы имеют размеры 1000 н.п. и содержат лишь те гены, которые необходимы для их собственного перемещения — транспозиции: ген, кодирующий фермент транспозазу, обеспечивающую процесс исключения IS-элемента из ДНК и его интеграцию в новый локус, и ген, детерминирующий синтез репрессора, который регулирует весь процесс перемещения. Эти гены по флангам окружены *инвертированными повторами*, которые служат сайтами рекомбинации, сопровождающей перемещения вставочной последовательности при участии транспозиционных ферментов, в частности транспозаз.

Инвертированные повторы узнает фермент транспозаза (рис. 5.1), которая осуществляет одноцепочечные разрывы цепей ДНК, расположенных по обе стороны от подвижного элемента. Оригинальная копия IS-элемента остается на прежнем месте, а ее реплицированный дубликат перемещается на новый участок.

Перемещение подвижных генетических элементов принято называть репликативной или незаконной рекомбинацией. Однако, в отличие от бактериальной хромосомы и плазмид, подвижные генетические элементы не являются самостоятельными репликонами, так как их репликация — составной элемент репликации ДНК репликона, в составе которого они находятся.

IS-элементы различаются по размеру, типу и количеству инвертированных повторов.

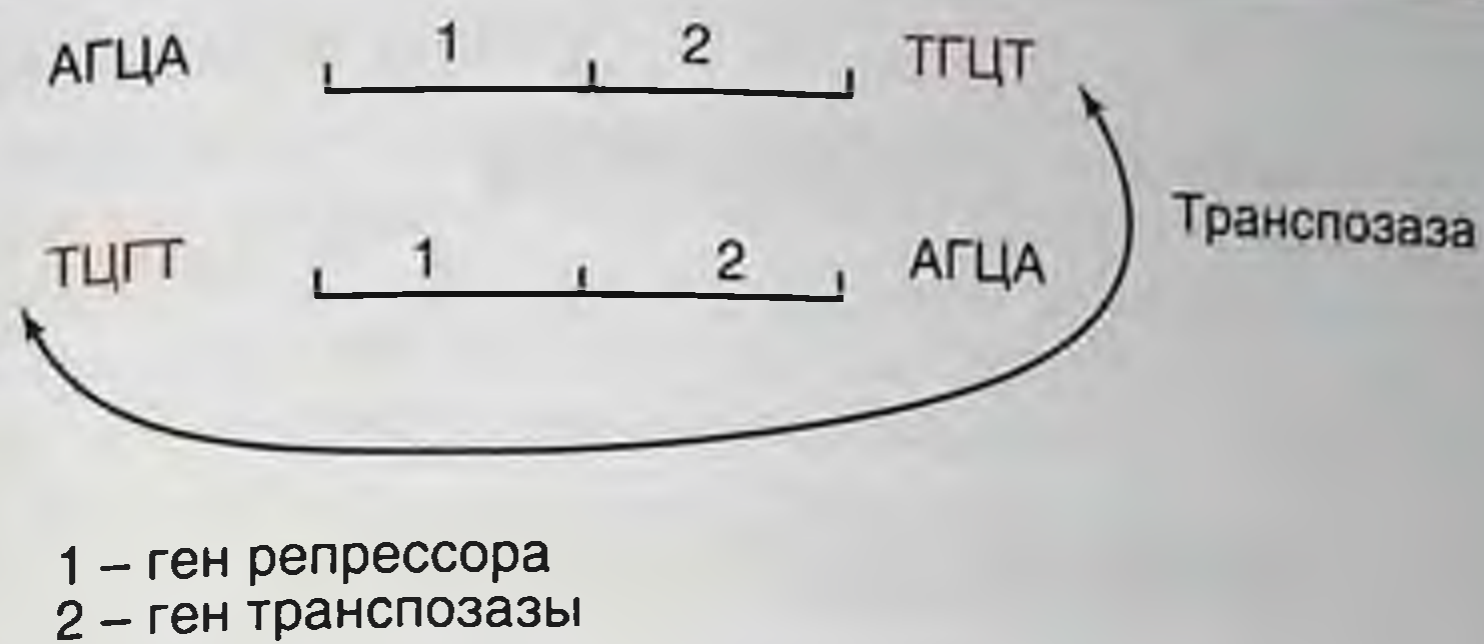


Рис. 5.1. Схема строения IS-элемента: 1 — ген репрессора; 2 — ген транспозазы (стрелками указаны места разрывов)

Транспозоны — это сегменты ДНК, обладающие теми же свойствами, что и IS-элементы, но имеющие в своем составе структурные гены, то есть гены, обеспечивающие синтез молекул, обладающих специфическим биологическим свойством, например токсичностью, или обеспечивающих устойчивость к антибиотикам.

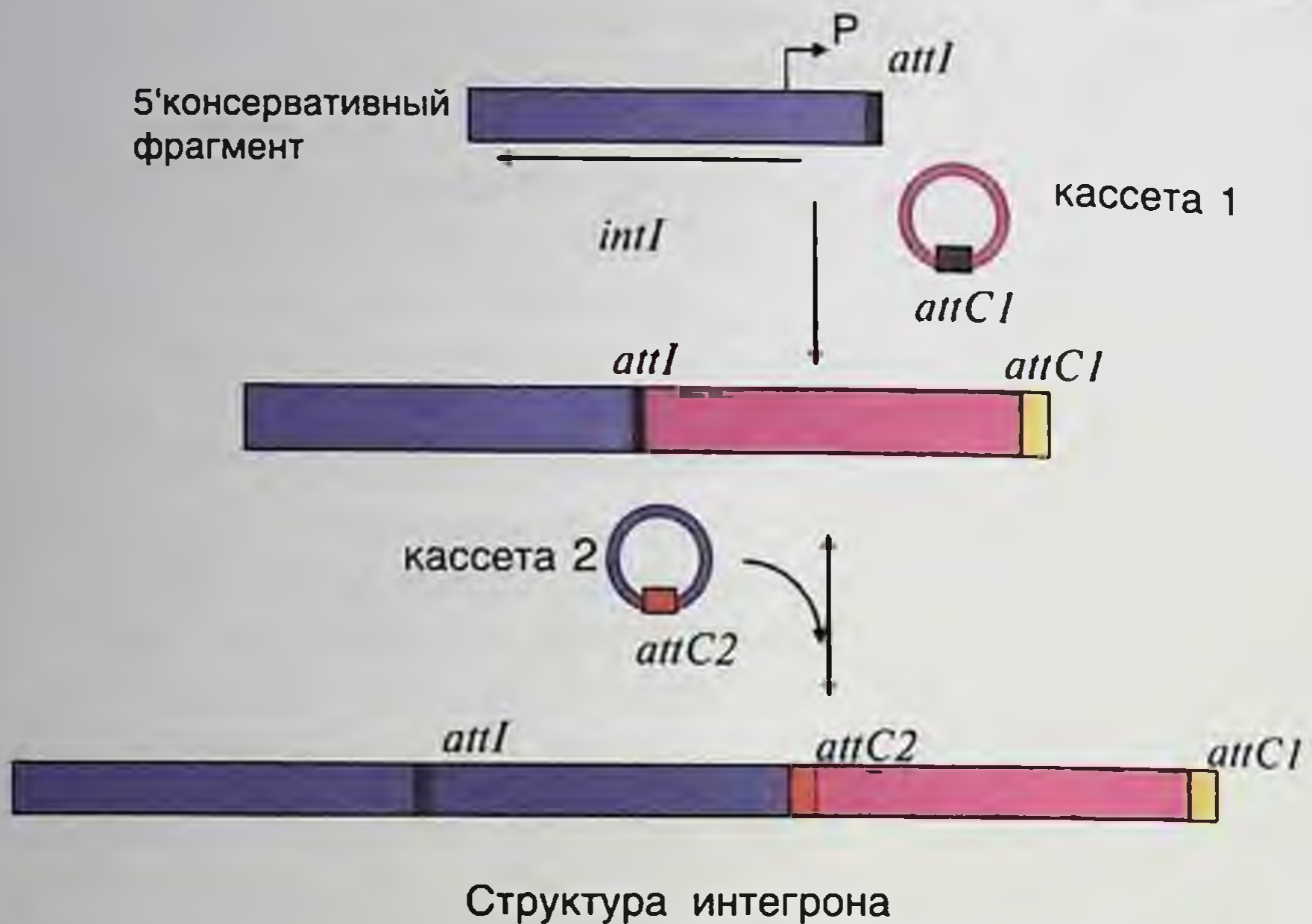
Перемещение подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами вызывает:

- инактивацию генов тех участков ДНК, куда они, переместившись, встраиваются;
- образование повреждений генетического материала;
- слияние репликонов, то есть встраивание плазмиды в хромосому;
- распространение генов в популяции бактерий, что может приводить к изменению биологических свойств популяции, смене возбудителей инфекционных заболеваний, а также способствует эволюционным процессам среди микробов.

5.1.4. Интегроны

Помимо плазмид и подвижных генетических элементов, у бактерий существует еще одна система, способствующая распространению генов, — система интегронов. **Интегроны** являются системой захвата малых элементов ДНК, называемых «генные кассеты», посредством сайт-специфической рекомбинации и их экспрессии.

Интегрон состоит из консервативного участка, расположенного на 5'-конце, который содержит ген, кодирующий фермент интегразу, сайт рекомбинации *att* и промотор Р (рис. 5.2).



Структура интегрона

Рис. 5.2. Строение интегрона: *attI* — сайт рекомбинации интегрона; *intI* — ген, кодирующий интегразу; P — промотор; *attC* — сайты рекомбинации кассет антибиотикорезистентности

Кассета может существовать в двух формах: линейной, когда кассета интегрирована в интегрон, и в виде маленькой кольцевой двухцепочечной ДНК. Кассеты имеют размеры от 260 до 1500 н.п. Они содержат преимущественно 1 ген антибиотикорезистентности и сайт рекомбинации, состоящий из 59 пар оснований, расположенный на 3'-конце.

Интеграза осуществляет рекомбинацию между участком 59 н.п. кассеты и участком *att* интегрона, включая гены кассеты в интегрон в такой ориентации, чтобы они могли экспрессироваться с промотора P интегрона. Интеграция кассет в интегрон является обратимым процессом. Интегроны могут располагаться как на хромосоме, так и на плазмидах. Поэтому возможно перемещение кассет с одного интегрона на другой как в пределах одной бактериальной клетки, так и по популяции бактерий. Один интегрон может захватывать несколько кассет антибиотикорезистентности. Изменения бактериального генома, а следовательно, и свойств бактерий могут происходить в результате мутаций и рекомбинаций.

5.1.5. Острова патогенности

В геноме патогенных бактерий (см. гл. 7) имеются участки ДНК протяженностью не менее 10 000 пар нуклеотидов, которые отличаются от основного генома составом G—C-пар нуклеотидных оснований. Эти участки ответственны за синтез факторов патогенности, которые обеспечивают развитие патологического процесса в организме хозяина, поэтому были названы **островами патогенности**. Острова патогенности обычно по флангам имеют прямые повторы последовательностей ДНК или IS-элементы. Некоторые имеют в своем составе участки, характерные для сайтов интеграции, расположенных вблизи генов тРНК. Большинство островов патогенности локализовано на хромосоме бактерий (*Salmonella*), но также они могут находиться в составе плазмид (*Shigella*) и фаговых ДНК (*V. cholerae* O1, O139).

5.1.6. Системы регуляции экспрессии генома.

Защита от чужеродной дезоксирибонуклеиновой кислоты

Установлено, что в процессе регуляции генной активности принимают участие малые, длиной 50—200 нуклеотидов sРНК (от англ. *small* — маленький). Они реализуют свою регуляторную функцию или непосредственно связываются с комплементарной последовательностью иРНК, вызывая изменение ее вторичной структуры, способствуя тем самым процессу трансляции или связываясь с белком, обозначенным как Cas9, обладающим эндонуклеазной активностью. В последнем случае комплекс sРНК—Cas9 соединяется с комплементарным участком проникшей в клетку ДНК, уничтожая ее. Этим механизмом осуществляется так называемый *адаптивный иммунитет* бактериальной клетки, к повторному проникновению в нее умеренного фага, плазмиды или транспозонов. Реализация этого происходит с участием РНК—Cas9 через *CRISPR* (*clustered regularly interspaced short palindromic repeated*), короткие палиндромные повторы, которые разделены вставками, представляющие чужеродный генетический материал (ДНК умеренных фагов и плазмид). При повторном попадании в бактериальную клетку ДНК фага или плазмиды sРНК транскрибируются с *CRISPR*, соединяются с Cas9 и этим комплексом соединяются с комплементарным участком внедренной ДНК, разрушая ее (рис. 5.3).



Рис. 5.3. Иммуитет к повторному проникновению гомологичной плазмиды и умеренного бактериофага в бактериальную клетку с участием CRISPR (схема)

5.2. МУТАЦИИ У БАКТЕРИЙ

Мутации — это изменения в последовательности отдельных нуклеотидов ДНК, которые фенотипически ведут к таким проявлениям, как изменения морфологии бактериальной клетки, возникновение потребностей в факторах роста, например в аминокислотах, витаминах, то есть ауксотрофности, к устойчивости к антибиотикам, изменению чувствительности к температуре, снижению вирулентности (аттенюация) и т.д.

Мутация, приводящая к потере функции, называется прямой мутацией. У мутантов может произойти восстановление исходных свойств, то есть реверсия (от англ. *reverse* — обратный). Если происходит восстановление исходного генотипа, то мутация, восстанавливающая генотип и фенотип, называется обратной или прямой *реверсией*. Если мутация восстанавливает фенотип, не восстанавливая генотип, то такая мутация имеет название «супрессорная». Супрессорные мутации могут возник-

как в пределах того самого гена, в котором произошла первичная мутация, так и в других генах, или могут быть связаны с мутациями в тРНК.

По протяженности изменений повреждения ДНК различают мутации точечные, когда повреждения ограничиваются одной парой нуклеотидов, и протяженные, или аберрации. В последнем случае могут наблюдаться выпадения нескольких пар нуклеотидов, которые называются «делеция», добавление нуклеотидных пар, то есть *дупликации*, перемещения фрагментов хромосомы, *транслокации* и перестановки нуклеотидных пар — *инверсии*.

Мутации могут быть:

- спонтанными, то есть возникающими самопроизвольно, без воздействия извне;
- индуцированными.

Точечные спонтанные мутации возникают в результате ошибок при репликации ДНК, что связано с таутомерным перемещением электронов в азотистых основаниях.

Тимин (Т), например, обычно находится в кетоформе, в которой он способен образовывать водородные связи с аденином (А). Однако если тимин во время спаривания оснований при репликации ДНК переходит в енольную форму, то он спаривается с гуанином. В результате в новой молекуле ДНК на месте, где раньше стояла пара А—Т, появляется пара Г—Ц.

Спонтанные хромосомные аберрации возникают вследствие перемещения подвижных генетических элементов.

Индукцированные мутации появляются под влиянием внешних факторов, которые называются «мутагены». Мутагены бывают физическими (ультрафиолетовые лучи, γ -радиация), химическими (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, азотистая кислота и ее аналоги и другие соединения) и биологическими — транспозоны.

Аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, например 2-аминопурин, 5-бромурацил, включаются в нуклеотиды, а следовательно, и в ДНК, но при этом они значительно чаще в силу таутомерных превращений спариваются с «неправильными» партнерами, в результате вызывая замену пурина другим пурином (А—Г) или пиримидина другим пиримидином (Т—Ц). Замена пурина другим пурином, а пиримидина другим пиримидином называется «транзиция».

Азотистая кислота и ее аналоги вызывают дезаминирование азотистых оснований, результатом чего являются ошибки при спаривании и,

как следствие, возникновение транзиции. Аденин в результате дезаминирования превращается в гипоксантин, который спаривается с цитозинном, что приводит к возникновению транзиции АТ–ГЦ. Гуанин же при дезаминировании превращается в ксантин, который по-прежнему спаривается с цитозинном; таким образом, дезаминирование гуанина не сопровождается мутацией.

Акридин и профлавин внедряются между соседними основаниями цепи ДНК, вдвое увеличивая расстояние между ними. Это пространственное изменение при репликации может привести как к утрате нуклеотида, так и к включению дополнительной нуклеотидной пары, что приводит к *сдвигу рамки считывания* тРНК. Начиная с того места, где произошло выпадение или включение нуклеотида, информация считывается неправильно.

Ультрафиолетовое облучение затрагивает преимущественно пиримидиновые основания, при этом два соседних остатка тимина ДНК могут оказаться ковалентно связанными.

На бактериях, подвергнутых ультрафиолетовому облучению, было показано, что повреждения, вызванные облучением в бактериальных ДНК, могут частично исправляться благодаря наличию *репарационных систем*. У различных бактерий имеется несколько типов репарационных систем. Один тип репарации протекает на свету, он связан с деятельностью фотореактивирующегося фермента, который расщепляет тиминовый димер. При темновой репарации дефектные участки цепи ДНК удаляются и образовавшаяся брешь достраивается с помощью ДНК-полимеразы на матрице сохранившейся цепи и соединяется с цепью лигазой.

5.3. РЕКОМБИНАЦИЯ У БАКТЕРИЙ

Генетическая рекомбинация — это взаимодействие между двумя ДНК, обладающими различными генотипами, которое приводит к образованию рекомбинантной ДНК, сочетающей гены обоих родителей.

Особенности рекомбинации у бактерий определяет отсутствие полового размножения и мейоза, в процессе которых у высших организмов происходят рекомбинация, гаплоидный набор генов. В процессе рекомбинации бактерии условно делятся на клетки-доноры, которые передают генетический материал, и клетки-реципиенты, которые воспринимают его. В клетку-реципиент проникает не вся, а только часть хромосомы клетки-донора, что приводит к формированию неполной

зиготы — мерозиготы. В результате рекомбинации в мерозиготе образуется только один рекомбинант, генотип которого представлен в основном генотипом реципиента, с включенным в него фрагментом хромосомы донора. Реципрокные рекомбинанты не образуются.

По молекулярному механизму генетическая рекомбинация у бактерий делится:

- на гомологичную;
- сайт-специфическую;
- незаконную.

5.3.1. Гомологичная рекомбинация

При гомологичной рекомбинации в процессе разрыва и воссоединения ДНК происходит обмен между участками ДНК, обладающими высокой степенью гомологии. Процесс гомологичной рекомбинации находится под контролем генов, объединенных в *REC*-систему, состоящую из генов *recA*, *B*, *C*, *D*. Продукты этих генов производят расплетание нитей ДНК и их переориентацию с образованием полухиазмы, структуры Холлидея, а также разрезают структуру Холлидея для завершения процесса рекомбинации.

5.3.2. Сайт-специфическая рекомбинация

Этот тип рекомбинации не зависит от функционирования генов *recA*, *B*, *C*, *D*, не требует протяжных участков гомологии ДНК, но для его протекания необходимы строго определенные последовательности ДНК и специальный ферментативный аппарат, специфичные для каждого конкретного случая. Примером этого типа рекомбинации является встраивание плазмиды в хромосому бактерий, которое происходит между идентичными IS-элементами хромосомы и плазмиды, интеграция ДНК фага лямбда в хромосому *E. coli*. Сайт-специфическая рекомбинация, происходящая в пределах одного репликона, участвует также в переключении активности генов. Например, у сальмонелл следствием этого процесса являются фазовые вариации жгутикового H-антигена.

5.3.3. Незаконная, или репликативная, рекомбинация

Незаконная, или репликативная, рекомбинация не зависит от функционирования генов *recA*, *B*, *C*, *D*. Примером ее является транспозиция

подвижных генетических элементов по репликону или между репликонами, при этом, как уже было отмечено в разделе 5.1.3, транспозиция подвижного генетического элемента сопровождается репликацией ДНК.

Рекомбинация является конечным этапом передачи генетического материала между бактериями, которая осуществляется тремя механизмами: конъюгацией (при контакте бактерий, одна из которых несет конъюгативную плазмиду), трансдукцией (с помощью бактериофага), трансформацией (с помощью высокополимеризованной ДНК).

5.4. ПЕРЕДАЧА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ У БАКТЕРИЙ

5.4.1. Конъюгация

Передача генетического материала от клетки-донора в клетку-реципиент путем непосредственного контакта клеток называется «конъюгация», впервые она была обнаружена Дж. Ледербергом и Э. Тейтумом в 1946 г.

Необходимым условием для конъюгации является наличие в клетке-доноре трансмиссивной плазмиды. Трансмиссивные плазмиды кодируют секреторную систему IV типа (см. гл. 3), аппарат которой формирует пиллю, образующую конъюгационную трубочку между клеткой-донором и клеткой-реципиентом, по ней плазмидная ДНК передается в новую клетку. Механизм передачи плазмидной ДНК из клетки в клетку заключается в том, что специальный белок, кодируемый *tra*-опероном, узнает определенную последовательность в ДНК плазмиды (называемую от англ. *origin* — начало), вносит в эту последовательность одноцепочечный разрыв и ковалентно связывается с 5'-концом. Затем цепь ДНК, с которой связан белок, переносится в клетку-реципиент, а неразорванная комплементарная цепь остается в клетке-доноре. Клеточный аппарат синтеза ДНК достраивает одиночные цепи и в доноре, и в реципиенте до двухцепочечной структуры. Белок, связанный с 5'-концом перенесенной цепи, способствует замыканию плазмиды в реципиентной клетке в кольцо. Этот процесс представлен на рис. 5.4, на примере переноса в реципиентную клетку плазмиды F (от англ. *fertility* — плодовитость), которая является как трансмиссивной, так и интегративной плазмидой. Клетки-доноры, обладающие F-фактором, обозначаются

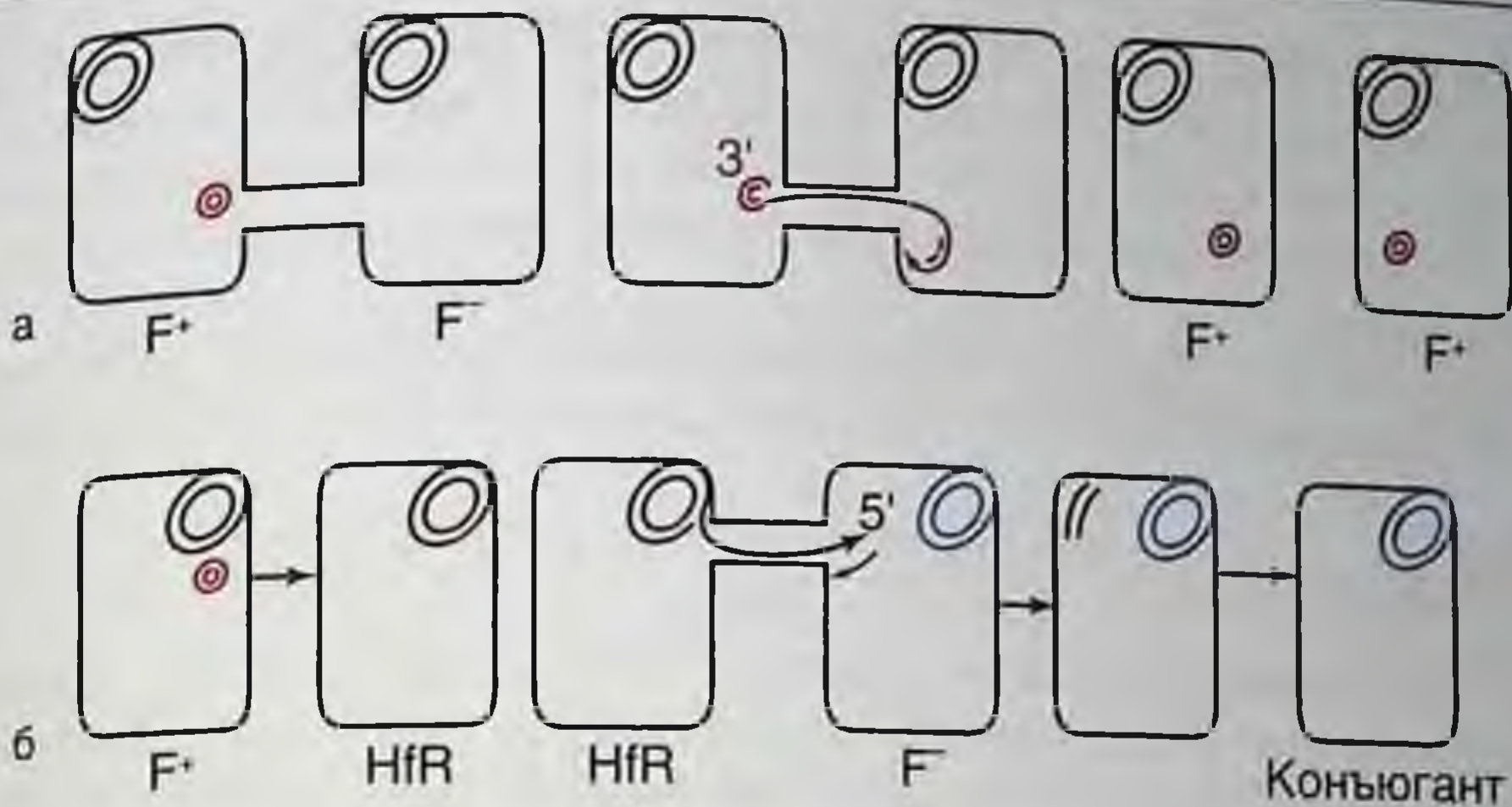


Рис. 5.4. Схема конъюгации у бактерий: а — передача F-плазмиды из F^+ - в F^- -клетку; б — передача бактериальной хромосомы $Hfr \times F$

как F^+ -клетки, а клетки-реципиенты, не имеющие F-фактора, обозначаются как F^- -клетки. Если F-фактор находится в клетке-доноре в автономном состоянии, то в результате скрещивания $F^+ \times F^-$ клетка-реципиент приобретает донорские свойства.

Если F-фактор или другая трансмиссивная плазмида встраиваются в хромосому клетки-донора, то плазмида и хромосома начинают функционировать в виде единого трансмиссивного репликона, что делает возможным перенос бактериальных генов в бесплазмидную клетку-реципиент, то есть происходит процесс конъюгации. Штаммы, в которых плазмида находится в интегрированном состоянии, переносят свои хромосомные гены бесплазмидным клеткам с высокой частотой и поэтому называются *Hfr* (от англ. *high frequency of recombination* — высокая частота рекомбинации) (см. рис. 5.4, б).

Процесс переноса хромосомных генов в случае скрещивания $Hfr \times F^-$ всегда начинается с расщепления ДНК в одной и той же точке — в месте интеграции F-фактора или другой трансмиссивной плазмиды. Одна нить донорской ДНК передается через конъюгационный мостик в реципиентную клетку. Процесс сопровождается достраиванием комплементарной нити до образования двунитевой структуры. Перенос хромосомных генов при конъюгации всегда имеет одинаковую направленность, противоположную встроенной плазмиде. Сама трансмиссивная плазмида передается последней. Переданная в реципиентную клетку и достроенная до двунитевой структуры нить ДНК донора рекомбинирует

с гомологичным участком реципиентной ДНК с образованием стабильной генетической структуры. Из-за хрупкости конъюгационного мостика половой фактор редко передается в клетку-реципиент, поэтому образовавшийся рекомбинант донорскими функциями, как правило, не обладает.

Вследствие направленности передачи генов конъюгация используется для картирования генома бактерий и построения генетической карты.

5.4.2. Трансдукция

Трансдукцией называют передачу бактериальной ДНК посредством бактериофага. Этот процесс был открыт в 1951 г. Н. Циндером и Дж. Ледербергом. В процессе репликации фага внутри бактерий (см. раздел 3.3) фрагмент бактериальной ДНК проникает в фаговую частицу и переносится в реципиентную бактерию во время фаговой инфекции.

Существует два типа трансдукции.

1. *Общая трансдукция* — перенос бактериофагом сегмента любой части бактериальной хромосомы, происходит вследствие того, что в процессе фаговой инфекции бактериальная ДНК фрагментируется, и фрагмент бактериальной ДНК того же размера, что и фаговая ДНК, проникает в фаговую головку, формируя дефектную фаговую частицу. Этот процесс происходит с частотой приблизительно 1 на 1000 фаговых частиц (рис. 5.5, а). При инфицировании клетки-реципиента дефектной фаговой частицей ДНК клетки-донора «впрыскивается» в нее и рекомбинирует гомологичной рекомбинацией с гомологичным участком хромосомы-реципиента с образованием стабильного рекомбинанта. Этим типом трансдукции обладают β -фаги.
2. *Специфическая трансдукция* наблюдается в том случае, когда фаговая ДНК интегрирует в бактериальную хромосому с образованием профага. В процессе исключения ДНК-фага из бактериальной хромосомы в результате случайного процесса захватывается прилегающий к месту включения фаговой ДНК фрагмент бактериальной хромосомы, становясь дефектным фагом (рис. 5.5, б). Поскольку большинство умеренных бактериофагов интегрирует в бактериальную хромосому в специфических участках, для таких бактериофагов характерен перенос в клетку-реципиент определенного участка бактериальной ДНК клетки-донора. ДНК дефектного фага



Рис. 5.5. Схема трансдукции: а — неспецифическая (общая); б — специфическая

рекомбинирует с ДНК клетки-реципиента сайт-специфической рекомбинацией. Рекомбинант становится меродиплоидом по привнесённому гену. В частности, бактериофаг передает специфической трансдукцией *gal*-ген у *E. coli*.

5.4.3. Трансформация

Феномен трансформации впервые был описан в 1928 г. Ф. Гриффитсом, обнаружившим превращение бескапсульного R-штамма пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*) в штамм, образующий капсулу S-формы. Гриффитс ввел мышам одновременно небольшое количество авирулентных R-клеток и убитых нагреванием S-клеток. R-клетки были получены от штамма, капсульное вещество которого принадлежало к типу S II, а убитые нагреванием S-штаммы — к типу S III. Из крови погибших мышей были выделены вирулентные пневмококки с капсулой S III.

В 1944 г. О. Эвери, К. Мак-Леод, М. Мак-Карти установили природу трансформирующего фактора, показав, что ДНК, экстрагированная из инкапсулированных пневмококков, может трансформировать некапсулированные пневмококки в инкапсулированную форму. Таким образом, было доказано, что именно ДНК является носителем генетической информации.

Процесс трансформации может самопроизвольно происходить в природе у некоторых видов бактерий *B. subtilis*, *H. influenzae*.

S. pneumoniae, когда ДНК, выделенная из погибших клеток, захватывается реципиентными клетками. Процесс трансформации зависит от компетентности клетки-реципиента и состояния донорской трансформирующей ДНК.

Компетентность — это способность бактериальной клетки поглощать ДНК. Она зависит от присутствия особых белков в клеточной мембране, обладающих специфическим аффинитетом к ДНК. Состояние компетентности у грамположительных бактерий связано с определенными фазами кривой роста. Состояние компетентности у грамотрицательных бактерий приходится создавать искусственным путем, подвергая бактерии температурному или электрошоку.

Трансформирующей активностью обладает только двунитевая высокоспирализованная молекула ДНК. Это связано с тем, что в клетку-реципиент проникает только одна нить ДНК, тогда как другая — на клеточной мембране — подвергается деградации с высвобождением энергии, которая необходима для проникновения в клетку сохранившейся нити. Высокая молекулярная масса трансформирующей ДНК увеличивает шанс рекомбинации, так как внутри клетки трансформирующая нить ДНК подвергается воздействию эндонуклеаз. Интеграция с хромосомой требует наличия гомологичных с ней участков у трансформирующей ДНК. Рекомбинация происходит на одной нити, в результате чего образуется гетеродуплексная молекула, одна нить которой имеет генотип реципиента, а другая — рекомбинантный генотип. Рекомбинантные трансформанты формируются только после цикла репликации (рис. 5.6).

В настоящее время этот метод является основным методом генной инженерии, используемым при конструировании рекомбинантных штаммов с заданным геномом.



Рис. 5.6. Схема трансформации

5.5. ОСОБЕННОСТИ ГЕНЕТИКИ ВИРУСОВ

Особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и на РНК в зависимости от типа вируса.

Мутации у вирусов могут возникать спонтанно в процессе репликации нуклеиновой кислоты вируса, а также под влиянием тех же внешних факторов и мутагенов, что и у бактерий.

Фенотипически мутации вирусного генома проявляются изменениями антигенной структуры, неспособностью вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке, чувствительностью продуктивного цикла к температуре, а также изменением формы и размера бляшек, которые образуют вирусы в культуре клеток под агаровым покрытием (см. раздел 3.2).

Свойства вирусов могут изменяться при одновременном заражении несколькими вирусами чувствительной клетки, причем изменения свойств при таких условиях могут происходить в результате как обмена между материалами нуклеиновых кислот, принадлежащих разным вирусам (генетическая рекомбинация и генетическая реактивация), так и процессов, не сопровождаемых обменом генетического материала (комплементация и фенотипическое смешивание).

Генетическая рекомбинация встречается чаще у ДНК-содержащих вирусов. Среди РНК-содержащих вирусов она наблюдается у тех из них, которые обладают фрагментированным геномом, например у вируса гриппа. При рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками генома.

Генетическая реактивация наблюдается между геномами родственных вирусов, имеющих мутации в разных генах. В результате перераспределения генетического материала формируется полноценный дочерний геном.

Комплементация встречается в том случае, когда один из двух вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет его отсутствие у мутантного вируса.

Фенотипическое смешивание наблюдается в том случае, если при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при сохранении неизменности генотипа.

5.6. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Генетические методы применяются в практических целях как для обнаружения микроба в исследуемом материале без выделения чистой культуры, так и для определения таксономического положения микроба и проведения внутривидовой идентификации.

5.6.1. Методы, используемые для внутривидовой идентификации бактерий

Рестрикционный анализ основан на применении ферментов, носящих название «рестриктаз». Рестриктазы представляют собой эндонуклеазы, которые расщепляют молекулы ДНК, разрывая фосфатные связи не в произвольных местах, а в определенных последовательностях нуклеотидов. Особое значение для методов молекулярной генетики имеют рестриктазы, которые узнают последовательности, обладающие центральной симметрией и считывающиеся одинаково в обе стороны от оси симметрии, так называемыми *палиндромами*. Точка разрыва ДНК может или совпадать с осью симметрии, или быть сдвинута относительно нее.

В настоящее время из различных бактерий выделено и очищено более 175 различных рестриктаз, для которых известны сайты (участки) узнавания (рестрикции). Выявлено более 80 различных типов сайтов, в которых может происходить разрыв двойной спирали ДНК. В геноме конкретной таксономической единицы находится строго определенное (генетически задетерминированное) число участков узнавания для определенной рестриктазы. Если выделенную из конкретного микроба ДНК обработать определенной рестриктазой, то это приведет к образованию строго определенного количества фрагментов ДНК фиксированного размера. Размер каждого типа фрагментов можно узнать с помощью электрофореза в агарозном геле: мелкие фрагменты перемещаются в геле быстрее, чем более крупные фрагменты, и длина их пробега больше. Гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют в ультрафиолетовом излучении. Таким способом можно получить рестрикционную карту определенного вида микробов.

Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенных из различных штаммов, можно определить их генетическое родство, выявить

принадлежность к определенному виду или роду, а также обнаружить участки, подвергнутые мутациям. Этот метод используется также как начальный этап метода определения последовательности нуклеотидных пар (секвенирования) и метода молекулярной гибридизации.

Определение плазмидного профиля бактерий. Плазмидный профиль позволяет произвести внутривидовую идентификацию бактерий. Для этого из бактериальной клетки выделяют плазмидную ДНК, которую разделяют электрофорезом в агарозном геле для определения количества и размеров плазмид.

Риботипирование. Последовательность нуклеотидных оснований в оперонах, кодирующих рРНК, характеризуется наличием как консервативных участков, которые подверглись малым изменениям в процессе эволюции и имеют сходное строение у различных бактерий, так и переменных последовательностей, которые родо- и видоспецифичны и являются маркерами при генетической идентификации. Эти опероны представлены на бактериальной хромосоме в нескольких копиях. Фрагменты ДНК, полученные после обработки ее рестриктазами, содержат последовательности генов рРНК, которые могут быть обнаружены методом молекулярной гибридизации с меченой рРНК соответствующего вида бактерий. Количество и локализация копий оперонов рРНК и рестрикционный состав сайтов, как внутри рРНК-оперона, так и по его флангам, варьируют у различных видов бактерий. На основе этого свойства построен метод *риботипирования*, который позволяет производить мониторинг выделенных штаммов и определение их вида. В настоящее время риботипирование проводится в автоматическом режиме в специальных приборах.

Мультилокусное секвенирование-типирование. Метод генетического типирования, основанный на определении последовательности нуклеотидов в небольших фрагментах (500 н.п.) ряда генов, с последующим сравнением соответствующих последовательностей у разных микроорганизмов. Чаще анализу подвергаются «гены домашнего хозяйства», которые необходимы для протекания реакций основного метаболизма бактериальной клетки и, следовательно, присутствуют у всех бактерий. В силу своей исключительной важности они характеризуются низкой скоростью накопления мутаций.

Сравнение нуклеотидных последовательностей таких генов позволяет легко установить степень филогенетического родства между популяциями и систематизировать их.

5.6.2. Методы, используемые для обнаружения микроба без выделения его в чистую культуру

Метод молекулярной гибридизации позволяет выявить степень сходства различных ДНК. Применяется при идентификации микробов для определения их точного таксономического положения, а также для обнаружения микроба в исследуемом материале без его выделения в чистую культуру. Метод основан на способности двухцепочечной ДНК при повышенной температуре (90 °С) в щелочной среде денатурировать, то есть расплетаться на две нити, а при понижении температуры на 10 °С вновь восстанавливать исходную двухцепочечную структуру. Метод требует наличия молекулярного зонда.

Зондом называется одноцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, меченная радиоактивными нуклидами, ферментом, флюорохромным красителем, с которой сравнивают исследуемую ДНК.

Для проведения молекулярной гибридизации исследуемую ДНК расплетают указанным выше способом, одну нить фиксируют на специальном фильтре, который затем помещают в раствор, содержащий зонд. Создаются условия, благоприятные для образования двойных спиралей. При наличии комплементарности между зондом и исследуемой ДНК они образуют между собой двойную спираль, факт которой фиксируют методами в зависимости от типа метки зонда: подсчетом радиоактивности, иммуноферментным анализом или денситометрией.

Определение наличия микроба в исследуемом материале с помощью микрочипа

Микрочип представляет стеклянную пластинку, с которой связано от 100 до 1000 молекулярных ДНК-зондов, представляющих последовательность нуклеотидов, специфичных для данной таксономической единицы, локализованных в определенных участках (рис. 5.7).

Из исследуемого образца выделяют общую ДНК, которую можно амплифицировать по стабильной последовательности 16S РНК-гену. Выделенную ДНК метят флуорохромом или ферментом и обрабатывают ею микрочип, создавая условия для гибридизации. Отмывают несвязавшуюся ДНК, определяют локализацию молекулярных гибридов постановкой иммуноферментного анализа или денситометрией.

Полимеразная цепная реакция позволяет обнаружить микроб в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.

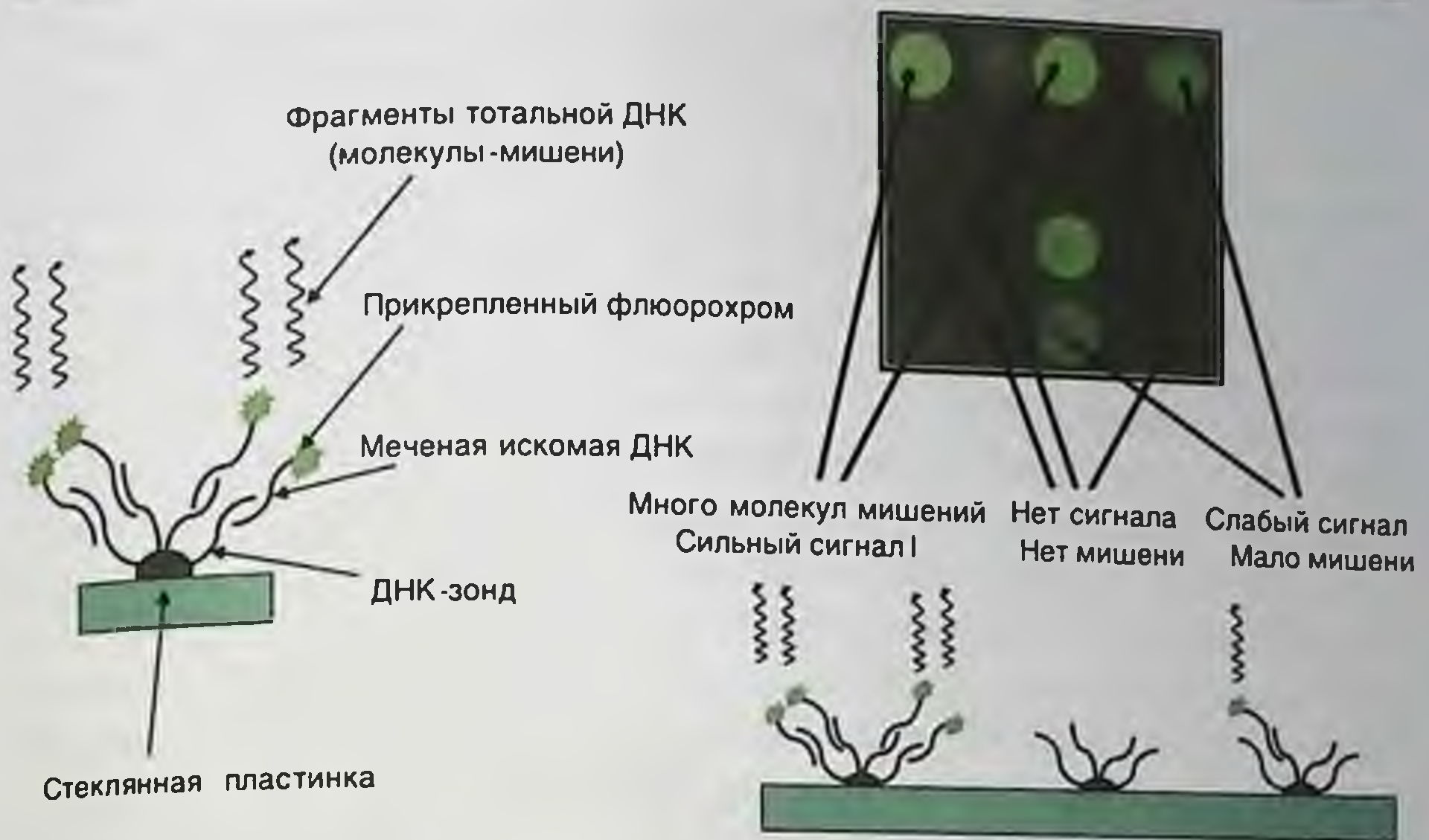


Рис. 5.7 Принцип обнаружения специфической последовательности дезоксирибонуклеиновой кислоты с помощью микрочипа

Для проведения этой реакции из исследуемого материала выделяют ДНК, в которой определяют наличие специфичного для данного микроба гена. Обнаружение гена осуществляют его накоплением. Для этого необходимо иметь праймеры (затравки) комплементарного 3'-концам ДНК исходного гена. Накопление (амплификация) гена выполняют следующим образом. Выделенную из исследуемого материала ДНК нагревают. При этом ДНК распадается на две нити. Добавляют праймеры. Смесь ДНК и праймеров охлаждают. При этом праймеры при наличии в смеси ДНК искомого гена связываются с его комплементарными участками. Затем к смеси ДНК и праймера добавляют ДНК-полимеразу и нуклеотиды. Устанавливают температуру, оптимальную для функционирования ДНК-полимеразы. В этих условиях в случае комплементарности ДНК гена и праймера происходит присоединение нуклеотидов к 3'-концам праймеров, в результате чего синтезируются две копии гена. После этого цикл повторяется снова, при этом количество ДНК гена увеличивается каждый раз вдвое (рис. 5.8). Проводят реакцию в специальных приборах-амплификаторах. Результат оценивают последующей денситометрией амплифицированной ДНК или ее электрофорезом в полиакриламидном геле. Полимеразную цепную реакцию применяют для диагностики вирусных и бактериальных инфекций.



Рис. 5.8. Полимеразная цепная реакция (схема)

Для обнаружения РНК-содержащих вирусов используют полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), включающую предварительный этап синтеза комплементарной ДНК на матрице искомой РНК при помощи ОТ.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени представляет ускоренный метод полимеразной цепной реакции, при котором амплификация и определение продукта амплификации проводится одновременно. Полимеразная цепная реакция в реальном времени позволяет провести полный анализ пробы в течение 20–60 мин и теоретически способна обнаружить даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе. Для этой цели в амплификационную пробирку вводят дополнительный молекулярный зонд, комплементарный средней части амплифицируемого фрагмента. К концам этого зонда присоединены флуорофор и тушител. Когда флуорофор и тушител связаны с разными концами олигонуклеотидного зонда, тушител подавляет свечение флуорофора. Во время процесса амплификации, когда этот зонд связывается с амплифицированной цепью за счет 5'-экзонуклеазной активности Таq-полимеразы, флюоресцентная метка переходит в раствор, освобождаясь от соседства с тушителем, и генерирует флюоресцентный сигнал, усиливающийся в реальном времени пропорционально накоплению амплификата (рис. 5.9). Реакция проводится в автоматическом режиме.

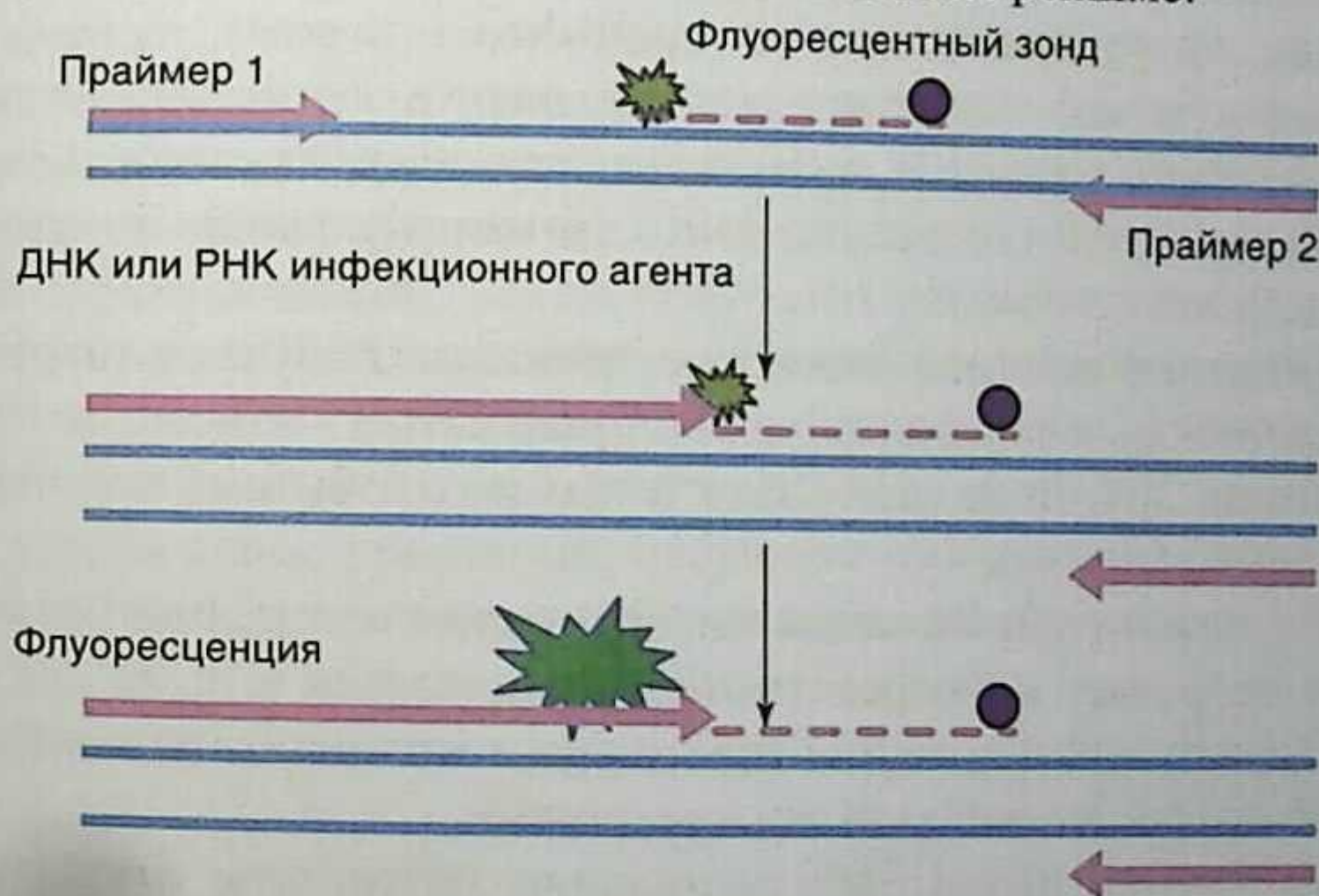


Рис. 5.9. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (схема)

Опосредованная транскрипцией амплификация рРНК используется для диагностики смешанных инфекций. Этот метод основан на обнаружении с помощью молекулярной гибридизации амплифицированных рРНК, специфичных для определенного вида бактерий. Исследование проводят в три этапа:

- 1) амплификация пула рРНК на матрице, выделенной из исследуемого материала ДНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы;

- 2) гибридизация накопленного пула рРНК с комплементарными видоспецифическими рРНК-олигонуклеотидами, мечеными флюорохромом или ферментами;
- 3) определение продуктов гибридизации методами денситометрии, иммуноферментного анализа.

Реакцию проводят в автоматическом режиме в установках, в которых одномоментное определение рРНК, принадлежащих различным видам бактерий, достигается разделением амплифицированного пула рРНК на несколько проб, в которые вносят для гибридизации комплементарные видоспецифические рРНК-меченые олигонуклеотиды.

5.7. ОСНОВЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Генная инженерия — технология получения рекомбинантных ДНК, содержащих ген, экспрессия которого приводит к синтезу полезного для нужд человека вещества. Генная инженерия является инструментом *биотехнологии* (от греч. *bios* — жизнь, *tesen* — искусство, *logos* — наука) — *области знаний, которая на основе изучения биотехнологических процессов, протекающих в живой клетке, использует эти процессы для получения полезных для человека веществ в промышленных условиях.*

С помощью биотехнологических процессов получают профилактические, лечебные и диагностические препараты, в том числе вакцины, антибиотики, лечебные сыворотки и иммуноглобулины, диагностические системы и др.

Генная инженерия является инструментом новейшей биотехнологии. Она позволяет непосредственно вмешиваться в генетический аппарат и служит для получения генетически модифицированного организма, обладающего желанными качествами.

Основу генной инженерии составляют результаты открытий, сделанных во второй половине XX в.

- Открытие ферментов *рестриктаз* (Смит Х., Натанс Д., Арбер В., 1970)
- Создание синтезатора гена, специального аппарата, снабженного ЭВМ, в память которой заложены программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей.
- Разработка метода *секвенирования*, определения последовательности нуклеотидных оснований в гене (У. Гильберт, Ф. Сэнгер).

Методика получения рекомбинантных ДНК основана на использовании рестриктаз (см. раздел 5.6.1.1) 2-го типа, которые разрушают двойную спираль ДНК в районе палиндромных последовательностей. Палиндромные последовательности обладают центральной симметрией и считаются одинаково в обе стороны от симметрии (рис. 5.10).

Точка разрыва может совпадать с осью симметрии, а может быть сдвинута относительно ее, как в случае действия рестриктазы EcoRI. В результате действия такой рестриктазы образуются фрагменты, с комплементарным водородными связями между комплементарными основаниями, после чего посредством фермента ДНК-лигазы происходит сшивка фрагментами. Причем сшиваться могут различные фрагменты ДНК. Если один из фрагментов ДНК, используемых при конструировании рекомбинантной молекулы ДНК, будет представлять самостоятельный репликон, например плазмиду, то таким образом можно встроить требуемый ген в плазмиду. При этом репликон (плазида) становится носителем, или вектором, для гена, если эту рекомбинантную плазмиду передать в бактериальную или дрожжевую клетку, в которой эта рекомбинантная плазида будет реплицироваться, размножая при этом встроенный в нее ген. Передача плазмиды в бактериальную или дрожжевую клетку осуществляется методом электропарации. Схема получения рекомбинантной плазмиды показана на рис. 5.11. Для клонирования чужеродных фрагментов ДНК в составе репликона Ф. Больваром и Р. Родригесом была специально сконструирована искусственная плазида pBR 322.

Для отбора клонов бактерий, несущих гибридную плазмиду, проводят идентификацию методом гибридизации зондом, несущим требуемые

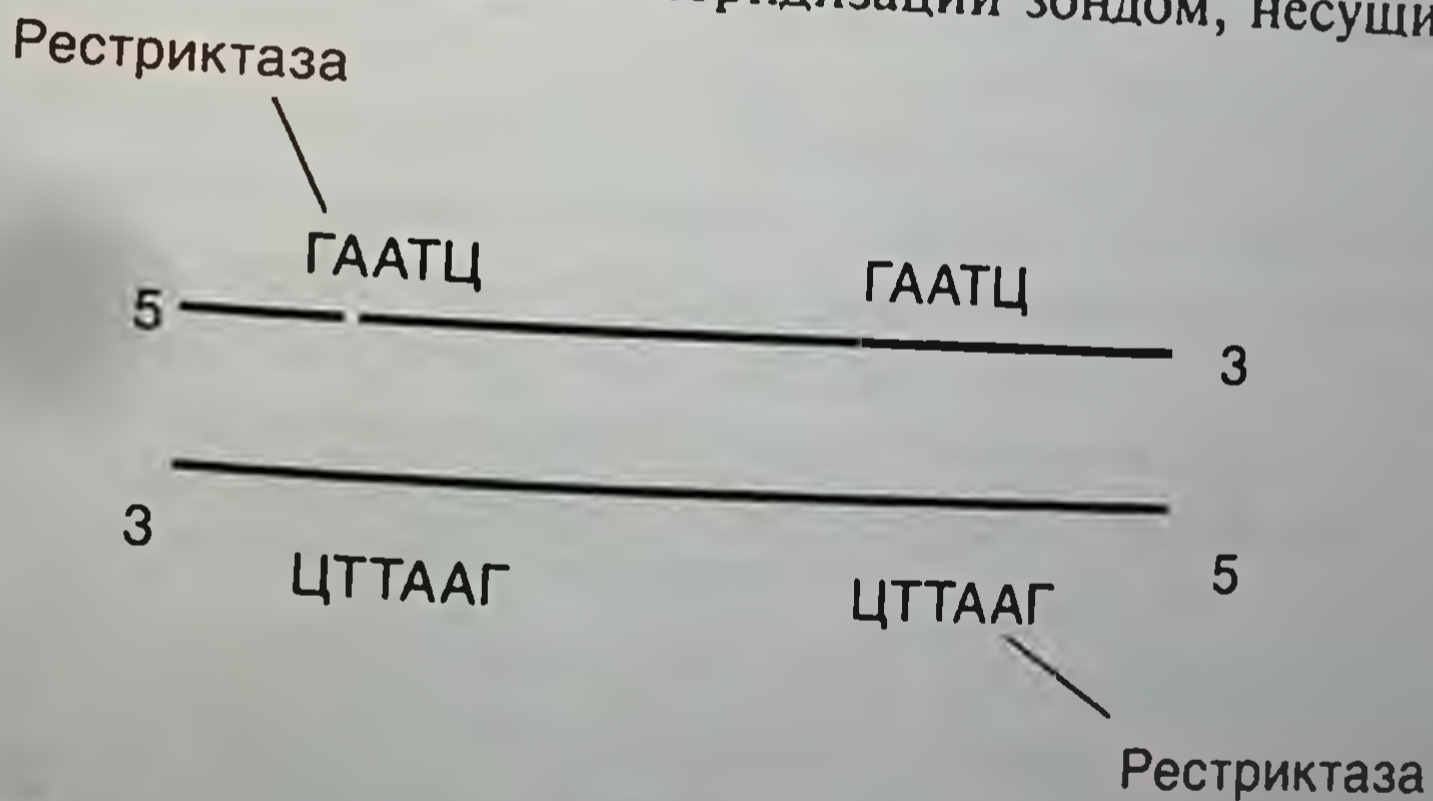


Рис. 5.10. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (схема)

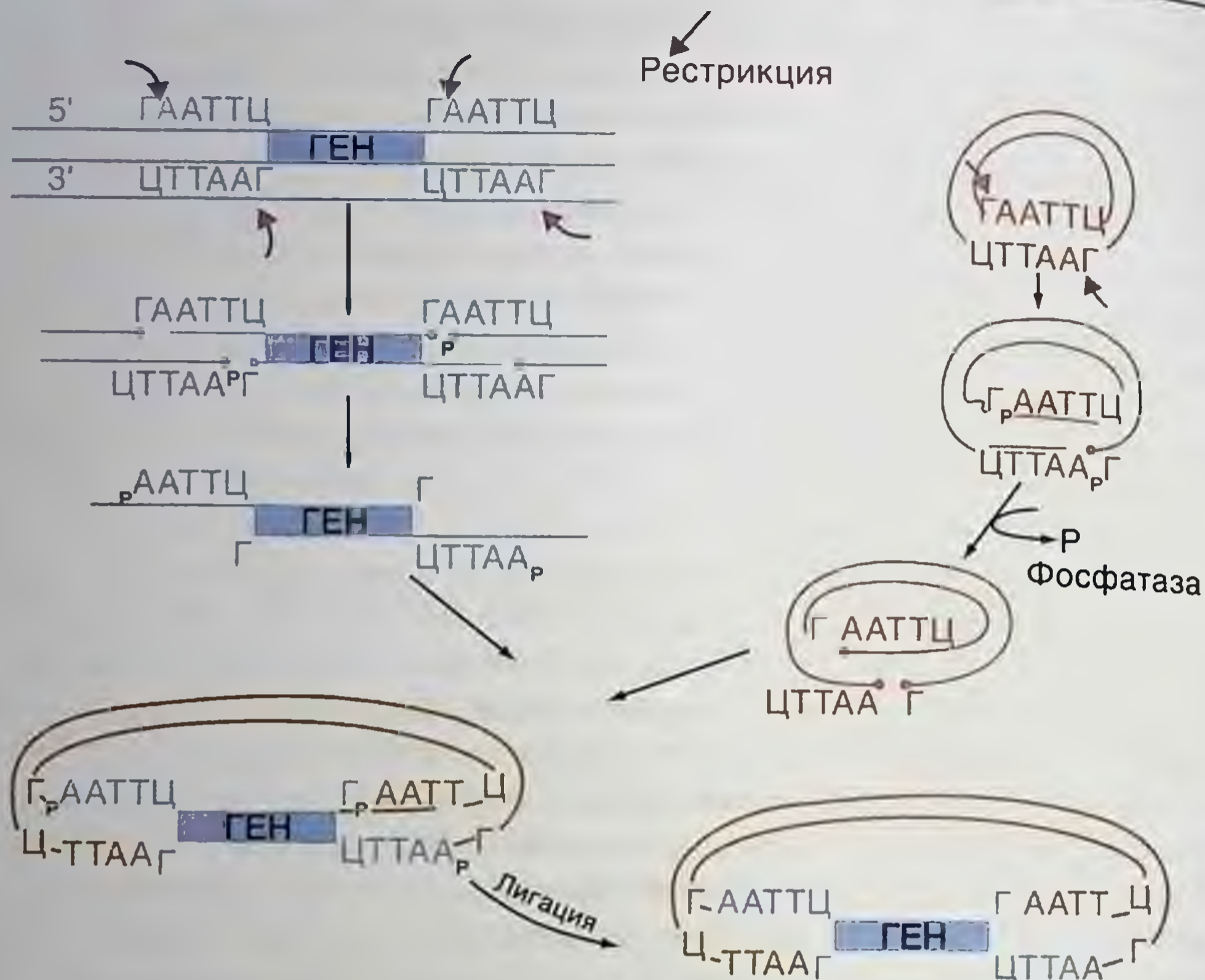


Рис. 5.11. Получение гибридной плазмиды (схема)

мый ген, или вводят в плазмиду генный маркер, например ген устойчивости к какому-то антибиотику. В этом случае клон бактериальных клеток, несущих рекомбинантную плазмиду, можно выделить на питательной среде, с добавлением антибиотика.

Определив методом секвенирования нуклеотидную последовательность генов, детерминирующих синтез требуемых для человека веществ, в настоящее время на основе этой последовательности нуклеотидов синтезируют искусственный ген, к концам которого присоединяют с помощью ферментов лигаз *линкеры* — синтетические фрагменты ДНК, несущие сайты рестрикции. Такая структура затем может быть встроена в плазмиду-вектор, которая будет передана в клетку для экспрессии продукта желанного гена.

Методы рекомбинантной ДНК открывают широкие перспективы в развитии медицины, ветеринарии и других отраслях народного хозяйства. В настоящее время получены рекомбинантные штаммы бактерий, продуцирующие инсулин, гормон роста, интерферон (ИФН) (схема их полу-

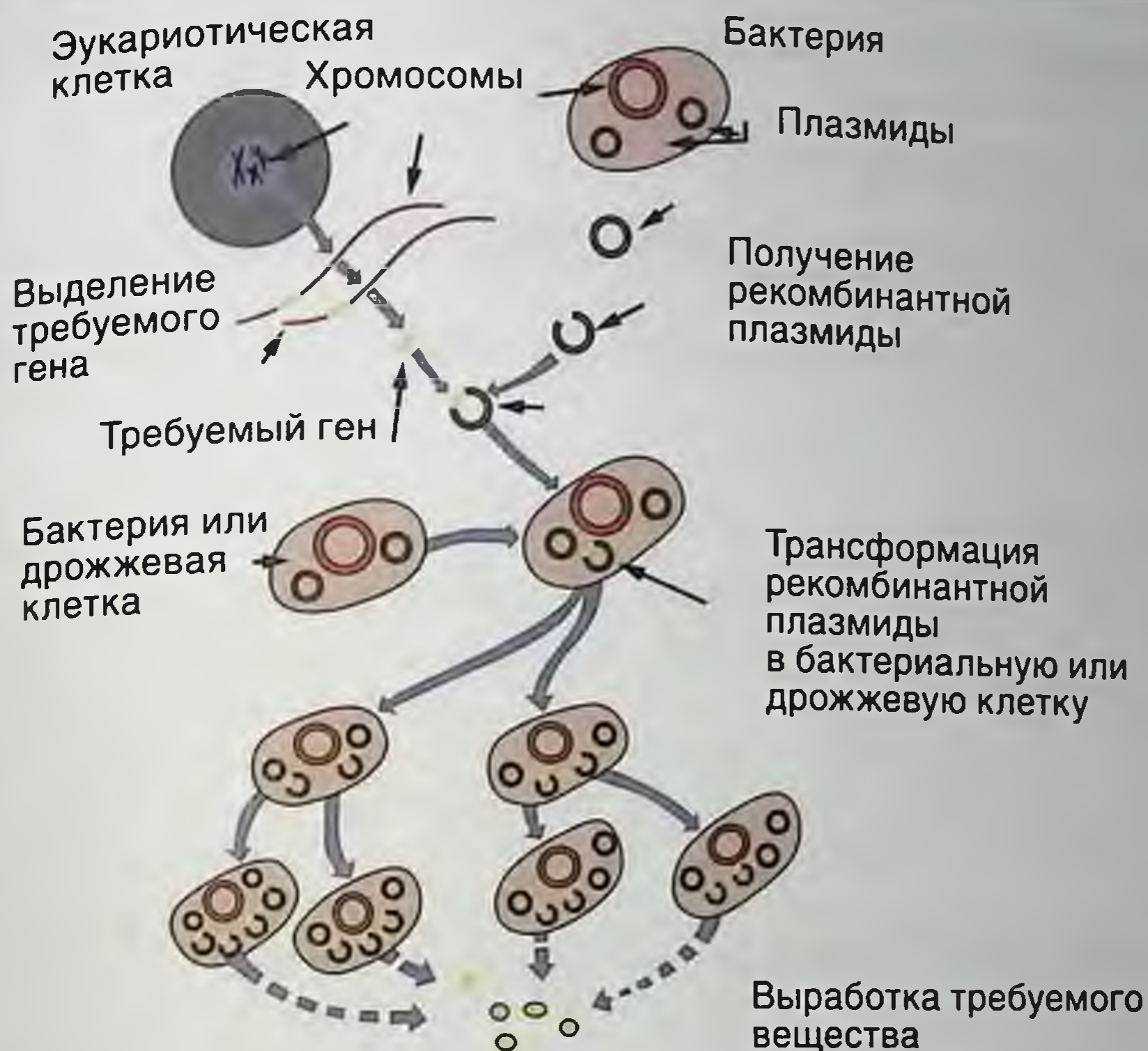


Рис. 5.12. Схема получения рекомбинантных инсулина и интерферона

чения на рис. 5.12). Методом рекомбинантной ДНК получены рекомбинантная вакцина против гепатита В (см. гл. 16) и рекомбинантная вакцина Gardasil для предупреждения развития рака шейки матки (см. гл. 16).

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Назовите процесс, в котором принимает участие бактериофаг:

1. Конъюгация.
2. Трансформация.
3. Трансдукция.
4. Репарация.

Б. Назовите свойства плазмиды, необходимые для осуществления передачи хромосомы путем конъюгации:

1. Интегративность.
2. Гипермутабельность.
3. Трансмиссивность.
4. Суперспирализованность.

В. Назовите структуры, которые участвуют в распространении генов в популяции бактерий:

1. Плазмиды.
2. Интегрон.
3. Транспозон.
4. Репликон.

Г. Назовите ферменты, которые применяются в генной инженерии:

1. Рестриктазы.
2. Лигазы.
3. Протеазы.
4. ДНК-полимераза.

Д. При санитарно-бактериологическом контроле продукции молочного завода из образцов сметаны был высеян возбудитель дизентерии *Shigella flexneri*. Сразу же была проведена проверка сотрудников этого завода на бактерионосительство, во время которой от сотрудника К. был выделен возбудитель того же вида и серовара. Назовите метод, который можно использовать для внутривидовой идентификации выделенных культур, позволивший подтвердить или опровергнуть тот факт, что сотрудник К. был источником заражения продукции.

АНТИМИКРОБНЫЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Химиотерапия — это этиотропное лечение инфекционных заболеваний или злокачественных опухолей, которое заключается в избирательном (селективном) подавлении жизнеспособности возбудителей инфекции или опухолевых клеток химиотерапевтическими средствами. Избирательность действия химиотерапевтического препарата заключается в том, что такое лекарственное средство является токсичным для микробов и при этом существенно не затрагивает клетки организма-хозяина.

6.1. АНТИМИКРОБНЫЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Антимикробные химиотерапевтические препараты — это лекарственные средства, которые применяют для избирательного подавления роста и размножения микробов, ставших причиной инфекционного заболевания, а также (редко и осторожно!) для профилактики инфекций.

К химиотерапевтическим препаратам предъявляется целый ряд требований: в идеале они должны обладать хорошей терапевтической эффективностью и минимальной токсичностью для человека, не вызывать побочных эффектов, иметь достаточный спектр антимикробной активности, ингибировать многие виды патогенных микроорганизмов. Они должны сохранять стабильность при широких диапазонах pH , что делает возможным их пероральное применение, и при этом иметь высокий процент биодоступности (способность проникновения в кровеносное русло и ткани), а также оптимальный период полувыведения, не должны вызывать лекарственную устойчивость микроорганизмов к применяемым препаратам.

Существующие в настоящее время химиотерапевтические препараты не полностью отвечают этим требованиям. Современная химиотерапия занимается постоянным усовершенствованием имеющихся препа-

ратов и созданием новых. В настоящее время известны тысячи химических соединений, обладающих антимикробной активностью, но лишь немногие из них пригодны для применения в качестве химиотерапевтических средств. К антимикробным химиотерапевтическим средствам относят следующие:

- антибиотики (способны воздействовать только на клеточные формы микроорганизмов, также известны противоопухолевые антибиотики);
- синтетические антимикробные химиотерапевтические препараты разного химического строения (среди них есть препараты, которые действуют только на клеточные микроорганизмы или только на вирусы).

Антимикробные химиотерапевтические препараты принято подразделять по спектру их активности. Спектр действия определяется тем, на какие именно микробы действует лекарственное средство. Среди химиотерапевтических препаратов, действующих на клеточные формы микроорганизмов, различают антибактериальные, противогрибковые и противопротозойные.

Антибактериальные, в свою очередь, принято подразделять на препараты узкого и широкого спектра действия. Узким спектром обладают препараты, действующие в отношении только небольшого количества разновидностей или грамположительных, или грамотрицательных бактерий. Широкий спектр имеют препараты, воздействующие на достаточно большое количество видов представителей обеих групп бактерий.

Особую группу составляют **противовирусные** химиопрепараты (см. раздел 6.6). Кроме того, существуют некоторые антимикробные химиотерапевтические лекарственные средства, обладающие также противоопухолевой активностью.

По типу действия на клеточные мишени чувствительных микроорганизмов (морфологические структуры или отдельные звенья метаболизма) различают микростатические и микробоцидные химиопрепараты.

Микробоцидные антибиотики необратимо связываются и повреждают клеточные мишени, вызывая гибель чувствительных микроорганизмов. Химиопрепараты со статическим действием ингибируют рост и размножение микробных клеток, однако при удалении антибиотика жизнедеятельность возбудителей восстанавливается. При лечении микростатическими препаратами защитные силы организма должны сами окончательно справиться с временно ослабленными микроорганизмами.

В зависимости от объекта тип действия называют бактерио-, фунги-, протозоостатическим или соответственно бактерио-, фунги- и протозооцидным.

6.1.1. Антибиотики

Тот факт, что одни микроорганизмы могут каким-то образом задерживать рост других, был известен давно, однако химическая природа антагонизма между микробами долгое время была неясна.

В 1928–1929 гг. А. Флеминг открыл штамм плесневого гриба пеницилла (*Penicillium notatum*), выделяющего химическое вещество, которое задерживает рост стафилококка. Вещество было названо пенициллином, однако лишь в 1940 г. Х. Флори и Э. Чейн смогли получить стабильный препарат очищенного пенициллина — первый антибиотик, нашедший широкое применение в клинической практике. В 1945 г. А. Флеминг, Х. Флори и Э. Чейн были удостоены Нобелевской премии. В нашей стране большой вклад в учение об антибиотиках внесли З.В. Ермольева и Г.Ф. Гаузе.

Сам термин «антибиотик» (от греч. *bios* — против жизни) был предложен С. Ваксманом в 1942 г. для обозначения природных веществ, продуцируемых микроорганизмами и в низких концентрациях антагонистичных росту других бактерий.

Антибиотики — это химиотерапевтические препараты из химических соединений биологического происхождения (природные), а также их полусинтетические производные и синтетические аналоги, которые в низких концентрациях оказывают избирательное повреждающее или губительное действие на микроорганизмы и опухоли.

Классификация антибиотиков по химической структуре

Антибиотики имеют различное химическое строение, и по этому признаку их подразделяют на классы. Многочисленные препараты антибиотиков, принадлежащих к одному классу, имеют сходный механизм и тип действия, им свойственны похожие побочные эффекты. По спектру действия при сохранении характерных для класса закономерностей различные препараты, особенно разных поколений, нередко имеют различия.

Основные классы антибиотиков:

- р-лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы);
- гликопептиды;

- липопептиды;
- аминогликозиды;
- тетрациклины (и глицилциклины);
- макролиды (и азалиды);
- линкозамиды;
- хлорамфеникол (Левомецетин[®]);
- рифамицины;
- полипептиды;
- полиены;
- разные антибиотики (фузидиевая кислота, фузафунгин, стрептограммины и др.).

Источники получения природных и полусинтетических антибиотиков

Основными продуцентами природных антибиотиков являются микроорганизмы, которые, находясь в своей естественной среде (в основном в почве), синтезируют антибиотики в качестве средства борьбы за выживание. Клетки растений и животных также могут вырабатывать разнообразные химические вещества с селективным антимикробным действием (например, фитонциды, антимикробные пептиды и др.), однако широкого применения в медицине в качестве продуцентов антибиотиков они не получили.

Таким образом, основными источниками получения природных и полусинтетических антибиотиков стали:

- плесневые грибы — синтезируют природные β -лактамы (грибы рода *Cephalosporium* и *Penicillium*) и фузидиевую кислоту;
- актиномицеты (особенно стрептомицеты) — ветвящиеся бактерии, синтезируют большинство природных антибиотиков (80%);
- типичные бактерии, например бациллы, псевдомонады, продуцируют бацитрацин, полимиксины и другие вещества, обладающие антибактериальными свойствами.

Способы получения антибиотиков

Основные способы получения антибиотиков:

- биологический синтез (используют для получения природных антибиотиков). В условиях специализированных производств культивируют микробы-продуценты, которые в процессе своей жизнедеятельности выделяют антибиотики;
- биосинтез с последующими химическими модификациями (применяют для создания полусинтетических антибиотиков). Сначала

путем биосинтеза получают природный антибиотик, а затем его молекулу изменяют путем химических модификаций, например присоединяют определенные радикалы, в результате чего улучшаются антимикробные и фармакологические свойства препарата:

- химический синтез (применяют для получения синтетических аналогов природных антибиотиков). Это вещества, которые имеют такую же структуру, как и природный антибиотик, но их молекулы синтезированы химически.

Р-лактамы. Класс антибиотиков, включающих значительное число природных и полусинтетических соединений, характерной чертой которых является наличие β -лактамного кольца, при его разрушении препараты теряют свою активность; пенициллины имеют в своем составе 5-членные, а цефалоспорины 6-членные соединения. Тип действия — бактерицидный. Антибиотики этого класса подразделяют:

- на пенициллины;
- цефалоспорины;
- карбапенемы;
- монобактамы.

Пенициллины. Выделяют природные (получены из грибов) и полусинтетические пенициллины. Природный препарат — *бензилпенициллин* (пенициллин G) и его соли (калиевая и натриевая) — активен против грамположительных бактерий, однако имеет много недостатков: быстро выводится из организма, разрушается в кислой среде желудка, инактивируется пенициллиназами — бактериальными ферментами, разрушающими β -лактамное кольцо. Полусинтетические пенициллины, полученные путем присоединения к основе природного пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоте — различных радикалов, имеют преимущества перед природным препаратом, в том числе широкий спектр действия.

- **Депо-препарат** (Бициллин⁴), действует около 4 нед (создает депо в мышцах), применяется для лечения сифилиса, профилактики рецидивов ревматизма и других стрептококковых инфекций, пневмококковых пневмоний. Используется для лечения менингококковых инфекций, гонореи.
- **Кислотоустойчивые** (феноксиметилпенициллин), для перорального приема.
- **Пенициллиназоустойчивые** (метициллин, оксациллин), в отличие от природного пенициллина, антибиотики этой группы устойчивы к действию пенициллиназы. Эффективны в отношении пеницил-

линрезистентных стафилококков, а также в отношении *S. pyogenes*. Используются для лечения стафилококковых инфекций, включая абсцессы, пневмонии, эндокардиты и септицемии.

- **Широкого спектра** (ампициллин, амоксициллин). Активность подобна бензилпеницилину, но активны в отношении грамотрицательных аэробных бактерий: кишечных палочек, сальмонелл, шигелл, гемофильных палочек.
- **Антисинегнойные**. Препараты делятся на 2 группы:
 - *карбокспенциллины* (карбенициллин, тикарциллин, пиперациллин). Активны в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий: нейссерий, большинства штаммов протей и других энтеробактерий. Особое значение имеет активность в отношении *Pseudomonas aeruginosa*;
 - *уреидопенициллины* (пиперациллин, азлоциллин). Применяются для лечения инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, активность против которой в 4–8 раз выше, чем у карбенициллина; и других грамотрицательных бактерий, включая неспорообразующие анаэробы.
- **Комбинированные** (амоксициллин + клавулановая кислота, ампициллин + сульбактам). В состав этих препаратов включены ингибиторы ферментов — β -лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам и др.), содержащие в своей молекуле β -лактамное кольцо. β -Лактамное кольцо, связываясь с β -лактамазами, ингибирует их и таким образом защищает молекулу антибиотика от разрушения. Ингибиторы ферментов действуют на все микроорганизмы, чувствительные к ампициллину, а также на неспорообразующие анаэробы.

Цефалоспорины. Один из наиболее обширных классов антибиотиков. Основным структурным компонентом этой группы антибиотиков является цефалоспорин С, структурно подобный пеницилину.

Общие свойства цефалоспоринов: выраженное бактерицидное действие, низкая токсичность, широкий терапевтический диапазон, не действуют на энтерококки, листерии, метициллинрезистентные стафилококки, вызывают перекрестную аллергию с пенициллинами у 10% больных. Спектр действия широкий, но более активны в отношении грамотрицательных бактерий.

По последовательности внедрения различают 4 поколения (генерации) препаратов, которые отличаются по спектрам активности, устойчивости к β -лактамазам и некоторым фармакологическим свойствам,

поэтому препараты одного поколения не заменяют препараты другого поколения, а дополняют:

- **I поколение** (цефазолин (Цефамезин[®]), цефалотин и др.) — активны в отношении грамположительных бактерий и энтеробактерий. Неактивны в отношении *Pseudomonas aeruginosa*. Устойчивы к стафилококковым β -лактамазам, но разрушаются β -лактамазами грамотрицательных бактерий;
- **II поколение** (цефамандол, цефуроксим, цефаклор и др.) — по действию на грамположительные бактерии равноценны цефалоспорином I поколения, но более активны в отношении грамотрицательных, более устойчивы к β -лактамазам;
- **III поколение** (цефотаксим, цефтазидим и др.) — обладают особенно высокой активностью против грамотрицательных бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*, некоторые активны в отношении синегнойной палочки. Менее активны в отношении грамположительных бактерий. Высоко резистентны к действию β -лактамаз;
- **IV поколение** (цефепим, цефпиром и др.) — действуют на некоторые грамположительные бактерии (активность в отношении стафилококков сопоставима с цефалоспорином II поколения), высокая активность в отношении некоторых грамотрицательных бактерий и синегнойной палочки, резистентны к действию β -лактамаз.

Монобактамы (азтреонам, тазобактам и др.) — моноциклические β -лактамы узкого спектра действия. Очень активны только против грамотрицательных бактерий, в том числе синегнойной палочки и грамотрицательных колиформных бактерий. Резистентны к β -лактамазам.

Карбапенемы (имипенем, меропенем и др.) — из всех β -лактамов имеют самый широкий спектр действия за исключением метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* и *Enterococcus faecium*. Резистентны к β -лактамазам. Карбапенемы — антибиотики резерва, назначаются при тяжелых инфекциях, вызванных множественными устойчивыми штаммами микроорганизмов, а также при смешанных инфекциях.

Гликопептиды (ванкомицин, тейкопланин). Активны только в отношении грамположительных бактерий, включая метициллинрезистентные стафилококки. Не действуют на грамотрицательные бактерии вследствие того, что гликопептиды представляют собой очень крупные молекулы, которые не могут проникнуть через поры грамотрицательных бактерий. Токсичны (ототоксичны, нефротоксичны, вызывают флебиты). Используются при лечении тяжелых инфекций, вызванных стафилококками, устойчивыми к другим антибиотикам, особенно ме-

тициллинрезистентными стафилококками, при аллергии к β -лактамам, при псевдомембранозном колите, вызванном *Clostridium difficile*.

Липопептиды (даптомицин) — новая группа антибиотиков, полученных из стрептомицетов, проявляют бактерицидную активность, в связи с высокой частотой побочных эффектов одобрены только для лечения осложненных инфекций кожи и мягких тканей. Имеют высокую активность в отношении грамположительных бактерий, включая полирезистентные стафилококки и энтерококки (устойчивые к β -лактамам и гликопептидам).

Аминогликозиды — соединения, в состав молекулы которых входят аминосахара. Первый препарат — стрептомицин — был получен в 1943 г. Ваксманом как средство для лечения туберкулеза. Сейчас различают несколько поколений (генераций) препаратов:

- 1) стрептомицин, канамицин и др.;
- 2) гентамицин;
- 3) сизомицин, тобрамицин и др.

Аминогликозиды обладают бактерицидной активностью, прежде всего в отношении грамотрицательных аэробных микроорганизмов, включая *Pseudomonas aruginosa*, а также стафилококков, действуют на некоторых простейших. Не действуют на стрептококки и облигатно-анаэробные микроорганизмы. Используются для лечения тяжелых инфекций, вызванных энтеробактериями и другими грамотрицательными аэробными микроорганизмами. Нефро- и ототоксичны.

Тетрациклины — это семейство крупномолекулярных препаратов, имеющих в своем составе четыре циклических соединения. Тип действия — статический. Обладают широким спектром активности в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий, внутриклеточных паразитов. Назначаются прежде всего для лечения инфекций, вызванных внутриклеточно расположенными микробами: риккетсиями, хламидиями, микоплазмами, бруцеллами, легионеллами. В настоящее время применяют полусинтетические препараты, например *доксциклин*.

Новой генерацией тетрациклинов являются полусинтетические аналоги тетрациклина — глицилциклины, к которым относится препарат *Тигециклин*^{*}. Глицилциклины обладают более прочной связью с рибосомами. *Тигециклин*^{*} активен против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая мультирезистентные, неферментирующие грамотрицательные бактерии, такие как *Acinetobacter spp.*, метициллинрезистентные штаммы стафилококков,

резистентные к ванкомицину, энтерококки и резистентные к пенициллину пневмококки. Препарат способен реагировать с рибосомами бактерий, устойчивыми к действию природных тетрациклинов. Неактивен в отношении *P. aeruginosa*. Тетрациклины не используются в педиатрической практике, так как накапливаются в растущей зубной ткани («синдром черных зубов»).

Макролиды (и азалиды) — это семейство больших макроциклических молекул. *Эритромицин* — наиболее известный и широко используемый антибиотик. Более новые препараты: *азитромицин*, *кларитромицин* (их можно применять всего 1–2 раза в сутки). Тип действия — статический (хотя в зависимости от вида микроба может быть и цидным). Спектр действия — широкий, активны и в отношении внутриклеточных паразитов (хламидий, риккетсий, легионелл и микоплазм). Активность этой группы препаратов направлена прежде всего против грамположительных микроорганизмов, а также гемофильных палочек, бордетелл, нейссерий.

Линкозамиды (*линкомицин* и его хлорированный дериват — *клиндамицин*). Спектр активности и механизм действия схож с макролидами, клиндамицин высокоактивен в отношении облигатно-анаэробных микроорганизмов. Бактериостатический эффект.

Стрептограминны. Природный антибиотик Пристиномицин[®] получен из стрептомицет. Комбинация двух полусинтетических дериватов Пристиномицина[®]: Хинупристин/Дальфопристин[®] в соотношении 3:7 обладает бактерицидным эффектом в отношении стафилококков и стрептококков, включая штаммы, резистентные к другим антибиотикам.

Хлорамфеникол. Статический тип действия, обладает широким спектром антимикробной активности, включая грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, а также внутриклеточные паразиты (хламидии, риккетсии), микоплазмы. Имеет в составе молекулы нитробензеновое «ядро», которое делает препарат токсичным для клеток организма человека. Вызывает обратимый депрессивный эффект костномозгового кроветворения. У новорожденных вызывает развитие синдрома «серого ребенка»¹.

Рифамицины (рифампицин). Действие — бактерицидное, спектр — широкий (в том числе внутриклеточные паразиты, очень эффективны

¹ Синдром «серого ребенка»: хлорамфеникол метаболизируется в печени, образуя глюкурониды, поэтому при врожденном дефиците фермента глюкуронилтрансферазы препарат накапливается в крови в токсических концентрациях, в результате чего возникают серый цвет кожи, увеличение печени, боли в сердце, отеки, рвота, общая слабость.

против микобактерий). Активны в отношении многих стафилококков, стрептококков, легионелл и микобактерий. Неэффективны в отношении энтеробактерий и псевдомонад. В настоящее время применяются прежде всего для лечения туберкулеза. При использовании этого препарата биологические жидкости окрашиваются в розовый цвет. Вызывает транзиторные нарушения функции печени.

Полипептиды (полимиксины). Спектр антимикробного действия — узкий (грамотрицательные бактерии), тип действия — бактерицидный. Очень токсичны. Применение — наружное, в настоящее время не используются.

Полиены (амфотерицин В, нистатин и др.). Противогрибковые препараты, токсичность которых достаточно велика, поэтому применяются чаще местно (нистатин), а при системных микозах препаратом выбора является амфотерицин В.

6.1.2. Синтетические антимикробные химиотерапевтические препараты

Методами химического синтеза целенаправленно создано много антимикробных веществ с избирательным действием, которые не встречаются в живой природе, но похожи на антибиотики по механизму, типу и спектру действия.

Впервые синтетический препарат для лечения сифилиса (Сальварсан[®]) синтезировал П. Эрлих в 1908 г. на основе органических соединений мышьяка. В 1935 г. Г. Домагк предложил Пронтозил[®] (красный стрептоцид) для лечения бактериальных инфекций. Действующим началом Пронтозила[®] был сульфаниламид, который высвобождался при разложении Пронтозила[®] в организме.

С тех пор создано много разновидностей антибактериальных, противогрибковых, противопротозойных синтетических химиотерапевтических лекарственных средств разного химического строения. В настоящее время для конструирования новых синтетических антимикробных лекарственных средств ведется постоянный целенаправленный поиск у микробов таких белков, которые могли бы стать новыми мишенями, обеспечивающими принцип избирательности действия этих препаратов.

К наиболее значимым группам широко применяемых синтетических препаратов, активных против клеточных форм микроорганизмов, относятся сульфаниламиды, нитроимидазолы, хинолоны/фторхинолоны,

оксазолидиноны, нитрофураны, имидазолы и многие другие (противотуберкулезные, противосифилитические, противомаларийные и т.п.).

Особую группу составляют синтетические противовирусные препараты (см. раздел 6.6).

Сульфаниламиды. Бактериостатики обладают широким спектром активности, включая стрептококки, нейссерии, гемофильные палочки. Основу молекулы этих препаратов составляет парааминогруппа, поэтому они действуют как аналоги и конкурентные антагонисты парааминобензойной кислоты, которая необходима бактериям для синтеза фолиевой (тетрагидрофолиевой) кислоты — предшественника пуриновых и пиримидиновых оснований. Роль сульфаниламидов в лечении инфекций в последнее время снизилась, так как существует много устойчивых штаммов, отмечаются серьезные побочные эффекты и активность сульфаниламидов в целом ниже, чем у антибиотиков. Единственным препаратом этой группы, который продолжает достаточно широко использоваться в клинической практике, является ко-тримоксазол [сульфаметоксазол + триметоприм] (*Бактрим**, *Бисептол**) и его аналоги. Это комбинированный препарат, который состоит из сульфаметоксазола и триметоприма. Триметоприм блокирует синтез фолиевой кислоты, но на уровне другого фермента. Оба компонента действуют синергически, потенцируя действие друг друга. Действует бактерицидно. Применяют при инфекциях мочевого тракта, вызванных грамотрицательными бактериями.

Хинолоны/фторхинолоны (налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин и др.) — фторированные производные 4-хинолон-3-карбоновой кислоты. У фторхинолонов спектр широкий, тип действия — цидный. Фторхинолоны высокоактивны в отношении грамотрицательного спектра микроорганизмов, включая энтеробактерии, псевдомонады, хламидии, риккетсии, микоплазмы. Неактивны в отношении стрептококков и анаэробов.

Новые поколения фторхинолонов (моксифлоксацин, левофлоксацин) обладают активностью в отношении пневмококков. Их применяют также при инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями (в том числе синегнойной палочкой), внутриклеточными паразитами, микобактериями. Негативно влияют на растущую хрящевую ткань, поэтому ограничено их использование в педиатрической практике.

Нитроимидазолы [метронидазол (Трихопол*)]. Тип действия — цидный, спектр — анаэробные бактерии и простейшие (трихомонады, лямблии, дизентерийная амеба). Метронидазол способен активироваться бактериальными нитроредуктазами. Активные формы этого препарата способны расщеплять ДНК. Особенно активны против анаэробных бактерий, так как они способны активировать метронидазол.

Имидазолы (*клотримазол* и др.) — противогрибковые препараты, действуют на уровне эргостеролов цитоплазматической мембраны.

Нитрофураны (*фуразолидон* и др.). Тип действия — цидный, спектр действия — широкий. Накапливаются в моче в высоких концентрациях. Применяются как уросептики для лечения инфекций мочевыводящих путей.

Оксазолидиноны (*линезолид*). Тип действия в отношении стафилококков статический, в отношении некоторых других бактерий (в том числе грамотрицательных) — цидный, спектр действия — широкий. Обладает активностью против многих грамположительных бактерий, включая метициллинрезистентные стафилококки, пенициллинрезистентные пневмококки и ванкомицинрезистентные энтерококки. При длительном применении может приводить к угнетению функций кроветворения (тромбоцитопения).

6.2. МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ АНТИМИКРОБНЫХ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ ФОРМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Основа осуществления избирательного действия антимикробных химиотерапевтических препаратов состоит в том, что мишени для их воздействия в микробных клетках отличаются от таковых в клетках макроорганизма. Большинство химиопрепаратов вмешиваются в метаболизм микробной клетки, поэтому особенно активно влияют на микроорганизмы в фазе их активного роста и размножения.

По механизму действия различают следующие группы антимикробных химиопрепаратов (табл. 6.1):

- ингибиторы синтеза и функций клеточной стенки бактерий;
- ингибиторы синтеза белка у бактерий;
- ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот, нарушающие синтез и функции цитоплазматической мембраны.

Таблица 6.1. Классификация антимикробных химиотерапевтических препаратов по механизму действия

Ингибиторы синтеза и функций клеточной стенки бактерий	Ингибиторы синтеза белка на рибосомах бактерий	Ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот	Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны
<ul style="list-style-type: none"> • β-Лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы) • Гликопептиды • Липопептиды 	<ul style="list-style-type: none"> • Аминогликозиды • Тетрациклины • Хлорамфеникол • Линкозамиды • Макролиды • Оксазолидиноны • Стрептограминны 	<p>Ингибиторы синтеза РНК</p> <ul style="list-style-type: none"> • Рифамицины <p>Ингибиторы синтеза предшественников нуклеиновых кислот</p> <ul style="list-style-type: none"> • Сульфаниламиды <p>Ингибиторы синтеза ДНК</p> <ul style="list-style-type: none"> • Хинолоны • Нитроимидазолы • Нитрофураны 	<ul style="list-style-type: none"> • Полимиксины • Полиены • Имидазолы

6.2.1. Ингибиторы синтеза и функций клеточной стенки бактерий

Важнейшими группами антимикробных препаратов, избирательно действующих на синтез клеточной стенки бактерий, являются β -лактамны, гликопептиды и липопептиды.

Пептидогликан — основа клеточной стенки бактерий. Синтез предшественников пептидогликана начинается в цитоплазме. Затем они транспортируются через цитоплазматическую мембрану, где происходит их объединение в гликопептидные цепи (эту стадию ингибируют гликопептиды путем связывания с D-аланином). Образование полноценного пептидогликана происходит на внешней поверхности цитоплазматической мембраны. Этот этап включает в себя процесс образования поперечных сшивок гетерополимерных цепей пептидогликана и совершается при участии белков-ферментов (транспептидаз), которые называют пенициллинсвязывающими белками, так как именно они служат мишенью для пенициллина и других β -лактамыных антибиотиков. Ингибирование пенициллинсвязывающих белков приводит к накоплению в бактериальной клетке предшественников пептидогликана и запуску системы аутолиза. В результате действия аутолитических ферментов и увеличения осмотического давления цитоплазмы происходит лизис бактериальной клетки.

Действие липопептидов направлено не на синтез пептидогликана, а на формирование канала в клеточной стенке при необратимом соединении гидрофобной части молекулы липопептида с клеточной мембраной грамположительных бактерий. Образование такого канала приводит к быстрой деполяризации клеточной мембраны из-за выхода калия и, возможно, других ионов, содержащихся в цитоплазме, в результате чего также наступает гибель бактериальной клетки.

6.2.2. Ингибиторы синтеза белка у бактерий

Мишенью для этих препаратов являются белоксинтезирующие системы прокариот, которые имеют отличия от рибосом эукариот, что обеспечивает селективность действия этих препаратов. Синтез белка — многоступенчатый процесс, где задействовано множество ферментов и структурных субъединиц. Известны несколько точек-мишеней, на которые способны воздействовать препараты этой группы в процессе биосинтеза белка.

Аминогликозиды, тетрациклины и оксазолидиноны связываются с 30S-субъединицей, блокируя процесс еще до начала синтеза белка. **Аминогликозиды** необратимо связываются с 30S-субъединицей рибосом и нарушают присоединение к рибосоме тРНК, происходит образование дефектных инициальных комплексов. **Тетрациклины** обратимо связываются с 30S-субъединицей рибосом и препятствуют присоединению нового аминоацила тРНК к акцепторному сайту и перемещению тРНК с акцепторного на донорский сайт. **Оксазолидиноны** блокируют связывание двух субъединиц рибосом в единый 70S-комплекс, нарушают терминацию и высвобождение пептидной цепи.

Макролиды, хлорамфеникол, линкозамиды и стрептограммины соединяются с 50S-субъединицей и ингибируют процесс элонгации полипептидных цепей при синтезе белка. **Хлорамфеникол** и **линкозамиды** нарушают формирование пептида, катализируемого пептидилтрансферазой, макролиды ингибируют транслокацию пептидил тРНК. Однако эффект этих препаратов бактериостатичен.

Стрептограммины, Хинупристин/Дальфопристин[®] ингибируют синтез белка в синергичной манере, оказывая бактерицидное действие. **Хинупристин[®]** связывает 50S-субъединицу и предупреждает элонгацию полипептида. **Дальфопристин[®]** присоединяется рядом, изменяет конформацию 50S-рибосомальной субъединицы, увеличивая тем самым прочность связывания с ней **Хинупристина[®]**.

6.2.3. Ингибиторы синтеза и функций нуклеиновых кислот

Несколько классов антимикробных препаратов способны нарушать синтез и функцию бактериальных нуклеиновых кислот, что достигается тремя способами:

- 1) ингибированием синтеза предшественников пуринопиримидиновых оснований (сульфаниламиды, триметоприм);
- 2) подавлением репликации и функций ДНК (хинолоны/фторхинолоны, нитроимидазолы, нитрофураны);
- 3) ингибированием РНК-полимеразы (рифамицины).

В большинстве своем в эту группу входят синтетические препараты, из антибиотиков подобным механизмом действия обладают только рифамицины, которые присоединяются к РНК-полимеразе и блокируют синтез мРНК.

Действие фторхинолонов связано с ингибцией синтеза бактериальной ДНК путем блокирования фермента ДНК-гиразы. ДНК-гираза является топоизомеразой II, которая обеспечивает расплетание молекулы ДНК, необходимое для ее репликации.

Сульфаниламиды — структурные аналоги парааминобензойной кислоты, могут конкурентно связываться и ингибировать фермент, который нужен для перевода парааминобензойной кислоты в фолиевую кислоту — предшественник пуриновых и пиримидиновых оснований. Эти основания необходимы для синтеза нуклеиновых кислот.

6.2.4. Ингибиторы синтеза и функций цитоплазматической мембраны

Число антибиотиков, специфически действующих на мембраны бактерий, невелико. Наиболее известны полимиксины (полипептиды), к которым чувствительны только грамотрицательные бактерии. Полимиксины лизируют клетки, повреждая фосфолипиды клеточных мембран. Из-за токсичности их применяют лишь для лечения местных процессов и не вводят парентерально. В настоящее время на практике не используют.

Противогрибковые препараты (антимикотики) повреждают эргостеролы цитоплазматической мембраны грибов (полиеновые антибиотики) и ингибируют один из ключевых ферментов биосинтеза эргостеролов (имидазолы).

6.2.5. Побочное воздействие на микроорганизмы

Применение антимикробных химиопрепаратов не только оказывает на микробы прямое угнетающее или губительное воздействие, но и может привести к формированию атипичных форм микробов (например, к образованию L-форм бактерий) и персистирующих форм микробов. Широкое использование антимикробных лекарственных средств приводит также к формированию антибиотикозависимости (редко) и лекарственной устойчивости — антибиотикорезистентности (достаточно часто).

6.3. ЛЕКАРСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ БАКТЕРИЙ

В последние годы значительно увеличилась частота выделения микробных штаммов, устойчивых к действию антибиотиков.

Антибиотикорезистентность — это устойчивость микробов к антимикробным химиопрепаратам. Бактерии следует считать резистентными, если они не обезвреживаются такими концентрациями препарата, которые реально создаются в макроорганизме. Резистентность к антибиотикам может быть природной и приобретенной.

6.3.1. Природная устойчивость

Природная устойчивость — врожденный видовой признак микроорганизма. Она связана с отсутствием мишени для конкретного антибиотика или ее недоступностью. В этом случае использование данного антибиотика с лечебной целью нецелесообразно. Некоторые виды микробов исходно устойчивы к определенным семействам антибиотиков или в результате отсутствия соответствующей мишени, например, микоплазмы не имеют клеточной стенки, поэтому нечувствительны ко всем препаратам, действующим на этом уровне, или в результате бактериальной непроницаемости для данного препарата, например, грамотрицательные микробы менее проницаемы для крупномолекулярных соединений, чем грамположительные бактерии, так как их наружная мембрана имеет узкие поры.

6.3.2. Приобретенная устойчивость

Приобретенная устойчивость характеризуется способностью отдельных штаммов микроорганизмов выживать при концентрациях анти-

биотиков, способных ингибировать основную часть микробной популяции данного вида. При дальнейшем распространении антибиотикорезистентных штаммов они могут стать преобладающими.

Начиная с 1940-х годов, когда антибиотики стали внедряться в медицинскую практику, бактерии стали чрезвычайно быстро приспосабливаться, постепенно формируя устойчивость ко всем новым препаратам. Приобретение резистентности — это биологическая закономерность, связанная с адаптацией микроорганизмов к условиям внешней среды. К химиопрепаратам могут адаптироваться не только бактерии, но и остальные микробы — от эукариотических форм (простейшие, грибы) до вирусов. Проблема формирования и распространения лекарственной резистентности микробов особенно значима для внутрибольничных инфекций, вызываемых так называемыми госпитальными штаммами, у которых, как правило, наблюдается множественная устойчивость к разным группам антимикробных химиотерапевтических препаратов (так называемая *полirezистентность*).

6.3.3. Генетические основы приобретенной резистентности

Устойчивость к антимикробным препаратам определяется и поддерживается генами, обуславливающими резистентность, и условиями, способствующими их распространению в микробных популяциях. Эти гены могут быть локализованы как в бактериальной хромосоме, так и в плазмидах, а также могут входить в состав профагов и мобильных генетических элементов (транспозонов). Транспозоны осуществляют перенос генов, обуславливающих резистентность с хромосомы на плазмиды и обратно, а также перенос между плазмидами и бактериофагами.

Возникновение и распространение приобретенной устойчивости к антимикробным препаратам обеспечиваются генотипической изменчивостью, связанной в первую очередь с мутациями. Мутации происходят в геноме микробов независимо от применения антибиотика, то есть сам препарат не влияет на частоту мутаций и не является их причиной, но служит фактором отбора, так как в присутствии антибиотика происходит селекция устойчивых особей, тогда как чувствительные — погибают. Далее резистентные клетки дают потомство и могут передаваться в организм следующего хозяина (человека или животного), формируя и распространяя резистентные штаммы. Предполагается также существование так называемой коселекции, то есть селективного давления не только антибиотиков, но и других факторов.

Таким образом, приобретенная лекарственная устойчивость может возникать и распространяться в популяции бактерий в результате:

- мутаций в геноме бактериальной клетки с последующей селекцией (то есть отбором) мутантов, особенно активно такая селекция идет в присутствии антибиотиков;
- переноса трансмиссивных плазмид резистентности (R-плазмид). При этом некоторые плазмиды могут передаваться между бактериями разных видов, поэтому одни и те же гены резистентности можно встретить у бактерий, таксономически далеких друг от друга (например, одна и та же плаزمида может быть у грамотрицательных бактерий, у гонококка, резистентного к пенициллину, и у гемфильной палочки, резистентной к ампициллину);
- переноса транспозонов, несущих гены резистентности. Транспозоны могут мигрировать с хромосомы на плазмиду и обратно, а также с плазмиды на другую плазмиду. Таким образом, гены резистентности могут передаваться дочерним клеткам или при передаче плазмид другим бактериям-реципиентам;
- экспрессии генных кассет интегронами. Интегроны — это генетические элементы, которые содержат в себе ген интегразы, специфический сайт интеграции и рядом с ним промотор, что придает им способность интегрировать в себя мобильные генные кассеты (например, содержащие гены резистентности) и экспрессировать присутствующие в них беспромоторные гены.

6.3.4. Реализация приобретенной устойчивости

Для осуществления своего антимикробного действия препарат должен, оставаясь активным, пройти сквозь оболочки микробной клетки и потом связаться с внутриклеточными мишенями. Однако в результате приобретения микроорганизмом генов резистентности некоторые свойства бактериальной клетки изменяются таким образом, что действие препарата не может быть выполнено.

Наиболее часто устойчивость реализуется следующими способами.

- Происходит изменение структуры мишеней, чувствительных к действию антибиотиков (модификация мишени). Фермент-мишень может быть так изменен, что его функции не нарушаются, но способность связываться с химиопрепаратом (аффинность) резко снижается или может быть включен обходной путь метаболизма, то есть в клетке активируется другой фермент, который не подвержен действию данного препарата. Например, изменение структуры пени-

- циллинсвязывающих белков (транспептидазы) приводит к возникновению резистентности к β -лактамам, изменение структуры рибосом — к аминогликозидам и макролидам, изменение структуры ДНК-гираз — к фторхинолонам, РНК-синтезаз — к рифампицину.
- Возникает недоступность мишени за счет снижения проницаемости клеточных мембран или эффлюкс-механизма — системы активного энергозависимого выброса антибиотика из клеточных мембран, что наиболее часто проявляется при воздействии малых доз препарата (например, синтез специфических белков в наружной мембране клеточной стенки бактерий может обеспечить свободный выход тетрациклина из клетки во внешнюю среду).
 - Приобретается способность к инаktivации препарата бактериальными ферментами (энзиматическая инаktivация антибиотиков). Некоторые бактерии способны продуцировать особые ферменты, обуславливающие возникновение резистентности. Такие ферменты могут разрушать активный центр антибиотика, например β -лактамазы разрушают β -лактамные антибиотики с образованием неактивных соединений. Либо ферменты могут модифицировать антибактериальные препараты путем добавления новых химических групп, что ведет к утрате активности антибиотика — аминогликозидаденилтрансферазы, хлорамфениколацетилтрансферазы и др. (таким образом инаktivируются аминогликозиды, макролиды, линкозамиды). Гены, кодирующие эти ферменты, широко распространены среди бактерий, чаще встречаются в составе плазмид, транспозонов и генных кассет. Для борьбы с инаktivующим действием β -лактамаз используют вещества-ингибиторы (например, клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам).

Предупредить развитие антибиотикорезистентности у бактерий практически невозможно, но необходимо использовать антимикробные препараты таким образом, чтобы снизить селективное действие антибиотиков, способствующее повышению стабильности генома резистентных штаммов и не способствовать развитию и распространению устойчивости.

Сдерживанию распространения антибиотикорезистентности способствует выполнение ряда рекомендаций.

Следует до назначения препарата установить возбудитель инфекции и определить его чувствительность к антимикробным химиотерапевтическим препаратам (антибиотикограмма). С учетом результатов антибиотикограммы больному назначают препарат узкого спектра, облада-

ющий наибольшей активностью в отношении конкретного возбудителя, в дозе, в 2–3 раза превышающей минимальную ингибирующую концентрацию. Поскольку начинать лечение инфекции нужно как можно раньше, то пока возбудитель неизвестен, обычно назначают препараты более широкого спектра, активные в отношении всех возможных микробов, наиболее часто вызывающих данную патологию. Коррекцию лечения проводят с учетом результатов бактериологического исследования и определения индивидуальной чувствительности конкретного возбудителя (обычно через 2–3 дня). Дозы препаратов должны быть достаточными, для того чтобы обеспечить в биологических жидкостях и тканях микростатические или микробоцидные концентрации.

Необходимо представлять оптимальную продолжительность лечения, так как клиническое улучшение не является основанием для отмены препарата, потому что в организме могут сохраняться возбудители и может быть рецидив болезни. Следует минимально использовать антибиотики в целях профилактики инфекционных заболеваний; в процессе лечения через 10–15 дней антибиотикотерапии менять антимикробные препараты, особенно в пределах одного стационара; при тяжелых, угрожающих жизни инфекциях проводить лечение одновременно 2–3 сочетающимися антибиотиками с различным молекулярным механизмом действия; применять антибиотики, комбинированные с ингибиторами β -лактамаз; уделять особое внимание рациональному применению антибиотиков в таких областях, как косметология, стоматология, ветеринария, животноводство и т.п.; не использовать в ветеринарии антибиотики, применяемые для лечения людей. Однако в последнее время даже эти меры становятся менее эффективными в связи с разнообразием генетических механизмов формирования резистентности.

Весьма важным условием для правильного выбора антимикробного препарата при лечении конкретного пациента являются результаты специальных тестов для определения чувствительности возбудителя инфекции к антибиотикам.

6.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ

Для определения чувствительности бактерий к антибиотикам (антибиотикограмма) обычно применяют следующие методы.

- Методы диффузии в агар. На агаризованную питательную среду засевают исследуемую чистую культуру микроба, а затем вносят

антибиотики. Обычно препараты вносят или в специальные лунки в агаре (количественный метод), или на поверхности посева раскладывают диски с антибиотиками (метод дисков — качественный метод). Результаты учитывают через сутки по наличию или отсутствию роста микробов вокруг лунок (дисков).

- Методы определения минимальных ингибирующих и бактерицидных концентраций, то есть минимальный уровень антибиотика, который позволяет *in vitro* предотвратить видимый рост микробов в питательной среде или полностью ее стерилизует. Это количественные методы, которые позволяют рассчитать дозу препарата, так как при лечении концентрация антибиотика в крови должна быть значительно выше минимальной ингибирующей концентрации для возбудителя инфекции. Введение адекватных доз препарата необходимо для эффективного лечения и профилактики формирования устойчивых микробов. Существуют ускоренные способы с применением автоматических анализаторов.
- Молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция и др.) позволяют исследовать геном микробов и обнаружить в нем гены резистентности.

6.5. ОСЛОЖНЕНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ СО СТОРОНЫ МАКРООРГАНИЗМА

Как всякие лекарственные средства, практически каждая группа антимикробных химиопрепаратов может оказывать побочное действие на макроорганизм и другие лекарственные средства, применяемые у конкретного пациента.

К наиболее частым осложнениям антимикробной химиотерапии относятся:

- дисбиоз (дисбактериоз);
- отрицательное воздействие на иммунную систему.

Формирование *дисбиоза* (дисбактериоз) приводит к нарушению функций желудочно-кишечного тракта, развитию авитаминоза, присоединению вторичной инфекции (кандидоз, псевдомембранозный колит, вызванный *C. difficile* и др.). Предупреждение этих осложнений состоит в назначении по возможности препаратов узкого спектра действия, сочетании лечения основного заболевания с противогрибковой терапией (нистатин), витаминотерапией, применением эубиотиков (пре-, про- и синбиотиков) и т.п.

Отрицательное воздействие на иммунную систему. Наиболее часто развиваются аллергические реакции. Гиперчувствительность может возникнуть как к самому препарату, так и к продуктам его распада, а также к комплексу препарата с сывороточными белками. Аллергические реакции развиваются примерно в 10% случаев и проявляются в виде сыпи, зуда, крапивницы, отека Квинке. Относительно редко встречается такая тяжелая форма гиперчувствительности, как анафилактический шок. Это осложнение могут вызывать β -лактаммы (пенициллины), рифамицины и др. Сульфаниламиды могут вызвать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ).

Предупреждение осложнений состоит в тщательном сборе аллергологического анамнеза и назначении препаратов в соответствии с индивидуальной чувствительностью пациента. Известно также, что антибиотики обладают некоторым иммунодепрессивным свойством и могут способствовать развитию вторичного иммунодефицита и ослаблению напряженности иммунитета. Токсическое действие препаратов чаще проявляется при длительном и систематическом применении antimicrobных химиотерапевтических препаратов, когда создаются условия для их накопления в организме. Особенно часто такие осложнения бывают, когда мишенью действия препарата являются процессы или структуры, близкие по составу или строению к аналогичным структурам клеток макроорганизма.

Токсическому действию antimicrobных препаратов особенно подвержены дети, беременные, пациенты с нарушением функций печени, почек. Побочное токсическое влияние может возникать как нейротоксическое (гликопептиды и аминогликозиды оказывают ототоксическое действие вплоть до полной потери слуха за счет воздействия на слуховой нерв); нефротоксическое (полиены, полипептиды, аминогликозиды, макролиды, гликопептиды, сульфаниламиды); общетоксическое (противогрибковые препараты — полиены, имидазолы); угнетение кроветворения (тетрациклины, сульфаниламиды, хлорамфеникол, который содержит нитробензен — супрессор функции костного мозга); тератогенное (аминогликозиды, тетрациклины нарушают развитие костей, хрящей у плода и детей, формирование зубной эмали — коричневая окраска зубов, хлорамфеникол токсичен для новорожденных, у которых ферменты печени не полностью сформированы [синдром «серого ребенка»], хинолоны — действуют на развивающуюся хрящевую и соединительную ткани).

Предупреждение осложнений состоит в отказе от противопоказанных данному пациенту препаратов, контроле состояния функций печени, почек и т.п.

Эндотоксический шок (терапевтический) возникает при лечении инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Введение антибиотиков вызывает гибель и разрушение клеток и высвобождение большого количества эндотоксина. Это закономерное явление, которое сопровождается временным ухудшением клинического состояния больного.

Взаимодействие с другими препаратами. Антибиотики могут способствовать потенцированию действия или инактивации других препаратов (например, эритромицин стимулирует выработку ферментов печени, которые начинают ускоренно метаболизировать лекарственные средства разного назначения).

6.6. ПРОТИВОВИРУСНЫЕ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

Противовирусные химиопрепараты — это этиотропные препараты, способные оказывать воздействие на отдельные звенья репродукции тех или иных вирусов, нарушая их репродукцию в инфицированных клетках. Некоторые препараты обладают вирулоцидным свойством.

В качестве противовирусных химиопрепаратов используются аналоги нуклеозидов, синтетические пептиды, аналоги пирофосфата, тиосемикарбазонов, синтетические амины.

По механизму действия противовирусные химиопрепараты подразделяются:

- на препараты, нарушающие процессы проникновения вируса в клетку и его депротенинизацию;
- ингибиторы синтеза вирусных нуклеиновых кислот;
- ингибиторы вирусных ферментов.

К препаратам, ингибирующим процесс проникновения вируса в клетку и его депротенинизацию, относятся:

- синтетические амины (амантантин), который специфически ингибирует вирусы гриппа типа А, нарушая процесс «раздевания» вируса, взаимодействуя с матриксным белком;
- искусственно синтезированные пептиды, в частности пептид из 36 аминокислот (энфувиртид), ингибирующий процесс слияния

мембраны клетки и ВИЧ-1, путем изменения конформации транс-мембранного белка *gp41* (см. раздел 16.1.11).

Препараты, ингибирующие процесс репликации вирусных нуклеиновых кислот. Ингибиторы синтеза вирусных нуклеиновых кислот в большинстве случаев являются аналогами нуклеозидов. Некоторые из них (Йодооксиуридин⁹) могут действовать как антиметаболиты, встраиваясь в вирусную нуклеиновую кислоту в процессе ее репликации и таким образом обрывая дальнейшую элонгацию цепи. Другие препараты действуют как ингибиторы вирусных полимераз.

Ингибиторы вирусных полимераз активны в фосфорилированной форме. Поскольку ингибиторы вирусных полимераз могут также ингибировать и клеточные полимеразы, предпочтение отдается тем препаратам, которые специфически ингибируют вирусные ферменты. К препаратам, избирательно действующим на вирусную полимеразу, относится аналог гуанозина ацикловир. Фосфорилирование ацикловира наиболее эффективно осуществляется не клеточной киназой, а вирусной тимидинкиназой, которая имеется у вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типа, в отношении которых активен этот препарат.

Ингибитором вирусных полимераз является также аналог тимидина Видарабин⁹.

Ингибировать вирусные полимеразы также могут и ненуклеозидные производные, в частности органический аналог неорганического пирофосфата фоскарнет натрия, который, связывая полифосфатные группы ДНК-полимеразы вируса, блокирует элонгацию молекулы ДНК. Активен в отношении вирусов гепатита В, цитомегаловирусов, ВИЧ-1.

Препараты, ингибирующие обратную транскриптазу, рассмотрены в разделе 16.1.11.

Препараты, ингибирующие процессы формирования новых вирионов

1. Производный тиосемикарбазонов (метисазон) блокирует поздние стадии вирусной репликации, вызывая образование несформированных неинфекционных вирусных частиц. Активен в отношении вируса натуральной оспы.

2. Ингибиторы вирусных ферментов. К ним относятся синтетические пептиды, которые, внедряясь в активный центр фермента, подавляют его активность. К этой группе препаратов относится ингибитор вирусной нейраминидазы вирусов гриппа А и В осельтамивир. В результате действия ингибиторов нейраминидазы не происходит отпочковывания новых вирионов из клетки.

Развитие ретровирусов, в частности ВИЧ, включает расщепление вирусной протеазой образованного в процессе трансляции вирусной иРНК полипептида на функционально-активные фрагменты. Ингибция протеазы приводит к формированию неинфекционных вирионов. Ингибиторами протеазы ретровирусов являются препараты ритонавир, индинавир.

К вирулицидным препаратам, которые инактивируют внеклеточные вирионы, относятся: Оксолин^{*}, эффективный против вирусов гриппа, герпеса; Алпизарин^{*} и ряд других.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Антибиотики могут действовать:

1. На бактерии.
2. Вирусы.
3. Грибы.
4. Простейшие.
5. Прионы.

Б. Укажите основные группы антибиотиков, нарушающих синтез клеточной стенки:

1. Тетрациклины.
2. β -Лактамы.
3. Линкозамины.
4. Гликопептиды.
5. Полиены.

В. Укажите группы синтетических микробных препаратов:

1. Полиены.
2. Сульфаниламиды.
3. Имидазолы.
4. Хинолоны.
5. Аминогликозиды.

Г. Укажите группы антимикробных препаратов, нарушающих биосинтез белка:

1. Оксазолидиноны.
2. Тетрациклины.
3. Аминогликозиды.
4. Фторхинолоны.
5. Карбопинемы.

Д. Осложнения со стороны макроорганизма:

1. Дисбиоз.
2. Эндотоксический шок.

3. Анафилактический шок.
4. Нарушение кроветворения.
5. Токсическое действие на слуховой нерв.

Е. Во врачебной практике для лечения инфекционных процессов применяют комбинированные препараты, состоящие из комбинации амоксициллин + клавулановая кислота и ампициллин + сумбактам. Объясните их преимущество перед отдельными антибиотиками.

Глава 7

УЧЕНИЕ ОБ ИНФЕКЦИИ

7.1. ИНФЕКЦИЯ. ФОРМЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Понятия «инфекция» и «инфекционная болезнь» не являются синонимами.

Понимая под **инфекцией** взаимодействие патогенного (болезнетворного) микроорганизма и восприимчивого (чувствительного) хозяина в определенных условиях внешней среды, следует заметить, что **инфекционная болезнь** — это крайняя степень проявления инфекционного процесса, когда образуется патологический очаг и появляется специфическая клиническая симптоматика.

В основе инфекции лежит феномен паразитизма, определяющий антагонистические взаимоотношения симбионтов.

Классифицируют различные формы инфекционного процесса (инфекции) в зависимости от природы патогена, происхождения, условий возникновения инфекции, характера и длительности ее течения и т.д.

В зависимости от природы патогена, принадлежности к определенному таксону существует классификация инфекций по *этиологическому принципу*:

- *бактериальные* (дизентерия, сальмонеллез, дифтерия, туберкулез, гонорея и т.д.);
- *вирусные* (грипп, ВИЧ-инфекция, оспа, энцефалит, бешенство и т.д.);
- *грибковые* (кандидоз, аспергиллез, трихофития и др.);
- *протозойные* (малярия, токсоплазмоз, лямблиоз);
- *прионные* (куру, болезнь Крейтцфельда–Якоба, скрепи).

Если геном возбудителя интегрируется (встраивается) в геном хромосомы хозяина, то возникший инфекционный процесс может передаваться по наследству через генетический материал из поколения в поколение хозяина. Это интегративная форма инфекции. Примером

интегративной формы инфекции являются инфекции вирусной этиологии (лизогения в микробном мире, канцерогенез — раковые линии мышей). Большинство инфекций, которыми болеет человек, по наследству не передаются (туберкулез, холера, грипп и т.д.) и называются неинтегративными. Нельзя путать интегративную форму инфекции с врожденной, когда возбудитель передается от матери плоду через плаценту (сифилис, ВИЧ-инфекция и т.д.), или новорожденный во время родов инфицируется при прохождении через родовые пути матери (бленнорея).

По происхождению инфекции делят на экзогенные и эндогенные.

- **Экзогенная** инфекция возникает при попадании возбудителя в организм извне. Для экзогенной инфекции обязательно наличие трех элементов эпидемического процесса: источник инфекции, механизм передачи патогена, восприимчивый организм. Например, для сифилиса: источник инфекции — больной человек, механизм передачи патогена половой, восприимчивый организм — человек.
- **Эндогенная** (оппортунистическая) инфекция вызывается представителями нормальной микрофлоры при снижении защитных сил организма (иммунодефицитные состояния). Возбудители эндогенной инфекции относятся к условно-патогенным видам микроорганизмов. Пример эндогенной инфекции — фурункул носа стафилококковой этиологии (*Staphylococcus epidermidis*). Инфекция возникла при переохлаждении организма и развитии местного иммунодефицита слизистой оболочки носа. Эндогенная инфекция может развиваться и при перемещении микроорганизмов из одного биотопа человека в другой за счет искусственного переноса руками, инструментами либо естественного перехода микроорганизма — его транслокации (миграции). Пример такой формы — эшерихиозный цистит, возбудитель *E. coli*, которая попала на слизистую оболочку мочеполовой системы из кишечника.

По локализации патогена в организме различают местную и генерализованную формы инфекции.

Местная или очаговая инфекция возникает тогда, когда возбудитель локализуется в определенном органе либо ткани и не распространяется по организму. Например, при ангине возбудитель (чаще всего *Streptococcus pyogenes*) находится на слизистой оболочке миндалин; при фурункулезе возбудитель *Staphylococcus aureus* — в волосяном фолликуле.

При **генерализованной** инфекции патоген распространяется по организму, преодолевая различные защитные барьеры: лимфоидную ткань,

гематоэнцефалический барьер, фасции мышечной ткани, соединительную ткань и т.д.

Кровь является одним из частых путей распространения патогена — гематогенный путь. Если возбудитель, распространяясь по крови, не размножается в ней, то такое явление называют бактериемией или вирусемией (в зависимости от принадлежности патогена к той или другой таксономической группе). В случае когда бактерии размножаются в крови, развивается одна из тяжелых форм генерализованной инфекции — сепсис. Сепсис может перейти в септикопиемию, когда патоген размножается во внутренних органах, вызывая в них образование гнойных очагов воспаления. При высокой концентрации бактерий и их токсинов в крови может развиваться токсико-септический шок за счет массивного поступления токсинов. Вследствие генерализации инфекции поражаются различные органы и ткани организма (менингококковый менингит, туберкулез позвоночника).

Инфекционный процесс классифицируется в зависимости от числа проникших в организм видов патогена и динамики их действия.

- *Моноинфекция* вызывается патогеном одного вида (туберкулез, дифтерия).
- *Смешанная (микст) инфекция* — одновременное заражение двумя и более видами возбудителей и развитие сразу нескольких заболеваний (ВИЧ-инфекция и гепатит В при заражении через шприц у наркоманов; сифилис, гонорея и хламидиоз при половом заражении).
- *Реинфекция* — повторное заражение тем же видом возбудителя после выздоровления. Реинфекция возможна при заболеваниях, после которых не остается стойкого иммунитета: гонореи, сифилиса, дизентерии. Если повторное заражение происходит тем же возбудителем до выздоровления, то возникает *суперинфекция* (сифилис).
- *Вторичная инфекция* возникает на фоне развившегося первичного заболевания и вызывается другим видом возбудителя. Вторичная инфекция может быть экзогенной или эндогенной. Чаще вторичная инфекция развивается как эндогенная, когда вследствие ослабления организма первичным заболеванием представители нормальной микрофлоры тела человека вызывают вторичное заболевание как осложнение первичного, например, при гриппе развивается стафилококковая пневмония, при синдроме приобретенного иммунодефицита — пневмоцистная пневмония.

По длительности течения различают острые и хронические инфекции.

Острые инфекции протекают непродолжительное время, их срок исчисляется днями, неделями (грипп, корь, холера, чума).

Хронические инфекции протекают в течение нескольких месяцев, лет (бруцеллез, туберкулез, сифилис). При определенных условиях (неэффективное лечение) острые инфекции могут переходить в хронические (гонорея, дизентерия). Хронические инфекции протекают в виде **ремиссии** и **рецидива**, которые сменяют друг друга. При ремиссии больной может чувствовать себя удовлетворительно, клинические симптомы болезни могут не проявляться либо проявляются в незначительной степени. При рецидиве отмечают обострение патологического процесса, выраженность клинической картины. При хроническом инфекционном процессе возбудитель персистирует в организме хозяина, то есть длительно паразитирует в его тканях и клетках.

Особенности эпидемиологии инфекционного процесса позволяют классифицировать несколько форм инфекции.

Эпидемической называется инфекция, когда ею охвачено население больших территорий (одной или нескольких стран), например грипп, холера.

Эндемическая инфекция локализуется в определенной географической местности, где возбудитель циркулирует между определенными видами животных в данной географической местности (чума, бруцеллез, туляремия).

В зависимости от источников заражения человека различают *антропонозные*, *зоонозные* и *сапронозные* инфекции. При *антропонозных* инфекциях единственным источником заражения является человек (ВИЧ-инфекция, сифилис). При *зоонозных* инфекциях основным источником заражения являются животные (бешенство, сибирская язва, бруцеллез). Возбудителями *сапронозных* инфекций являются сапрофиты, обитающие во внешней среде (легионеллез, листериоз). Следовательно, источниками заражения сапронозами являются объекты внешней среды: почва (столбняк, газовая гангрена), вода (лептоспирозы).

В настоящее время большое распространение получила *госпитальная* (внутрибольничная) инфекция, которая возникает в лечебно-профилактических учреждениях (стационарах, родильных домах и т.д.). Источником возникновения госпитальной инфекции часто является медицинский персонал: бактерионосители стафилококков, энтеробактерий и других условно-патогенных или патогенных микроорганизмов.

Типичное инфекционное заболевание чаще всего протекает в манифестной форме и характеризуется определенными клиническими проявлениями (симптомокомплексом) и циклическим течением. Например, при типичном течении брюшного тифа наблюдается тифозный статус, развивается розеолезная сыпь на 8–10-й день болезни и т.д. Болезнь протекает стадийно и продолжается 3–4 нед.

Возможно атипичное (стертое) течение болезни без характерного симптомокомплекса. При стертом течении брюшного тифа сыпь появляется рано (на 4–6-й день), скудная; тифозный статус не выражен. В ряде случаев болезнь может протекать вообще без проявления каких-либо симптомов, и результат развившегося патологического процесса может проявиться лишь в виде смертельно опасных осложнений (легочное кровотечение при бессимптомно протекающем туберкулезе легких, перитонит как следствие перфорации кишечника брюшнотифозными язвами, порок сердца как следствие ревматического эндокардита).

Инфекционный процесс может протекать в форме бессимптомной инфекции:

- латентной (скрытой);
- бактерионосительства (вирусоносительства).

При *латентной* форме инфекции возбудитель длительное время находится в организме (персистирует), но не проявляет своего патогенного действия. Например, туберкулезная палочка может персистировать многие годы в ткани легкого здорового человека, вирус герпеса пожизненно персистирует в чувствительных ганглиях тройничного нерва, возбудитель бруцеллеза персистирует в мезентериальных лимфатических узлах. При латентной инфекции возбудитель не выделяется во внешнюю среду, латентная инфекция может переходить в манифестную форму (болезнь) при снижении иммунитета.

Бактерионосительство — длительное или кратковременное пребывание возбудителя в организме здорового человека. В отличие от латентной инфекции, бактерионосители выделяют возбудителя в окружающую среду и являются источниками распространения инфекции (брюшной тиф, дифтерия, стафилококковая инфекция). *Медленная инфекция* характеризуется персистенцией патогена, при которой происходит многомесячный или многолетний инкубационный период, после которого медленно, но неуклонно развиваются симптомы заболевания, всегда заканчивающегося летально (ВИЧ-инфекция, бешенство, проказа).

В развитии инфекционной болезни выделяют четыре основных периода:

- 1) инкубационный;
- 2) продромальный;
- 3) разгар болезни;
- 4) реконвалесцентный (выздоровление).

Инкубационный период — период адгезии возбудителя на чувствительные клетки организма в месте входных ворот. Это могут быть миндалины, верхние дыхательные пути, слизистая оболочка желудочно-кишечного, репродуктивного тракта и др. В окружающую среду возбудитель не выделяется. Длительность периода от нескольких часов (грипп), дней (чума, туляремия, дифтерия) до нескольких месяцев (бешенство) и даже лет (синдром приобретенного иммунодефицита, проказа, губчатая энцефалопатия).

В *продромальный период* отмечается колонизация чувствительных клеток, участков организма возбудителем. Осуществляется расселение микроорганизмов в биотопе хозяина, и начинают появляться неспецифические (общие) симптомы болезни (повышается температура тела, возникают головная боль, потоотделение, слабость и др.). В этот период возбудитель также, как правило, не выделяется в окружающую среду.

Последующее интенсивное размножение возбудителя в организме хозяина знаменует *разгар болезни* с появлением специфической симптоматики (высыпания на коже при тифах, параличи нижних конечностей при полиомиелите, пленчатые налеты на слизистых оболочках носа, зева, гортани при дифтерии и др.). В этот период больной заразен, так как возбудитель выделяется во внешнюю среду.

После прекращения размножения возбудителя и по мере выведения его из организма наступает период *реконвалесценции* (выздоровления). К этому моменту начинается восстановление нарушенных функций. Как правило, прекращается выделение микроорганизмов, но в некоторых случаях возможно формирование реконвалесцентного бактерионосительства с длительным пребыванием возбудителя в организме хозяина, перенесшего инфекцию.

Особое место при характеристике инфекции имеют пути ее передачи, что важно для эпидемиологических целей. Существуют три основных варианта передачи возбудителя человеку: горизонтальный, вертикальный и искусственный (искусственный).

Горизонтальный вариант включает:

- воздушно-капельную передачу возбудителя от больного здоровому (грипп, дифтерия);
- фекально-оральный путь (холера, брюшной тиф);
- половой путь (сифилис, гонорея);
- трансмиссивный путь (чума, энцефалиты).

Для *вертикального варианта* типичен *трансплацентарный* путь передачи возбудителя от матери к плоду (сифилис, краснуха) или в родах от матери к новорожденному (бленнорея).

Артифициальный (рукотворный, искусственный) вариант предусматривает передачу возбудителя при инструментальном обследовании больного, введении инъекций, при оперативных вмешательствах (гепатиты, синдром приобретенного иммунодефицита).

Различают 4 уровня инфекционного процесса:

- 1) популяционный;
- 2) организменный;
- 3) клеточный;
- 4) молекулярный.

Популяционный уровень определяет взаимодействие возбудителя с восприимчивыми особями популяции. Для *организменного* уровня важен комплекс (система) реакций восприимчивого хозяина на инфекцию. *Клеточный* или тканево-органный уровень — это выбор возбудителем соответствующих клеток-мишеней макроорганизма. На *молекулярном* уровне рассматривается конкурентное взаимодействие биомолекул патогена и хозяина в условиях инфекции.

7.2. ДВИЖУЩИЕ СИЛЫ ИНФЕКЦИОННОГО ПРОЦЕССА

Исходя из определения инфекционного процесса, выявляют по крайней мере 3 основных участников инфекции: возбудителя, хозяина и факторы внешней среды.

Возбудитель болезни — микробная клетка, характеризуется количественными и качественными характеристиками: патогенностью (видовой признак) и вирулентностью (индивидуальная характеристика штамма).

Платформа, на которой разворачивается инфекция, — это организм человека-хозяина, который должен быть восприимчив к инфекту (видовой признак) и быть чувствительным к нему (индивидуальная характеристика), то есть иметь инфекционную чувствительность. При этом

физиологические характеристики хозяина, состояние его естественной резистентности играют далеко не последнюю роль.

И наконец, третий участник инфекции — условия внешней среды, в которой происходит инфицирование организма возбудителем. Различные физические, химические, биологические и социальные факторы среды имеют существенное значение для формирования и развития инфекционного процесса. При гибели патогена либо хозяина инфекционный процесс прерывается. В условиях же взаимной адаптации патогена и хозяина (персистенции патогена) происходит продолжение инфекционного процесса в форме резидентного бактерионосительства, латентной инфекции или хронического заболевания. Факторы внешней среды, хотя и в различной степени, участвуют в формировании инфекционного процесса, определяя его развитие и исход.

Таким образом, возникновение, течение и исход инфекционного процесса зависят от качественных и количественных характеристик партнеров в каждой конкретной ситуации взаимодействия паразит–хозяин. Скажем, при чуме и ВИЧ-инфекции ведущая роль в развитии инфекционного процесса принадлежит возбудителю, ибо он почти в 100% случаев вызывает болезнь и высокую летальность (исключается факт вакцинации). Развитие эндогенных, вторичных инфекций, вызываемых условно-патогенными микробами (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* и др.), во многом определяют защитные силы хозяина. Для возникновения госпитальных инфекций (стафилококковые и др.) большое значение имеет как иммунный статус хозяина, так и состояние противоэпидемических мероприятий в лечебно-профилактическом учреждении, то есть условия внешней среды. По какому сценарию будет развиваться инфекция, определяют движущие силы инфекционного процесса.

7.3. РОЛЬ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ И ЕГО ОСНОВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Возбудитель как участник инфекционного процесса характеризуется двумя основными качествами: патогенностью и вирулентностью.

Патогенность — видовой признак: способность определенного вида микроорганизмов вызывать соответствующий инфекционный процесс у одного или нескольких видов организма хозяина. Например, патогенные виды *Vibrio cholerae*, *S. Typhi*, *N. gonorrhoeae* способны вызывать соответствующую инфекцию у человека, но не у других видов.

Однако этот диапазон (спектр) патогенности у разных микробов различный. Если названные микроорганизмы (печальная «привилегия» рода человеческого) патогенны только для человека, то число восприимчивых хозяев для других микроорганизмов значительно больше и не ограничивается только человеком. Для *Mycobacterium tuberculosis* составляет 9 видов, *Y. pestis* — 11 видов, *Br. abortus* — 21 вид, а для *F. tularensis* — 141 вид, включая не только животных, но и птиц. Диапазон патогенности микробов сформировался в результате длительной эволюции системы паразит-хозяин. Отсюда и разные корни происхождения патогенных видов микроорганизмов.

От возбудителей болезней предков человека — человекообразных обезьян произошли вирусы герпеса и иммунодефицита человека, малярийный плазмодий. Микробы — паразиты членистоногих способствовали отбору возбудителей сыпных тифов (риккетсиозов). Нормальная микрофлора тела человека — родоначальник возбудителей дизентерии, дифтерии, полиомиелита. Дикие животные до появления человека страдали от бешенства, чумы, туляремии. От домашних животных к человеку перешли такие болезни, как корь, брюшной тиф, натуральная оспа. Микробы-сапрофиты дали начало возбудителям холеры, сифилиса, лептоспирозов.

Патогенные виды микробов реализуют свою способность вызывать инфекционный процесс у большинства особей популяции восприимчивого вида макроорганизма.

Если же способность микроба вызывать инфекцию у восприимчивого вида макроорганизма в значительной степени определяется состоянием иммунитета особей популяции и, как правило, инфекция развивается в условиях иммунодефицита, то такие виды микробов называются условно-патогенными, например *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*.

Вирулентность — индивидуальный, штаммовый признак: степень (количественная мера) реализации патогенности вида каждым конкретным штаммом по отношению к конкретному индивидууму — хозяину. Если штамм *Vibrio cholerae* выделен от больного А., погибшего от холеры, значит, он оказался по отношению к этому индивидууму высоковирулентным. Степень вирулентности конкретного штамма внутри популяции патогенного вида микроорганизмов можно оценивать по клиническому течению инфекционного процесса у человека, от которого выделен данный штамм; на модели *in vivo* путем воспроизведения экспериментальной инфекции на животных; на модели *in vitro* путем

качественного и количественного изучения факторов вирулентности конкретного штамма (клинико-лабораторные исследования).

На модели экспериментальной инфекции проводят количественную оценку вирулентности штамма, используя условно принятые единицы измерения вирулентности: DLM и LD₅₀. DLM (от лат. *Dosis letalis minima*) — наименьшее количество микробных клеток, способное вызвать гибель 95% животных восприимчивого вида определенной массы, пола и возраста при определенном способе заражения и в течение заданного времени. LD₅₀ — количество бактерий, вызывающее гибель 50% животных в эксперименте. В ряде случаев с экспериментальной целью определяют DCL (от лат. *Dosis certa letalis*) — смертельную дозу, вызывающую 100% гибель инфицированных животных.

Вирулентность возбудителя можно регулировать в сторону как ее снижения, так и повышения. В свое время французские исследователи Кальмет и Жерен культивировали возбудитель туберкулеза (бычьего типа) на картофельно-глицериновых средах с добавлением желчи (неблагоприятный фактор для возбудителя) в течение 13 лет. В результате им удалось осуществить около 230 посевов возбудителя, потерявшего вирулентность, и на основе авирулентного штамма создать вакцину БЦЖ (бациллы Кальмета–Жерена) для профилактики туберкулеза. В ряде случаев вирулентность микробов снижается под воздействием различных физико-химических факторов, лекарств и т.д. Снижение вирулентности штаммов называют *аттенуацией* (ослаблением).

С другой стороны, известно, что путем пассажа (проведения) через организм восприимчивых животных удастся повысить вирулентность возбудителя, что нередко бывает необходимо при проведении экспериментальных работ.

К условиям, регулирующим вирулентность возбудителя, относят химический состав бактериальной клетки, особенности ее метаболизма, структуру генома и среду обитания (экологию).

7.3.1. Факторы вирулентности

Классификация факторов вирулентности зависит от их структуры, происхождения, механизма действия и назначения.

По структуре и происхождению факторы вирулентности можно классифицировать на две основные группы:

- 1) структурные компоненты бактериальной клетки;
- 2) секретируемые факторы.

Структурные компоненты бактериальной клетки

К ним относятся капсула, пили, пептидогликан клеточной стенки, белки наружной мембраны и ЛПС грамотрицательных бактерий.

Секретируемые факторы

Помимо структур бактериальной клетки, способствующих проявлению ее вирулентных качеств, известна группа микробных секретируемых факторов, участвующих в инфекционном процессе: бактериоцины, экзотоксины, ферменты «защиты и агрессии», секретируемые факторы персистенции.

Бактериоцины — белки, медиаторы межмикробного взаимодействия, секретируются бактериальной клеткой в качестве антагонистически активных веществ. Бактериоцины выделяются в условиях близкородственного антагонизма внутри вида, рода бактерий. Бактериоцины обеспечивают колонизацию вирулентным штаммом определенного биотопа, подавляя нормальную микрофлору: колицины *Shigella flexneri* подавляют *E. coli*, стафилококкцины *S. aureus* подавляют *S. epidermidis* и т.д. Колициногенные штаммы шигелл чаще вызывают затяжные и более тяжелые формы заболевания, чем неколициногенные. Бактериоциногенные штаммы стафилококков значительно чаще выделяются от больных из патологических очагов, чем с кожи и слизистых оболочек здоровых людей. При хронических формах стрептококковой инфекции (ревматизм, хронический тонзиллит) бактериоциногенные штаммы обнаруживаются в 2 раза чаще, чем у здоровых людей.

Экзотоксины — вещества белковой природы, секретируемые вирулентными штаммами микроорганизмов и оказывающие токсическое действие на клетки и ткани организма хозяина.

К факторам вирулентности относятся и ферменты, продуцируемые бактериальной клеткой. Ферменты вирулентности образно называют ферментами «защиты и агрессии». Ферменты *защиты* обеспечивают устойчивость патогена к иммунитету хозяина: фермент коагулаза свертывает плазму крови, вследствие чего вокруг бактериальной клетки образуется защитная капсула; протеазы иммуноглобулинов разрушают антитела. Ферменты *агрессии* обеспечивают распространение патогена по организму, они разрушают структуры клеток и тканей организма: гиалуронидаза разрушает соединительную ткань (*S. aureus*, *S. pyogenes*), нейраминидаза расщепляет сиаловые кислоты оболочек клеток (вирус гриппа), фибринолизин растворяет сгустки фибрина (*S. pyogenes*),

ДНКаза разрушает нуклеиновые кислоты (*S. aureus*), эластаза расщепляет лизоцим клеток организма (*Pseudomonas*).

Ферменты метаболизма бактерий, вызывающие образование токсичных веществ при расщеплении субстратов организма, также рассматривают в качестве ферментов вирулентности: микробная уреаза при гидролизе мочевины образует токсичные вещества (*Helicobacter pylori*), декарбоксилаза при разрушении белка способствует накоплению биогенных аминов (*Salmonella Enteritidis*). Вирулентность бактерий обеспечивается ферментами супероксиддисмутазой и каталазой, которые инактивируют высокоактивные кислородные радикалы при фагоцитозе (*Leg. pneumophila*, *M. tuberculosis*).

Секретируемые факторы персистенции бактерий подавляют специфические и неспецифические механизмы защиты хозяина, обеспечивая бактериям выживание при инфекции. По химической природе это в основном бактериальные протеазы, расщепляющие специфический субстрат хозяина, создающий ему защиту от патогена. Они обеспечивают антилизоцимную, антиинтерфероновую, антикомплементарную, антигистоновую, антилактоферриновую и антигемоглобиновую активность.

В реализации вирулентности возбудителя важна доставка вирулентных протеинов на поверхность бактериальной клетки в участок контакта ее с поверхностью эукариотической клетки и/или введения протеинов в цитозоль клетки хозяина. В процессе эволюции у бактерий выработано несколько типов секреторных систем, которые подробно описаны в разделе 3.1.5. Термин «секреция» используется для описания активного транспорта протеинов из цитоплазмы через внутреннюю и наружную мембраны в супернатант (окружающую среду) бактериальной культуры или на поверхность бактериальной клетки. Секреция отличается от экспорта, который заключается в транспортировке протеинов из цитоплазмы в периплазматическое пространство.

Напомним, что *секреторная система I типа* (Т1СС) является *sec*-независимым путем (не находится под контролем *sec*-гена, отвечающего за секрецию). Этим путем транспортируются α -гемолизин *E. coli*, внеклеточная аденилатциклаза *B. pertussis*, протеазы *P. aeruginosa*. Молекулы, транспортируемые секреторной системой I типа, требуют для транспортировки 3–4 вспомогательные молекулы, участвующие в образовании трансмембранного канала, через который и происходит выход протеинов.

Секреторная система II типа (Т2СС) — основная для экстраклеточных расщепляющих энзимов грамотрицательных бактерий. Эта система

использует традиционные *sec*-зависимые пути для выведения экспортируемых молекул через внутреннюю мембрану в периплазматическое пространство. II тип секреторной системы участвует в экспорте огромного количества разнообразных молекул, включая вирулентные факторы: пили у *P. aeruginosa* (IV типа) и родственные им энзим-*pullulanase* у *Klebsiella*, пектические энзимы и целлюлазы у *Erwinia*, эластазы, экзотоксин А, фосфолипазы С и другие протеины у *Pseudomonas aeruginosa*, амилазы и протеазы у *Aeromonas hydrophila* и т.д.

Секреторная система III типа (ТЗСС) — большая экспортная система, независимая от *sec*-системы, которая играет существенную роль в секреции вирулентных факторов у возбудителей болезней человека и растений. ТЗСС обнаружена у бактерий рода *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Chlamydia*. Эффекторныe белки этой системы способны реорганизовывать цитоскелет эукариотической клетки, что способствует проникновению микроба в клетку-хозяина и распространению микроба по клеточному пластику; кроме того эффекторные молекулы ТЗСС принимают участие в процессе инактивации активных форм кислорода и азота и вовлекаются в биосинтез поверхностных структур бактериальной клетки (флагеллярных белков).

В отличие от секреторного пути I типа, являющегося истинной секреторной системой, в котором секреторные энзимы приобретают активность в экстраклеточном пространстве, тип III — это механизм для транслокации протеинов в цитозоль эукариотической клетки, ибо он обеспечивает сборку на поверхности бактериальной клетки супермолекулярных структур, участвующих в транспорте протеинов в эукариотическую клетку. Аппарат секреторной системы III типа включает около 20 протеинов, большинство которых располагается во внутренней мембране, и цитоплазматическую мембраносвязанную АТФазу (АТФазу) (рис. 7.1).

Секреторная система IV типа (Т4СС) представляет закрепленный на клеточной поверхности мультипротеиновый комплекс, внутри которого находится канал. Через этот канал происходит доставка эффекторных молекул в клетку-хозяина поршневым механизмом. Обеспечивает внутриклеточное существование бруцелл, коксииелл, легионелл.

Секреторная система V типа (Т5СС) включает группу так называемых аутопортёров — семейство секреторных протеинов, осуществляющих свой собственный транспорт из бактерий: гонококковую IgA-протеазу и IgA-протеазу *H. influenzae*.

Секреторная система VI типа (Т6СС) была обнаружена в 2006 г. у *V. cholera*, *P. aeruginosa*. Мутации в генах, детерминирующих эту структуру, приводили к снижению вирулентности. Представляет собой

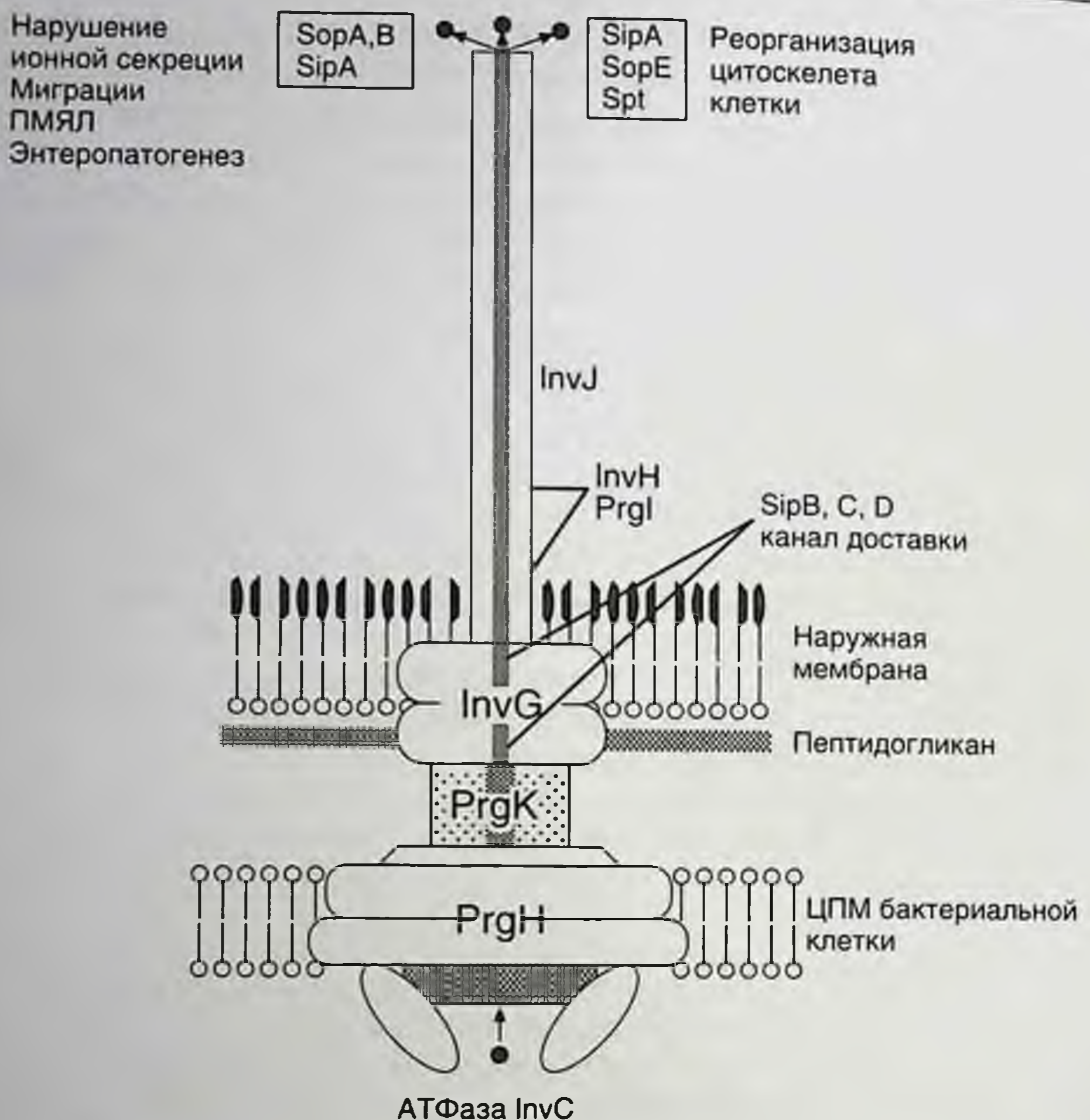


Рис. 7.1. Схема строения секреторной системы III типа у *Salmonella*: PrgH, PrgK, InvG, H, J; PrgI — белки, формирующие шприц; Sip B, C, D — белки транслокационного комплекса; SopA, B, E, SipA; Spt — эффекторные белки; ПМЯЛ — полиморфноядерные лейкоциты; ЦПМ — цитоплазмическая мембрана

полипротеиновую структуру, по архитектонике напоминающую строение хвостового отростка фага T4. Способна секретировать эффекторные молекулы в эукариотическую клетку. Придает бактериям преимущество в бактериальных биоценозах.

7.3.2. Патогенетические факторы возбудителя при инфекции

Классификация факторов патогенности по назначению и механизму действия включает патогенетически значимые продукты бактериальной

клетки, определяющие этапность развития инфекционного процесса и его исход. Эти факторы объединяют в 4 группы: колонизации, инвазии, токсигенности и персистенции.

Факторы колонизации патогена

Колонизация — расселение микроорганизмов в определенном биотопе хозяина. Этот этап инфицирования организма начинается с *адгезии* — прикрепления возбудителя к клеткам организма у входных ворот инфекции. За прикрепление микроба отвечают специальные структуры — адгезины. У грамотрицательных бактерий в этот процесс включаются пили (ворсинки), белки наружной мембраны, а у грамположительных микроорганизмов — тейхоевые кислоты, поверхностные белки. Адгезия специфична у каждого возбудителя с учетом его тропности к тканям, клеткам хозяина, где и осуществляется рецепторлигандное прикрепление возбудителя. Последующее закрепление возбудителя на эукариотических клетках организма вызывает расселение микроорганизмов в инфицированном биотопе хозяина. Этому способствуют участие бактериальных протеаз, блокирующих секреторную защиту организма IgA, продукция бактериоцинов, антиоксидантов, продукция сидерофоров, конкурирующих с лактоферрином за ионы Fe. Таким образом, адгезия и последующая колонизация — начальные (ранние) стадии патогенеза инфекционного процесса.

Факторы инвазии микроорганизмов

Инвазия — проникновение возбудителя внутрь клеток организма (пенетрация), преодоление естественных барьеров организма (кожа, слизистые оболочки, лимфатическая система и др.). Этим процессом управляют инвазины — молекулы бактерий, способствующие проникновению патогена в клетку. В этот период усиливается действие токсичных продуктов — уреазы осуществляет гидролиз мочевины с образованием в организме аммиака, токсичных биогенных аминов. Микроорганизмы продуцируют гемолизин, разрушающий эритроциты, лейкоцидин, разрушающий лейкоциты, спридинг-факторы — ферменты агрессии, способствующие генерализации инфекции за счет распространения возбудителя в организме. Включаются в работу такие *ферменты агрессии*, как *лецитовителлаза*, расщепляющая липопротеид мембран клеток хозяина, *фибринолизин*, устраняющий сгусток фибрина для дальнейшего распространения микроба по организму; *гиалуронидаза*, расщепляющая гиалуроновую кислоту — вещество соединительной ткани; *нейраминидаза* — фермент

распространения патогена, IgA-протеаза, обеспечивающая устойчивость возбудителя к перевариванию фагоцитами и действию антител и др. Процесс инвазии у некоторых грамотрицательных бактерий обеспечивается III типом секреторной системы, которая отвечает за секрецию факторов инвазии, в частности, у сальмонелл и шигелл; молекул сигнальной трансдукции энтеропатогенной кишечной палочки. В процессе инвазии в эпителиальные клетки возбудитель (*S. typhimurium*) вступает в интимные отношения с клетками и использует физиологические механизмы обеспечения их жизнедеятельности для обслуживания собственных нужд, вызывая массивную реаранжировку цитоскелета клетки-хозяина и активацию вторичных мессенджеров — транзитное повышение уровня инозитолтрифосфата и выброс Ca^{2+} .

В защите от фагоцитоза принимают участие как поверхностные структуры бактериальной клетки, так и продуцируемые ею вещества. Антифагоцитарной активностью обладают капсулы (*S. pneumoniae*, *N. meningitidis*), поверхностные белки: А-белок у *S. aureus*, М-протеин у *S. pyogenes*. Некоторые бактерии, например возбудитель коклюша, продуцируют *внеклеточную аденилатциклазу*, ингибирующую хемотаксис, таким образом позволяя бактерии избежать захвата фагоцитами. Ферменты супероксиддисмутаза и каталаза инактивируют высокореактивные кислородные радикалы при фагоцитозе (*Y. pestis*, *L. pneumophila*, *S. typhi*). Отмечено участие секреторной системы III типа у некоторых бактерий в реорганизации цитоскелета фагоцита, предотвращающее образование фаголизосомы.

Факторы токсигенности бактерий

Токсигенность — продукция бактериями токсичных веществ, повреждающих клетки и ткани организма хозяина.

Наличие токсина у бактерий является патогенетически значимым в ходе развития инфекционного процесса. Токсичный компонент присутствует практически при любой инфекции и проявляет свое действие, хотя и в разной степени.

Токсины, секретируемые возбудителем в среду, обнаруживаются в фазе роста и накапливаются в цитоплазме. Это белки-*экзотоксины*. *Эндотоксины* входят в состав клеточной стенки и высвобождаются лишь при гибели микробной клетки.

К *эндотоксинам* относят ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий, пептидогликан, тейхоевые и липотейхоевые кислоты, гликолипиды микобактерий. Хорошо изучены эндотоксины энтеробактерий

(эшерихии, шигеллы, сальмонеллы, бруцеллы). Некоторые бактерии одновременно образуют как экзо-, так и эндотоксины (холерный вибрион, некоторые патогенные кишечные палочки и др.).

Сравнительная характеристика бактериальных экзотоксинов и эндотоксина ЛПС клеточной стенки грамотрицательных бактерий представлена в табл. 7.1.

Экзотоксины секретируются живой бактериальной клеткой, являются белками, полностью инактивируются под действием высокой температуры (90–100 °С). Они обезвреживаются формальдегидом в концентрации 0,3–0,4% при 37 °С в течение 3–4 нед, при этом сохраняют свою антигенную специфичность и иммуногенность, то есть переходят в *вакцину-анатоксин* (столбнячный, дифтерийный, ботулиновый, стафилококковый и др.).

Экзотоксины обладают специфичностью действия на клетки и ткани организма, определяя клиническую картину заболевания.

Специфичность экзотоксина определяется механизмом его действия на определенные мишени (табл. 7.2). Способность микробов к продукции экзотоксинов обусловлена в основном конвертирующими бактериофагами.

Таблица 7.1. Сравнительная характеристика токсинов бактерий

Экзотоксины	Эндотоксины (ЛПС грамотрицательных бактерий)
1. Выделяются микробом в среду	1. Освобождаются при разрушении бактерий
2. Белки	2. Глюцидолипидно-протеиновый комплекс
3. Термолабильны (60–80 °С, 10 мин)	3. Термостабильны (120 °С, 30 мин)
4. Высокотоксичны	4. Слаботоксичны
5. Органо-, цитотропны	5. Не обладают избирательным действием на клетки
6. Активные антигены. Высокая иммуногенность	6. Слабые антигены
7. Легко обезвреживаются (0,3–0,4% формальдегидом 30 дней, 40 °С)	7. Трудно обезвреживаются (трихлоруксусной кислотой)
8. Образуют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии	8. Образуют грамотрицательные бактерии

Таблица 7.2. Механизмы действия экзотоксинов

Мишени действия токсина	Механизм действия токсина	Тип токсина	Вид бактерий-продуцентов
Цитоплазматическая мембрана	Повышение проницаемости мембран	Гемолизины, лейкоцидин	<i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>C. tetani</i>
Рибосомы	Блок синтеза белка в клетке	Цитотоксины (энтеротоксины, некротоксины)	<i>C. diphtheriae</i> , <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. perfringens</i>
Ферменты клеток	Активация клеточной аденилатциклазы	Энтеротоксины	<i>E. coli</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Y. enterocolitica</i>
	Блок передачи нервных импульсов	Нейротоксины	<i>C. tetani</i> , <i>C. botulinum</i>
Медиаторы межклеточного взаимодействия	Нарушение межклеточных связей	Эксфолиатины, эритрогенины	<i>S. aureus</i> , <i>S. pyogenes</i>

Информация об эндотоксинах заложена в хромосомных генах бактерий, как и в любом другом клеточном компоненте.

Эндотоксины, в отличие от экзотоксинов, обладают меньшей специфичностью действия. Эндотоксины всех грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *S. typhi*, *N. meningitidis*, *Brucella abortus* и др.) угнетают фагоцитоз, вызывают падение сердечной деятельности, гипотонию, повышение температуры тела, гипогликемию. Большое количество поступившего в кровь эндотоксина приводит к токсикосептическому шоку.

Как и вирулентность, сила действия токсинов измеряется величиной летальных доз DLM, LD₅₀, DCL, определяемой на животных.

Токсины, повреждающие цитоплазматическую мембрану клеток организма, способствуют лизису клеток: эритроцитов (гемолизины стафилококков, стрептококков и др.), лейкоцитов (лейкоцидин стафилококков).

Разнообразна группа токсинов, нарушающих функцию ферментов клетки. Экзотоксин *C. diphtheriae*, являясь цитотоксином, блокирует синтез белка на рибосоме клеток миокарда, надпочечников, нервных ганглиев, эпителиоцитов слизистой оболочки зева. Развиваются некроз клеток и тканей, воспаление: дифтеритическая пленка, миокар-

дит, полиневрит. Энтеротоксины холерного вибриона, энтеротоксигенных штаммов *E. coli*, *S. aureus* и другие активируют аденилатциклазу в эпителиоцитах слизистой оболочки тонкой кишки, что приводит к повышению проницаемости стенки кишечника и развитию диарейного синдрома. Нейротоксины палочек столбняка и ботулизма блокируют передачу нервных импульсов в клетках спинного и головного мозга.

Особая группа токсинов стафилококков и стрептококков (эксфолиатины, эритрогенины) нарушает межклеточные взаимодействия, что приводит к поражению кожи (пузырчатка новорожденных, скарлатинозная сыпь) и других органов.

Эритрогенный токсин является суперантигеном, вызывает пролиферацию Т-клеток, активируя тем самым каскад компонентов эффекторного звена иммунной системы, выброс медиаторов с цитотоксическими свойствами — интерлейкинов (ИЛ), факторов некроза опухоли (ФНО), ИФН- γ . Инфильтрация лимфоцитов и локальное действие цитокинов играют важную роль в патогенезе инвазивной стрептококковой инфекции при целлюлитах, некротических фасциитах, септических поражениях кожи, поражениях внутренних органов.

Факторы персистенции патогенов

Персистенция возбудителя — форма симбиоза, способствующая длительному выживанию микроорганизмов в инфицированном организме хозяина (от лат. *persistere* — оставаться, упорствовать).

Переход бактерий из одной среды существования в другую (внешняя среда — клетка хозяина) — вынужденный ход микроорганизмов, позволяющий в конечном счете обеспечить им выживание как вида, поэтому персистенция бактерий в организме рассматривается как стратегия выживания вида. Смена экологической ниши бактериальной клеткой и ее переход в организм хозяина сопровождаются неизменным появлением новых биологических характеристик у бактерий, облегчающих адаптацию патогена к новым условиям среды обитания.

Выживание бактерий в тканях хозяина определяется динамическим процессом равновесия между разрушением бактерий защитными факторами организма и накоплением (размножением) бактерий, которые угнетают защитные механизмы макроорганизма или избегают их.

При блокировании бактериями защитных механизмов хозяина, то есть освоении ими экологической ниши, определенную роль играют структурные особенности патогена.

В отличие от вирусов или риккетсий, бактерии имеют свои особенности при персистенции, связанные со своеобразием строения бактериальной клетки. Наличие пептидогликана, который присутствует только у прокариот и отсутствует в эукариотических клетках, делает его отличной иммунологической мишенью в организме хозяина, быстро определяющей чужеродную субстанцию. Пептидогликан — маркер чужеродности бактерий в условиях инфицированного хозяина. Поэтому любые адаптационные процессы бактериальной клетки, направленные на защиту (или изоляцию) пептидогликановой структуры клеточной стенки, можно рассматривать в качестве механизмов персистенции бактерий.

В процессе взаимодействия обоих участников инфекции у возбудителя эволюционно закрепилось 4 способа защиты пептидогликана от факторов иммунитета: экранирование клеточной стенки бактерий; продукция секретиремых факторов, инактивирующих защиту хозяина; антигенная мимикрия; образование форм с отсутствием (дефектом) клеточной стенки бактерий (L-формы, микоплазмы).

Персистенция микроорганизмов — базовая основа формирования *бактерионосительства*.

В патогенетическом плане бактерионосительство — одна из форм инфекционного процесса, при которой наступает динамическое равновесие между микро- и макроорганизмом на фоне отсутствия патологических изменений, но с развитием иммуноморфологических реакций и антительного ответа.

Для бактерионосительства характерна взаимная адаптация паразита и хозяина в целях симбиоза и возможной персистенции патогена. При этом, с одной стороны, происходит селекция биоваров носительских штаммов с комплексом факторов колонизации, персистенции и патогенности, а с другой — перестройка механизмов защиты хозяина с формированием его иммунокомпromетированного статуса (иммунный дисбаланс, толерантность, дефицит местного иммунитета). В итоге создаются условия для персистенции (выживания) возбудителя, что и приводит к бактерионосительству.

7.3.3. Генетика вирулентности бактерий

Рассматривать жизнь возбудителя в инфицированном организме, вероятно, следует как серию шагов генной активации в ответ на дискретный комплекс окружающих условий. Эта генная регуляция виру-

лентности бактерий является экологически зависимой, обеспечивающей пластичность микроорганизмов, их адаптивные потенции.

Известно, что бактерии обладают одним большим эволюционным механизмом, благодаря которому идет формирование патогенных представителей. Гены вирулентности чаще всего обнаруживаются в больших сложных блоках, обозначенных как хромосомные вставки или патогенные острова (см. подробнее раздел 5.1.5). Эти острова и островки связаны между собой общими последовательностями, что указывает на приобретение ДНК-сегмента с помощью таких событий, как «незаконные» рекомбинации, имеющие сходство с транспозицией или вставкой фага. Эти ДНК-блоки наиболее часто встраиваются в горячие точки хромосомы — самые восприимчивые участки к вторжению чужеродных ДНК или места встраивания фага. Например, большие сегменты ДНК, кодирующие различные вирулентные факторы, встроены в одно и то же место хромосомы, как у уропатогенной, так и у энтеропатогенной *E. coli* — возбудителей двух различных заболеваний, причем последовательности, расположенные внутри патогенного островка, не обнаруживают гомологии с теми, что наблюдаются у непатогенных клонов, подобных *E. coli* K-12, но последовательности, непосредственно прилегающие к патогенному островку, демонстрируют общность у патогенных и непатогенных штаммов.

Регионы хромосомных ДНК, кодирующих несколько кластрированных генов вирулентности, общие среди микроорганизмов от возбудителей растений до *Helicobacter pylori* и *Yersinia pestis*. В то же время, несмотря на определенную консервативность (в частности, хромосом *E. coli*, *S. typhimurium*), бактериальные хромосомы не являются константными, а постоянно изменяются. Фенотипические изменения способны модифицировать патогенность внутри различных клональных вариантов одного вида. Например, хромосома *S. typhi*, которая вызывает заболевание только у человека, подлежит большой геномной реаранжировке в ходе своей эволюции по сравнению с нетифоидными сальмонеллами, а именно инверсиям, транспозициям и вставкам через события гомологических рекомбинаций. Естественно, некоторые из этих событий могут изменять вирулентность *S. typhi* и повышать ее специфические адаптационные способности к организму человека. Регуляцию и экспрессию хромосомных вирулентных факторов могут изменять и такие эпизоды, как перетасовка хромосомных генов.

Считают, что патогенные микроорганизмы эволюционируют не за счет медленной адаптивной эволюции предсуществующих генов.

а через сумму скачков, как правило, овладевая генетическими сегментами (которые кодируют множественные вирулентные факторы) не только родственных, но и неродственных организмов, и включают даже эукариотические последовательности (приобретение тирозиновой фосфатазы *Yersinia*). В последующем приобретенная генетическая информация интегрируется в хромосому или стабильную плазмиду. Соответствующая селекция вирулентных факторов обеспечивает сохранность таких последовательностей у возбудителей, а распространение этой генетической информации через мобильные генетические элементы (многие вирулентные гены кодируются на мобильных генетических элементах ДНК) дает гарантию возможности получения любыми микроорганизмами селективных преимуществ. Информация, которая не является необходимой, в основном теряется, так как отсутствует селективное условие для ее сохранения.

Экспрессия факторов вирулентности тесно связана с различными сигналами окружающей среды, в том числе с температурой, концентрацией ионов, осмолярностью, уровнем железа, pH , наличием источника углерода, уровнем кислорода и рядом других, пока не установленных. Возбудитель способен использовать как один сигнал, так и их комплекс, чтобы «почувствовать», какое микроокружение он оккупирует внутри хозяина или даже внутри специализированного компартмента единственной клетки хозяина. Поэтому на каждом шаге инфекционного цикла (в ходе достижения бактериями своих биологических задач) в ответ на калейдоскоп защитных ответов хозяина происходят динамическое включение и выключение различных генов — согласованный и взаимообусловленный процесс.

Например, экспрессия одного из антифагоцитарных факторов возбудителя чумы, фракции F_1 , экспрессируется максимально при 35–37 °С, когда возбудитель находится в организме человека, и падает при 28 °С при нахождении его в организме блохи. Инвазивные гены обычно включаются на ранней стадии инфекции, но репрессируются, когда бактерия оказывается внутри клетки хозяина. Дезорганизация экспрессии патогенных факторов во времени может разрушить процесс инвазии бактерий.

Таким образом, регуляция патогенности — это комплексное событие. Все вирулентные факторы могут контролироваться одновременно несколькими регуляторными системами, которые измеряют различные параметры окружающей среды, и в то же время несколько регуляторных систем могут регулировать один вирулентный фактор. Кроме того,

регуляторные факторы обычно регулируют сами себя, что создает иерархию в регуляции и тонком контроле за экспрессией вирулентных факторов. В результате уровень вирулентности определяется средней величиной всех сигналов (окружения и регуляции).

7.4. РОЛЬ МАКРООРГАНИЗМА В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Организм хозяина — это платформа, на которой разворачивается инфекционный процесс со всеми его проявлениями, и если микроб определяет специфичность инфекции, то особенности ее течения и формы проявления определяются состоянием макроорганизма.

Как и у микроба, здесь следует различать два основных признака: видовой и индивидуальный. Видовой признак — это восприимчивость хозяина к инфекту.

Восприимчивость — видовой признак, характеризующийся как способность определенного вида организмов (хозяев) участвовать в инфекционном процессе при взаимодействии с патогеном.

Организм человека восприимчив к холерному вибриону, но летучие мыши имеют врожденную устойчивость к этому возбудителю. Для возбудителя туляремии организм зайцев, мышей, хомячков — подходящая ниша, где бактерии размножаются и вызывают инфекцию, но кошки, лисицы, хорьки генетически устойчивы к этому патогену. Ряд заболеваний характерен только для организма человека — сифилис, гонорея, дифтерия, так как подобрать других кандидатов для воспроизведения экспериментальной инфекции практически не удастся за счет природной устойчивости животных к этим патогенам.

Что касается индивидуального признака, характеризующего меру восприимчивости организма к инфекции, то его определяют как инфекционную чувствительность.

Инфекционная чувствительность — это индивидуальная восприимчивость организма хозяина к патогену, вызывающему болезнь. Часто вместо термина «инфекционная чувствительность» используют термин с противоположным значением — «естественная резистентность», что делает эти понятия синонимами. Однако и в том и в другом случае речь идет о врожденном (естественном) иммунитете, который, кроме своей неспецифичности в отношении к инфекту, всегда стойкий и передается по наследству, так как генетически запрограммирован.

Этот *естественный иммунитет* или *естественная резистентность* к патогену направлены на поддержание гомеостаза организма. Это неспецифическое распознавание чужеродной для хозяина информации (патогенов) осуществляется по единой программе, активность системы постоянная и не зависит от специфичности чужеродного агента. Он имеет как клеточную (клетки покровов и внутренних барьеров, фагоцитирующие клетки, естественные киллеры), так и гуморальную (лизоцим, комплемент, β -лизины, белки острой фазы и др.) основу. Среди факторов, определяющих естественную резистентность организма к инфекции выделяют: возраст хозяина, эндокринологический и иммунный статус, состояние физической активности, центральной нервной системы, эндогенные биологические ритмы, входные ворота инфекции и др.

Возраст существенно определяет уровень неспецифической защиты организма. У новорожденных в течение первого месяца жизни значительно снижена бактерицидная активность сыворотки крови. У детей чаще развиваются генерализованные формы инфекции, сепсис, тяжелее протекают многие инфекционные заболевания: сальмонеллез, дизентерия, туберкулез и др. Только у новорожденных отмечают колиэнтерит, так как их организм еще не вырабатывает секреторные IgA — основной фактор защиты слизистой оболочки тонкой кишки. Снижен уровень естественной резистентности и у лиц пожилого возраста. В связи с нарушением функции лизосом у пожилых снижена активность внутриклеточного уничтожения патогена, поэтому они чаще болеют рецидивным сыпным тифом (болезнь Брилла) и чаще страдают от брюшнотифозного бактерионосительства.

Известен ряд болезней — коклюш, корь, дифтерия, которые типичны для детей. Лица пожилого возраста чаще погибают от пневмонии. Туберкулезная инфекция охватывает людей зрелого возраста.

Есть незначительные различия в уровне показателей естественной резистентности у лиц женского и мужского пола. У женщин выше, чем у мужчин, уровень бактерицидной активности сыворотки. Известно, что они более устойчивы к менингококковой и пневмококковой инфекции. Однако отдать предпочтение какому-либо полу в плане резистентности организма к инфекции затруднительно.

Эндокринологический статус человека имеет большое значение в регуляции уровня естественной резистентности. Гормон задней доли гипофиза окситоцин стимулирует активность фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов. Глюкокортикоиды снижают уровень естественной

резистентности, а минералокортикоиды повышают его. Больные сахарным диабетом чувствительны ко многим инфекциям, особенно к туберкулезу, фурункулезу стафилококковой этиологии. Снижение функции паращитовидных желез часто приводит к развитию кандидоза. Гормоны щитовидной железы стимулируют большинство факторов естественной резистентности. Их успешно используют для лечения сепсиса, вирусных гепатитов, менингококковой инфекции.

Иммунный статус человека определяет его индивидуальную чувствительность к отдельным инфекциям. Лица со II группой крови чаще болеют пневмонией и сепсисом стафилококковой этиологии, натуральной оспой, гриппом. У них ниже уровень ИФН в клетках и крови по сравнению с людьми с другой группой крови. Люди с I группой крови чаще подвержены чуме и проказе. Наличие в HLA-системе (комплекс гистосовместимости) антигена A9 способствует устойчивости этих лиц к острым респираторным заболеваниям. Люди, у которых в HLA-системе есть антигены A10, B18, DR, болеют ими чаще.

Состояние физической активности человека регулирует уровень его естественной резистентности. Спортсмены-профессионалы, члены сборных команд высокочувствительны к инфекциям, так как интенсивные тренировки и участие в ответственных спортивных соревнованиях истощают резервы организма, снижают его естественную резистентность: уровень бактерицидной активности сыворотки, фагоцитарный потенциал нейтрофилов у классных спортсменов на фоне их высокой спортивной формы оказывается сниженным более чем в 2 раза по сравнению с людьми, занимающимися обычной физкультурой. В то же время занятия физкультурой и повышение двигательного режима являются средством усиления естественной резистентности организма к инфекции, что находит объяснение в нормализации уровня комплемента и лизоцима, в повышении способности крови к самоочищению.

Центральная нервная система принимает активное участие в регуляции уровня естественной резистентности организма к инфекции. Грызуны во время зимней спячки устойчивы к возбудителю чумы, но по мере просыпания весной погибают от чумной инфекции. Кролики во время медикаментозного сна резистентны к вирусу осповакцины, от которого они погибают во время бодрствования. В условиях стресса резко снижается естественная резистентность организма. У мышей после иммобилизационного стресса развивалась смертельная форма гриппозного энцефалита, тогда как в нормальных условиях мыши были резистентны к вирусу гриппа. Интересно, что на поверхности лимфо-

цитов и макрофагов имеются рецепторы к медиаторам нервной системы: β -адренорецепторы, холинорецепторы и др.

Эндогенные биологические ритмы. У человека с момента его рождения все процессы в организме протекают с определенной цикличностью. Выявлена определенная цикличность в динамике показателей естественной резистентности к инфекции (установлены месячные и суточные биоритмы).

Определены хронобиограммы иммунологических показателей здорового человека, что отражает различные временные интервалы максимальных значений факторов гуморальной и клеточной природы естественной резистентности. Это оказалось важным для выбора времени оптимального введения лекарств больным при инфекционной патологии.

Значение для развития инфекции имеют и ее *входные ворота*. Входные ворота инфекции — место проникновения возбудителя в организм человека, во многом определяют возможность развития инфекционного процесса. Вирус гриппа, попав в кожу или на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, не в состоянии вызвать заболевание. Грипп возникнет только при условии колонизации возбудителем слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Существует понятие «колонизационная резистентность», которая определяет защитные возможности организма у входных ворот инфекции. В связи с этим инфекции разделяют на воздушно-капельные (грипп, менингококковая инфекция, дифтерия), кишечные (холера, дизентерия, гепатит А), инфекции наружных покровов (столбняк, газовая гангрена, бешенство), трансмиссивные (чума, малярия, туляремия).

7.4.1. Анатомо-физиологические барьеры организма при инфекции

Естественная резистентность организма включает ряд анатомо-физиологических барьеров, препятствующих как проникновению патогена в организм, так и его распространению по организму. Среди основных анатомо-физиологических барьеров естественной защиты организма при инфекции выделяют: кожу и слизистые оболочки (наружный барьер), нормальную микрофлору; лимфатические узлы, клетки ретикулоэндотелиальной системы, воспаление; кровь — клеточные и гуморальные факторы; гематоэнцефалический барьер.

Кожа не только служит механическим барьером для патогена, но и обладает бактерицидным свойством за счет секретов сальных и потовых

желез. Чистота кожи повышает ее бактерицидность. Известен показатель бактерицидной активности кожи, который определяется по отношению к индикаторным тест-штаммам *E. coli*. Этот показатель входит в число стандартных тестов оценки резистентности организма космонавтов перед полетом в космос. Повреждение кожи является условием для развития раневых инфекций: газовой гангрены, столбняка, бешенства.

Слизистые оболочки обеспечивают защиту не только как механический барьер за счет слизи, целостности эпителиального покрова, функции ворсинок. Эпителиоциты слизистых оболочек и железы разных биотопов выделяют на поверхность бактерицидные секреты: слюну, слезную жидкость, желудочный сок, сок тонкой кишки, вагинальный секрет, лизоцим и т.д. При нарушении барьерной функции слизистые оболочки становятся входными воротами инфекции для многих патогенов: возбудителей кишечных инфекций и инфекций дыхательных путей, возбудителей заболеваний, передаваемых половым путем и др.

Важная роль в защите биотопов организма от патогена отводится *нормальной* (резидентной или индигенной) *микрорефлоре*. Основными представителями нормальной микрофлоры толстой кишки являются кишечная палочка и бифидобактерии, в носоглотке — коринеформные бактерии и непатогенные нейссерии, на коже — эпидермальные стафилококки.

Микрофлора слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта у детей существенно отличается от таковой у взрослых и меняется в зависимости от возраста ребенка, условий его существования, характера питания и т.д. Так, у детей до прорезывания зубов в микрофлоре рта преобладают аэробные бактерии. После прорезывания зубов микрофлора рта ребенка аналогична микрофлоре взрослых, что связано и с изменением характера питания.

Огромное количество микроорганизмов содержится в полости кишечника. Исследование кишечной флоры у детей показало, что микробы в мекониуме появляются со второй половины первых суток жизни. Вначале появляются кокки, затем в кишечнике определяются грамположительные палочки со спорами. В небольшом количестве в мекониуме обнаруживаются также кишечные палочки, вульгарный протей. С 3-го дня, когда появляются бифидобактерии, споровые палочки исчезают.

Основой кишечной микрофлоры у детей, находящихся на грудном вскармливании, являются бифидобактерии, которые составляют около 90% всех микробов кишечника. Встречаются кишечные палочки,

энтерококки, ацидофильная палочка и аэрогенные бактерии. У детей, находящихся на искусственном вскармливании, преобладают кишечные палочки, а количество бифидобактерий снижается. Защитная роль нормальной микрофлоры состоит в выделении антагонистически активных веществ (антибиотиков, бактериоцинов, микроцинов), подавляющих патоген, его способности колонизировать кожу, слизистые оболочки. Нормальная микрофлора образует пленку в биотопе. Кроме защитного антагонизма, известны детоксицирующая, иммуностимулирующая и витаминобразующая функции нормальной микрофлоры, ее участие в пищеварении. Подавление нормальной микрофлоры вследствие заболевания или широкого применения антибиотиков приводит к формированию дисбактериоза, который может стать причиной развития различных форм патологии, в том числе и микробного генеза. Для профилактики и лечения дисбактериоза используются эубиотики — препараты, содержащие живые антагонистически активные штаммы: представители нормальной микрофлоры организма (колибактерин, бифидумбактерин, лактобактерин).

Второй защитный барьер организма включает *функцию лимфатических узлов, клеток ретикулоэндотелиальной системы, развитие воспаления*. Лимфатические узлы выполняют барьерофиксирующую функцию, могут длительно задерживать патоген, не допуская его проникновения в кровь (например, фиксация гемолитического стрептококка в лимфоидной ткани миндалин, задержка бруцелл, возбудителя чумы, стафилококка, туберкулезных палочек в регионарных лимфатических узлах). За счет лимфатических узлов предотвращается развитие генерализованной формы инфекции. При подавлении барьерной функции лимфатических узлов могут развиваться бактериемия (брюшной тиф, бруцеллез) и сепсис (чума, стафилококковая и стрептококковая инфекции).

Печень, селезенка, эндотелий кровеносных сосудов за счет клеток ретикулоэндотелиальной системы являются своеобразными фильтрами, в которых застревают патогены и таким образом не допускается генерализация инфекции (брюшной тиф). Воспаление в своей основе служит защитной реакцией организма, так как в результате воспалительной реакции вокруг патогена концентрируются специализированные клетки, которые должны либо уничтожить возбудителя, либо ограничить его распространение, например при гнойном мастите стафилококковой этиологии в ткани молочной железы образуется локальный гнойный очаг (абсцесс), предотвращающий генерализацию стафилококковой инфекции.

Одним из методов лечения хронических инфекций является назначение препаратов, усиливающих воспалительную реакцию организма как защитную (хроническая гонорея, хроническая дизентерия). Однако иногда воспаление может выполнять противоположную патогенетическую функцию, то есть способствовать развитию патологического процесса, нарушению структуры и функции органа (ткани): воспаление легких (пневмония), воспаление почек (нефрит). В таком случае назначают противовоспалительную терапию.

Третья достаточно мощная преграда на пути распространения патогена по организму — это кровь. *Бактерицидная активность крови*, то есть ее способность к самоочищению, обеспечивается комплексом гуморальных и клеточных факторов естественной резистентности организма. Если кровь перестает выполнять свою бактерицидную функцию, то возбудитель беспрепятственно пребывает и размножается в крови, а через кровь проникает и локализуется в разных органах и тканях. В таких случаях развиваются тяжелые, генерализованные формы инфекции, сепсис и септикопиемия, которые создают реальную угрозу жизни организма-хозяина (чумной сепсис, сибиреязвенный сепсис, стафилококковая септикопиемия).

Четвертый барьер организма — *гематоэнцефалический*, который защищает ткань мозга (головного, спинного) от поражения патогеном. В защитные структуры гематоэнцефалического барьера входят оболочки мозга, стенки кровеносных сосудов, питающих мозговую ткань. Проникновение возбудителя в мозговую ткань приводит к развитию менингоэнцефалитов (менингококк, риккетсии Провачека, вирусы бешенства и энцефалитов). Ткани головного мозга защищены нейро-секретируемыми гормонами задней доли гипофиза — окситоцином и вазопрессином, которые наряду с антимикробной активностью подавляют и персистентный потенциал многих патогенов, что используется в клинической практике для борьбы с инфекцией.

7.5. РОЛЬ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ В ИНФЕКЦИОННОМ ПРОЦЕССЕ

Внешняя среда является обязательным участником в инфекционном процессе, его третьей движущей силой. Факторы внешней среды (физические, химические, биологические и социальные) могут существенно влиять на развитие, течение и исход инфекционного процесса.

Важным физическим фактором является *температура*. Классические опыты Уолкера и Боринга на модели экспериментальной вирусной инфекции показали, что повышение температуры тела организма приводит к активации факторов естественной резистентности, в частности усилению продукции ИФН. При высокой температуре усиливаются механизмы противовирусной защиты. Поэтому при лечении больных вирусными инфекциями не оправдано снижение высокой температуры тела, если нет для этого жизненно важных показаний. С другой стороны, снижение в холодное время года температуры тела человека (простудный фактор) приводит к ослаблению естественной резистентности. В связи с действием разных температур существует сезонность ряда инфекционных заболеваний. Повышение заболеваемости воздушно-капельными инфекциями (острая респираторная вирусная инфекция, грипп) бывает в холодное время года (зимой) под действием простудного фактора, кишечными инфекциями — в летне-осенний период, когда в условиях высокой температуры возбудители кишечных инфекций (дизентерия, холера, гепатит А, брюшной тиф) интенсивно размножаются во внешней среде, а также распространяются с пищевыми продуктами и водой.

Особенности *питания*, наличие витаминов в пище могут существенно влиять на естественную резистентность. В весенний период в связи с авитаминозом обостряются хронические инфекционные заболевания (туберкулез, ревматизм и др.). Витамин В₁₂ и другие производные бензимидазола (дибазол), являясь стимуляторами синтеза белка в организме, повышают его естественную резистентность. Поэтому эти препараты используют для профилактики инфекционных болезней.

Солнце управляет жизненными процессами на нашей планете. Выявлена зависимость между активностью Солнца, его геомагнитной активностью, инфекционной заболеваемостью и смертностью среди людей. Выявлена цикличность патологических процессов и показателей естественной резистентности. Установлена связь между активностью Солнца и экспрессией факторов вирулентности микроорганизмов.

Социальный фактор — мощный фактор внешней среды, влияющий на устойчивость организма к инфекции. Антибиотикотерапия, вакцинапрофилактика позволяют достаточно эффективно управлять инфекционным процессом. Благодаря глобальным противоэпидемическим мероприятиям человечество избавилось от натуральной оспы, успешно ведет борьбу с полиомиелитом. Однако есть болезни, созданные

человеком (*men made diseases*): туберкулез, вирусные гепатиты, ВИЧ-инфекция, болезни, передаваемые половым путем.

Социальные болезни — следствие пороков человеческого общества: наркомании, проституции и т.п. Техногенное загрязнение внешней среды способствует развитию инфекционных заболеваний. Высокое содержание в воздухе, воде солей тяжелых металлов, сероводородсодержащих соединений, радиоактивных элементов приводит к формированию иммунодефицитов в организме, а, с другой стороны, в ряде случаев стимулирует экспрессию факторов вирулентности патогена. Так, природный сероводородсодержащий газ Оренбургского, Астраханского, Карачаганакского природных месторождений резко усиливал персистентный потенциал стафилококков, делая население этих газоносных провинций заложниками формирования резидентного стафилококкового бактерионосительства.

Таким образом, формы, течение и исход инфекционного процесса зависят как от вирулентности штамма патогенного микроорганизма, так и от состояния естественной резистентности и иммунитета организма хозяина, где регулирующую функцию выполняют факторы внешней среды.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Назовите форму инфекционного процесса, при которой возбудитель длительное время находится в организме, не проявляя патогенных свойств и не выделяясь в окружающую среду:

1. Бактерионосительство.
2. Латентная инфекция.
3. Медленная инфекция.
4. Острая инфекция.

Б. Назовите факторы, способствующие колонизации бактерий в макроорганизме:

1. Бактериоцины.
2. Адгезины.
3. Эндотоксин.
4. IgA-протеаза.

В. Назовите факторы, способствующие инвазии бактерий:

1. Гиалуронидаза.
2. Эффекторные белки секреторной системы III типа.
3. Эндотоксин.
4. Пили.

Г. В защите от фагоцитоза, помимо поверхностных структур бактериальной клетки, участвуют секретлируемые этой клеткой вещества. Отметьте ферменты, принимающие участие в подавлении фагоцитоза бактерий:

1. Внеклеточная аденилатциклаза.
2. IgA-протеаза.
3. Каталаза.
4. Супероксиддисмутаза.

Д. Отметьте положения, характерные для экзотоксина:

1. Является слабым антигеном.
2. Обладает специфичностью действия.
3. Термостабилен.
4. Стимулирует образование в организме нейтрализующих антител.

Е. У пациента, болеющего гриппом, развилась пневмония, вызванная *S. pneumoniae*. Назовите форму инфекционного процесса, к которой относится вызванная *S. pneumoniae* пневмония.

Ж. Одним из методов лабораторной диагностики инфекционных болезней является метод гемокультуры, при котором возбудителя выделяют из крови больного. Назовите состояния инфекционного процесса, при которых возбудитель можно выделить из крови.

Часть II

ОБЩАЯ ИММУНОЛОГИЯ



УЧЕНИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ И ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

8.1. ВВЕДЕНИЕ В ИММУНОЛОГИЮ

8.1.1. Основные этапы развития иммунологии

Известно, что организм человека живет и развивается в непосредственном контакте с представителями живой и неживой природы и разнообразными биоорганическими молекулами естественного или искусственного происхождения, обладающими биологической активностью. Попадая в организм человека, чужеродные молекулы могут вмешиваться и нарушать биологические процессы, создавая угрозу жизни отдельному индивидууму. Отличительной чертой этих агентов является генетическая чужеродность. Зачастую подобные продукты образуются внутри организма человека в результате синтетической активности населяющей нас микрофлоры, клеточных мутаций и всевозможных модификаций макромолекул, из которых мы построены.

Для защиты от нежелательной и губительной интервенции эволюция создала у представителей живой природы специальную систему противодействия, совокупный эффект которой был определен как «иммунитет» (от лат. *immunitas* — освобождение от чего-либо, неприкосновенность). Применялся этот термин уже в средние века для обозначения, например, освобождения от уплаты от податей, а позже — неприкосновенности дипломатической миссии. Смысл этого термина точно соответствует тем биологическим задачам, которые определила эволюция в отношении иммунитета. Основными задачами служат распознавание генетического отличия интервента от собственных структур и устранение его влияния на биологические процессы, протекающие в организме, с помощью комплекса специальных реакций и механизмов. Конечная

цель деятельности системы иммунной защиты — сохранение гомеостаза, структурной и функциональной целостности и генетической индивидуальности, как отдельного организма, так и вида в целом, а также выработка средств профилактики подобных интервенций в будущем.

Следовательно, иммунитет — это способ защиты организма от генетически чужеродных веществ экзогенного и эндогенного происхождения, направленный на поддержание и сохранение гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма и генетической индивидуальности каждого организма и вида в целом.

Иммунитет как общебиологическое и общемедицинское явление, его анатомические структуры, механизмы функционирования в организме изучает специальная наука — иммунология. Эта наука возникла более 100 лет назад. По мере прогресса человеческих знаний менялись взгляды на иммунитет, на его роль в организме, на механизмы иммунных реакций, расширялась сфера практического использования достижений иммунологии, а в соответствии с этим менялось и определение иммунологии как науки. Зачастую иммунологию трактуют как науку, которая изучает специфическую невосприимчивость к возбудителям инфекционных болезней и разрабатывает способы защиты от них. Это однобокий взгляд, который не дает всестороннего, всеобъемлющего понимания науки, исходя из сущности и механизмов иммунитета и его роли в жизнедеятельности организма.

На современном этапе развития учения об иммунитете иммунологию можно определить как общебиологическую и общемедицинскую науку, которая изучает способы и механизмы защиты организма от генетически чужеродных веществ экзогенного и эндогенного происхождения в целях поддержания гомеостаза, структурной и функциональной целостности организма и генетической индивидуальности отдельного индивидуума и вида в целом.

Одним из важнейших разделов иммунологии является *медицинская иммунология*. В настоящее время медицинская иммунология решает такие важные проблемы, как диагностика, профилактика и лечение инфекционных болезней (иммунопрофилактика или вакцинология), аллергических состояний (аллергология), злокачественных опухолей (иммуноонкология), болезней, в механизме которых играют роль иммунопатологические процессы (иммунопатология), иммунные взаимоотношения матери и плода на всех стадиях репродукции (иммунология репродукции), изучает иммунные механизмы и вносит практический вклад в решение проблемы трансплантации органов и тканей (транс-

плантационная иммунология); можно также выделить иммуногематологию, изучающую взаимоотношения донора и реципиента при переливании крови, иммунофармакологию, изучающую влияние на иммунные процессы лекарственных веществ.

Хронологически иммунология как наука уже прошла два больших периода:

- 1) протоиммунологии (от античного периода до 80-х годов XIX в.), связанный со стихийным, эмпирическим познанием защитных реакций организма;
- 2) период зарождения экспериментальной и теоретической иммунологии (с 80-х годов XIX в. до второго десятилетия XX в.).

В течение второго периода завершилось формирование классической иммунологии, которая носила в основном характер инфекционной иммунологии. С середины XX в. иммунология вступила в третий молекулярно-генетический период, который продолжается до наших дней. Этот период характеризуется быстрыми темпами развития молекулярной и клеточной иммунологии и иммуногенетики. Предохранение от заболевания натуральной оспой путем прививки человеку королевой оспы предложил более 200 лет назад английский врач Э. Дженнер, однако это наблюдение носило чисто эмпирический характер. Поэтому основоположниками научной иммунологии по праву считаются французский ученый-химик Л. Пастер, открывший принцип вакцинации, русский ученый-зоолог И.И. Мечников — автор учения о фагоцитозе, и немецкий врач-биохимик П. Эрлих, сформулировавший гипотезу об антителах. В 1888 г. за выдающиеся заслуги Л. Пастера перед человечеством на народные пожертвования был учрежден Институт иммунологии (ныне Институт Пастера), ставший школой, вокруг которой группировались иммунологи многих стран.

Российские ученые активно участвовали в становлении и развитии иммунологии. Более 25 лет И.И. Мечников был заместителем директора по науке в Институте Пастера, то есть был его ближайшим помощником и единомышленником. В Пастеровском институте работали многие выдающиеся русские ученые: М. Безредка, Н.Ф. Гамалея, Л.А. Тарасович, Г.Н. Габричевский, И.Г. Заболотный, В.А. Барыкин, Н.Я. и Ф.Я. Чистовичи и многие другие. Эти ученые продолжали развивать традиции Пастера и Мечникова в иммунологии и, по существу, создали русскую школу иммунологов.

Российским ученым принадлежат многие выдающиеся открытия в области иммунологии: И.И. Мечников заложил основы учения

о фагоцитозе, В.К. Высокович одним из первых сформулировал роль ретикулоэндотелиальной системы в иммунитете, Г.Н. Габричевский описал явление хемотаксиса лейкоцитов, Ф.Я. Чистович стоял у истоков открытия тканевых антигенов, М. Райский установил феномен ревакцинации, то есть иммунологической памяти, М. Сахаров — один из основоположников учения об анафилаксии, акад. Л.А. Зильбер стоял у истоков учения об антигенах опухолей, акад. П.Ф. Здродовский обосновал физиологическое направление в иммунологии, акад. Р.В. Петров внес весомый вклад в развитие неинфекционной иммунологии.

Российские ученые по праву являются лидерами в разработке фундаментальных и прикладных проблем вакцинологии и иммунопрофилактики в целом. Хорошо известны в нашей стране и за рубежом имена создателей вакцин: Б.Я. Эльберт, Н.А. Гайский (против туляремии); Н.Н. Гинзбург (против сибирской язвы); М.П. Чумаков, А.А. Смородинцев (против полиомиелита); А.А. Смородинцев (против кори, паротита, гриппа); П.Ф. Здродовский (против ку-лихорадки и сыпного тифа); А.А. Воробьев, Г.В. Выгодчиков, П.Н. Бургасов (против полианатоксинов, против раневых инфекций и ботулизма) и др. Российские ученые принимали активное участие в разработке вакцин и других иммунобиологических препаратов, стратегии и тактики иммунопрофилактики, глобальной ликвидации и снижении уровня инфекционных болезней. В частности, по их инициативе и с их помощью ликвидирована натуральная оспа на земном шаре (В.М. Жданов, О.Г. Анджапаридзе), успешно ликвидируется полиомиелит (М.П. Чумаков, С.Г. Дроздов). Иммунология за сравнительно короткий исторический период добилась существенных результатов в снижении и ликвидации болезней человека, сохранении и поддержании здоровья людей нашей планеты.

8.1.2. Виды иммунитета

Способность к распознаванию чужеродных структур и защите собственного организма от интервентов сформировалась довольно рано. Элементарные системы защиты от любых чужеродных веществ имеют уже низшие организмы, в частности беспозвоночные (губки, кишечнополостные, черви). Организм человека, как и всех теплокровных животных, уже имеет сложноорганизованную систему противодействия генетически чужеродным агентам. Однако анатомическое строение, физиологические функции и реакции, обеспечивающие такую защиту у отдельных видов животных, у человека и низших организмов в соответ-

ствии с уровнем эволюционного развития существенно различаются. Так, фагоцитоз и аллогенная ингибиция как одни из ранних филогенетических защитных реакций присущи всем многоклеточным организмам. Дифференцированные лейкоцитоподобные клетки, выполняющие функции клеточного иммунитета, появляются уже у кишечнополостных и моллюсков; у круглоротых (миноги) возникают зачатки тимуса, Т-лимфоциты, иммуноглобулины, отмечается иммунная память. У рыб уже есть типичные для высших животных лимфоидные органы — тимус и селезенка, плазматические клетки и антитела класса М. Птицы обладают центральным органом иммунитета в виде сумки Фабрициуса, у них появляется способность реагировать в виде гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ). Наконец, у млекопитающих иммунная система достигает наиболее высокого уровня развития: формируются Т- и В-системы иммунных клеток, осуществляется их кооперативное взаимодействие, появляется способность синтеза иммуноглобулинов разных классов и формы иммунного реагирования.

В зависимости от уровня эволюционного развития, особенностей и сложности сформировавшейся иммунной системы, способностей последней отвечать теми или иными реакциями на антигены, в иммунологии принято выделять отдельные виды иммунитета. Так, введено понятие о врожденном и приобретенном иммунитете (рис. 8.1).

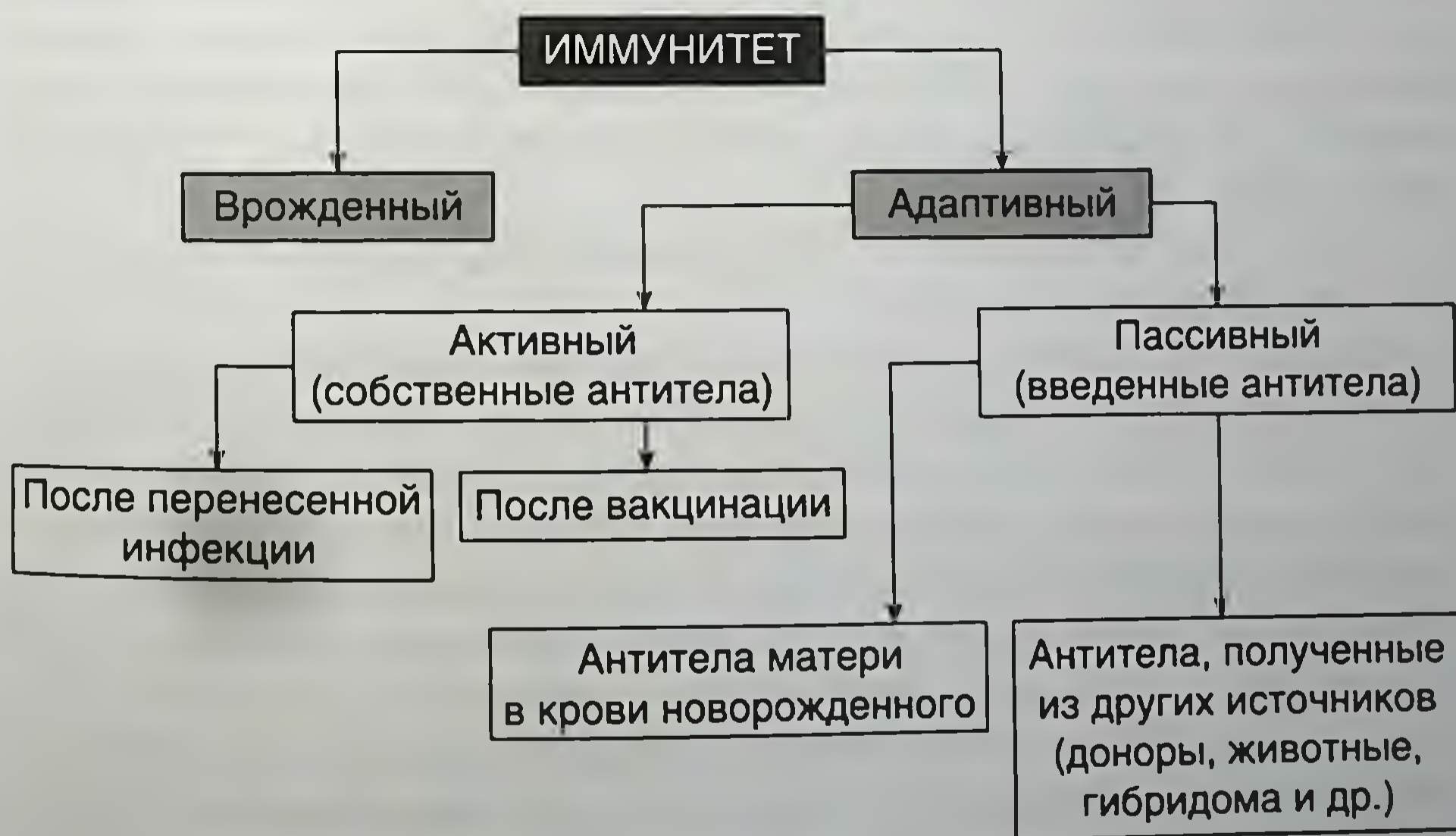


Рис. 8.1. Разновидности иммунитета

Врожденный (естественный, видовой) иммунитет — это выработанная в процессе филогенеза генетически закрепленная, передаваемая по наследству невосприимчивость особей данного вида к какому-либо чужеродному агенту. Примерами могут служить невосприимчивость человека к некоторым возбудителям, в том числе к особо опасным для сельскохозяйственных животных (чума крупного рогатого скота, болезнь Ньюкасла, поражающая птиц, оспа лошадей и др.), нечувствительность человека к бактериофагам, поражающим клетки бактерий. Объяснить видовой иммунитет можно с разных позиций: неспособностью чужеродного агента к адгезии на клетках и молекулах-мишенях, определяющих запуск патологического процесса и активацию иммунной системы, его быстрой деструкцией ферментами макроорганизма, отсутствием условий для колонизации макроорганизма.

Видовой иммунитет может быть абсолютным и относительным. Например, нечувствительные к столбнячному токсину лягушки реагируют на его введение при повышении температуры их тела. Лабораторные животные, не чувствительные к какому-либо чужеродному агенту, реагируют на него на фоне введения иммунодепрессантов или удаления центрального органа иммунитета — тимуса.

Приобретенный иммунитет — это невосприимчивость к чужеродному агенту чувствительного к нему организма человека, животных, приобретаемая в процессе индивидуального развития, то есть развития каждой особи в отдельности. Основой ее является иммунная защита, которая реализуется лишь при необходимости и в определенных условиях. Приобретенный иммунитет, точнее, его конечный результат сам по себе не наследуется.

В табл. 8.1 представлена сравнительная характеристика врожденного и адаптивного иммунитета.

Различают естественный и искусственный приобретенный иммунитет. Примером *естественного* приобретенного иммунитета у человека может служить невосприимчивость к инфекции, возникающая после перенесенного инфекционного заболевания (так называемый постинфекционный иммунитет), например после скарлатины. *Искусственный* приобретенный иммунитет создается преднамеренно для формирования невосприимчивости организма к определенному агенту путем введения специальных иммунобиологических препаратов, например вакцин, иммунных сывороток, иммунокомпетентных клеток (см. гл. 13).

Приобретенный иммунитет может быть активным и пассивным.

Таблица 8.1. Сравнительная характеристика видов иммунитета

	Иммунитет	
	врожденный	адаптивный
Время развития реакций	Мгновенно	Через несколько дней (в случае первичного ответа)
Основные свойства	Реакции цитолиза, бактериолиза и др. Обеспечение баланса с микробиоцинозом. Активация системы адаптивного иммунитета	Реакции по клеточному и гуморальному типу. Иммунологическая память
Специфичность (распознавание)	Степень специфичности меньше, чем у адаптивного, обеспечивается паттернраспознающими рецепторами. Распознавание PAMP-«образцов» — консервативных структур, характерных для целых групп микробов и др.	Высокоспецифические реакции, обеспечивается TCR, BCR. Распознавание отдельных антигенов
Гуморальные (секреторные) факторы	Белки системы комплемента, белки острой фазы, белки теплового шока, антимикробные пептиды, цитокины, в частности ИФН, неспецифические IgM и др.	Антитела, цитокины, участвующие в дифференцировке Т- и В-лимфоцитов
Клеточные факторы	Макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, тучные клетки, базофилы, естественные киллеры, дендритные клетки и др.	Лимфоциты (Т- и В-лимфоциты)

Активный иммунитет обусловлен непосредственным вовлечением системы иммунитета в процесс его формирования (например, поствакцинальный, постинфекционный иммунитет).

Пассивный иммунитет образуется за счет введения в организм уже готовых иммунореагентов, способных обеспечить необходимую защиту. К таким препаратам относятся антитела (препараты иммуноглобулинов и иммунные сыворотки) и лимфоциты. Пассивный иммунитет формируется у плода в эмбриональном периоде за счет проникновения материнских антител через плаценту, а в период грудного вскармливания — при поглощении ребенком антител, содержащихся в молоке (см. рис. 8.1).

Поскольку в формировании иммунитета принимают участие клетки иммунной системы и гуморальные факторы, принято иммунитет дифференцировать в зависимости от того, какой из компонентов иммунных реакций играет ведущую роль в формировании защиты от антигена. В связи с этим различают *гуморальный* и *клеточный* иммунитет. Примером клеточного иммунитета может служить противовирусный и противоопухолевый иммунитет, когда ведущую роль в иммунитете играют цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллеры. Иммунитет при токсинемических инфекциях (дифтерия) и интоксикациях (столбняк, ботулизм) обусловлен в основном антителами (антитоксинами), то есть ведущую роль играют гуморальные факторы.

В зависимости от направленности иммунитета, то есть природы чужеродного агента, выделяют *антитоксический, противовирусный, противогрибковый, антибактериальный, антипротозойный, трансплантационный, противоопухолевый* и другие виды иммунитета.

Иммунитет может поддерживаться, сохраняться либо при отсутствии или только в присутствии чужеродного агента в организме. В первом случае такой агент играет роль пускового фактора, а иммунитет называют «стерильный», во втором — «нестерильный». Примером стерильного иммунитета является поствакцинальный иммунитет при введении убитых вакцин, а нестерильного — иммунитет при туберкулезе, который поддерживается постоянным присутствием в организме микобактерий туберкулеза.

Иммунитет может быть *системным*, то есть генерализованным, распространяющимся на весь организм, и *местным*, при котором наблюдается более выраженная резистентность отдельных органов и тканей. Как правило, учитывая особенности анатомического строения и организации функционирования, понятие «местный иммунитет» используется для обозначения резистентности слизистых оболочек (мукозальный иммунитет) и кожных покровов.

8.2. ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Врожденный (видовой, генетический, конституциональный, естественный, неспецифический) иммунитет — это выработанная в процессе филогенеза, передаваемая по наследству, присущая всем особям одного вида устойчивость к инфекционным агентам (или антигенам).

Основной особенностью биологических факторов и механизмов, обеспечивающих такую устойчивость, является наличие в организме

готовых (преформированных) эффекторов, которые способны обеспечить деструкцию патогена быстро, без длительных подготовительных реакций. Они составляют первую линию защиты организма от внешней микробной или антигенной агрессии.

8.2.1. Факторы врожденного иммунитета

В случае когда входными воротами инфекции являются кожа и/или слизистые оболочки, патоген взаимодействует с целым спектром факторов иммунитета (табл. 8.2). Прежде всего, это гуморальные факторы врожденного иммунитета — неспецифические антитела, антимикробные пептиды, белки системы комплемента и др. Также в качестве барьера можно рассматривать бактерии нормофлоры, эпителиальные клетки и другие факторы (которые напрямую к иммунитету не относятся).

Если возбудитель имеет ряд факторов (к примеру, инвазивных), то он может проникнуть в субэпителиальную ткань, где развивается острая воспалительная реакция, ограничивающая возбудителя во входных воротах. Воспаление обеспечивается рядом клеточных (нейтрофилы, макрофаги и др.) и гуморальных факторов (провоспалительные цитокины) врожденного иммунитета.

Далее патоген может проникать в регионарные лимфатические узлы, куда он транспортируется лимфой по лимфатическим сосудам, дренирующим соединительную ткань. Лимфатические сосуды и узлы отвечают на внедрение развитием лимфангиита и лимфаденита. После преодоления этого барьера микробы по эфферентным лимфатическим сосудам проникают в кровь, где патоген может стать причиной сепсиса, а также распространяться по всему организму, попадая в разные органы и системы, вызывая генерализацию инфекционного процесса. Механизмы адаптивного иммунитета (при первичном проникновении) развиваются только через несколько суток/недель после попадания патогена в организм.

Кожа и слизистые оболочки. Слой эпителиальных клеток, выстилающий поверхность кожи и слизистых оболочек, является тем барьером, который практически непроницаем для микробов. Он отделяет стерильные ткани организма от заселенного микробами внешнего мира.

Кожа покрыта многослойным эпителием, в котором различают два слоя: роговой и базальный. Кератиноциты рогового слоя — это погибшие клетки, устойчивые к агрессивным химическим соединениям. На их поверхности отсутствуют рецепторы для адгезивных молекул микроорганизмов, поэтому они обладают значительной устойчивостью

Таблица 8.2. Факторы и механизмы антиинфекционного иммунитета (принцип эшелонированности антимикробной защиты по Маянскому А.Н., 2003)

Уровень действия	Механизмы
Эпителиальные покровы:	
кожа	<p>Механический барьер. Механическое самоочищение: шелушение. Химическое самоочищение: жирные кислоты (секрет сальных желез), молочная кислота, пот (NaCl), катионные пептиды. Нормальная микрофлора</p>
слизистые оболочки	<p>Механическое самоочищение: вымывание, мукоцилиарный транспорт, перистальтика, чиханье, кашель, отслойка поверхностных пластов эпителия. Антиадгезивные факторы: муцин и другие продукты секретов, секреторный IgA. Макрофаги, встроенные в эпителий (респираторный тракт), нейтрофилы, мигрирующие в слизистый биослой и подвергающиеся дегрануляции (респираторный тракт, влагалище и шейка матки)</p>
субэпителиальная ткань	<p>Резидентные факторы: клетки (нейтрофилы, макрофаги, тучные клетки, эозинофилы, естественные киллеры, лимфоциты; тканевая жидкость (см. факторы плазмы). Мобилизуемые факторы: воспалительная реакция, иммунный ответ</p>
Барьер лимфатических узлов	<p>Резидентные факторы: макрофаги, дендритные клетки лимфатических узлов, гуморальные факторы. Мобилизуемые факторы: воспалительная реакция, иммунный ответ</p>
Кровь	<p>Резидентные факторы: моноциты, нейтрофилы, макрофаги и дендритные клетки на пути тока крови. Гуморальные факторы: рецепторы к pattern-структурам микроорганизмов (коллектины, пентраксины, острофазовые белки), комплемент, лизоцим, липидные медиаторы, цитокины. Мобилизуемые факторы: системная воспалительная реакция, иммунный ответ</p>
Внутренние органы	см. Субэпителиальная ткань

к колонизации и являются самым надежным барьером на пути большинства бактерий, грибов, вирусов, простейших. Устье сальных и потовых желез, волосяных фолликулов в коже наиболее уязвимы, поскольку здесь

слой ороговевшего эпителия истончается. В защите этих участков важную роль играют продукты потовых и сальных желез, содержащих молочную, жирные кислоты, ферменты, антимикробные пептиды. Именно в устьях придатков кожи располагается глубокая резидентная микрофлора, образующая микроколонии и продуцирующая защитные факторы (см. гл. 4).

В эпидермисе, помимо кератиноцитов, содержатся еще два типа клеток — клетки Лангерганса и Гринштейна (отростчатые эпидермоциты, составляющие 1–3% кариоцитов базального слоя). Клетки Лангерганса и Гринштейна имеют миелоидное происхождение и относятся к дендритным. Предполагается, что по функции эти клетки являются оппозитными. Клетки Лангерганса участвуют в презентации антигена, индуцируют иммунный ответ, а клетки Гринштейна продуцируют цитокины, подавляющие иммунные реакции в коже. Типичные кератиноциты и дендритные клетки эпидермиса в совокупности с лимфоидными структурами дермы принимают активное участие в реакциях приобретенного иммунитета (см. ниже).

Здоровая кожа обладает высокой способностью к самоочищению. Это легко доказать, если нанести на ее поверхность патогенные бактерии — через некоторое время такие микробы исчезают. На этом принципе основаны методы оценки бактерицидной функции кожи.

Слизистые оболочки. Большинство инфекций проникает в организм через слизистые оболочки. Это связано, во-первых, с большей площадью их поверхности (слизистые оболочки около 400 м², кожа около 2 м²), во-вторых, с меньшей защищенностью.

Слизистые оболочки организма постоянно подвергаются воздействию патогенных и непатогенных (комменсалов) микроорганизмов. Факторы врожденного мукозального иммунитета поддерживают баланс между толерантностью к условно-патогенной микрофлоре и иммуногенностью к патогенным микробам. Для борьбы с потенциальными патогенами организмом используется лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками (MALT — *mucosa-associated lymphoid tissue* — лимфоидная ткань, ассоциированная со слизистыми оболочками). Слизистые оболочки можно разделить на два типа: первый тип характеризуется тем, что эпителий однослойный, присутствует MALT и нет клеток Лангерганса. Главный защитный механизм на слизистых оболочках I типа связан с IgA. Для второго типа характерны многослойный неороговевающий эпителий, наличие клеток Лангерганса и отсутствие MALT. Можно выделить главную функцию слизистой оболочки II типа — обеспечение физического барьера.

Среди лимфоидных образований слизистой оболочки выделяют:

- лимфоидную ткань, ассоциированную с желудочно-кишечным трактом — GALT (*gut-associated lymphoid tissue*);
- лимфоидную ткань, ассоциированную с бронхами, — BALT (*bronchus-associated lymphoid tissue*);
- лимфоидную ткань, ассоциированную с носом, — NALT (*nasal-associated lymphoid tissue*) и др.

Верхние отделы женского репродуктивного тракта (фаллопиевы трубы, матка) покрыты слизистыми оболочками I типа и предназначены для развития плода, тогда как нижние его отделы (цервикальный канал, влагалище) содержат слизистые оболочки II типа и участвуют в непосредственной защите от патогенов и в процессе родов.

На поверхности ряда слизистых оболочек располагается лишь один слой эпителиоцитов. В кишечнике это однослойный цилиндрический эпителий, бокаловидные секреторные клетки и М-клетки (мембранные эпителиальные клетки), располагающиеся в слое эпителиоцитов, покрывающие лимфоидные скопления. М-клетки наиболее уязвимы для проникновения многих патогенных микроорганизмов из-за целого ряда особенностей: наличия специфических рецепторов для некоторых микроорганизмов (сальмонелл, шигелл, патогенных эшерихий и др.), которые не обнаружены на соседних энтероцитах; истонченного слизистого слоя; способности к эндоцитозу и пипоцитозу, благодаря чему обеспечивается облегченный транспорт антигенов и микроорганизмов из кишечной трубки в мукозоассоциированную лимфоидную ткань (см. гл. 10); отсутствия мощного лизосомального аппарата, характерного для макрофагов и нейтрофилов, благодаря чему бактерии и вирусы перемещаются в субэпителиальное пространство без разрушения. М-клетки относятся к эволюционно сформировавшейся системе облегченного транспорта антигенов к иммунокомпетентным клеткам, а бактерии и вирусы используют этот путь для своей транслокации через эпителиальный барьер.

Аналогичные М-клеткам кишечника эпителиоциты, ассоциированные с лимфоидной тканью, имеются у слизистых оболочек бронхоальвеолярного дерева, носоглотки, половой системы.

Колонизационная резистентность покровного эпителия. Любой инфекционный процесс начинается с адгезии возбудителя на поверхности чувствительных эпителиоцитов (за исключением микроорганизмов, передаваемых через укусы насекомых или вертикально, то есть от матери к плоду). Только закрепившись, микробы приобретают возможность

размножиться во входных воротах и образовывать колонию. В колонии накапливаются токсины, ферменты патогенности в количестве, необходимом для преодоления эпителиального барьера. Этот процесс называется «колонизация». Под *колонизационной резистентностью* понимают устойчивость эпителия кожи и слизистых оболочек к заселению посторонними микроорганизмами. Колонизационную резистентность слизистых оболочек обеспечивает муцин, секретиремый бокаловидными клетками и образующий на поверхности сложноорганизованную биопленку. В этот биослой встроены все защитные инструменты: резидентная микрофлора, бактерицидные вещества (лизоцим, лактоферрин, токсичные метаболиты кислорода, азота и т.д.), секреторные иммуноглобулины, фагоциты. Роль нормальной микрофлоры в создании колонизационной резистентности описана в разделе 4.2.

Важнейшим механизмом участия резидентной микрофлоры в колонизационной резистентности является их способность продуцировать бактериоцины (антибиотикоподобные субстанции), короткоцепочечные жирные кислоты, молочную кислоту, сероводород, перекись водорода. Муцин, наряду с полисахаридами, продуцируемыми резидентными бактериями (в частности, лактобактериями), образует на поверхности слизистых оболочек выраженный гликоналикс (биопленку), который эффективно экранирует сайты адгезии и делает их недоступными для случайных бактерий. Бокаловидные клетки образуют смесь сиало- и сульфомуцинов, соотношение которых различается в разных биотонах. Своеобразие состава микрофлоры в различных экологических нишах в значительной степени определяется количеством и качеством муцина.

Колонизационная резистентность слизистых оболочек усиливается за счет секреторных IgA, синтезируемых мукозоассоциированной лимфоидной тканью. Покровный эпителий мукозального тракта постоянно регенерирует за счет стволовых клеток, расположенных в толще слизистых оболочек. В кишечнике эту функцию выполняют клетки крипт, в которых наряду со стволовыми располагаются клетки Панета — особые клетки, синтезирующие антимикробные пептиды (альфа-дефенсины 5 и 6). Эти белки защищают не только стволовые клетки, но и покровные эпителиоциты. При воспалении в стенке слизистой оболочки продукция этих белков усиливается. Колонизационная резистентность покровного эпителия обеспечивается всей совокупностью защитных механизмов врожденного и приобретенного (секреторные иммуноглобулины) иммунитета и является основой устойчивости орга-

низма к большинству микроорганизмов, обитающих во внешней среде. Отсутствие на эпителиоцитах специфических рецепторов для определенных микроорганизмов, по-видимому, считается базовым механизмом генетической резистентности животных одного вида к микробам, патогенным для животных другого вида.

8.2.2. Гуморальные факторы врожденного иммунитета

К гуморальным факторам врожденного иммунитета относится целый спектр молекул: белки системы комплемента, антимикробные пептиды (дефенсины, кателицидины), неспецифические IgM, белки острой фазы, белки теплового шока и многие другие. В данном разделе речь пойдет только о некоторых из них.

Система комплемента. Система комплемента — это многокомпонентная полиферментная самособирающаяся система сывороточных белков, которые в норме находятся в неактивном состоянии.

При появлении во внутренней среде микробных продуктов запускается процесс, который называют активацией комплемента (с образованием мембраноатакующего комплекса). Активация протекает по типу каскадной реакции, когда каждый предшествующий компонент системы активирует последующий. В процессе самосборки системы образуются активные продукты распада белков, которые выполняют три важнейшие функции: вызывают перфорацию мембран и лизис клеток, обеспечивают опсонизацию микроорганизмов для их дальнейшего фагоцитоза, инициируют развитие сосудистых реакций воспаления.

Комплемент под названием «алексин» был описан в 1899 г. французским микробиологом Ж. Борде, а затем немецким микробиологом П. Эрлихом, который назвал его «комплемент» (*complement* — дополнение) — как фактор, дополнительный к антителам, вызывающим лизис клеток. В систему комплемента входит 9 основных белков (обозначаемых как C1, C2–C9), а также субкомпоненты — продукты расщепления этих белков (C1q, C3b, C3a и т.д.), ингибиторы и рецепторы комплемента (CR1, CR2 и др.). Ключевым событием для системы комплемента является его активация. Она может происходить тремя путями: классическим, лектиновым и альтернативным (рис. 8.2).

- Классический путь. При классическом пути активирующим фактором являются комплексы антиген–антитело. При этом Fc-фрагмент и IgG иммунных комплексов активируют C1-компонент, который расщепляется с образованием $C1s$, гидролизую-

комплемента также сопровождается образованием двухактивных фрагментов белков: C5a — анафилоксина, хемоаттрактанта для нейтрофилов и C5b — активирующего C6-компонент. В итоге образуется комплекс C5 в C6—C7—C8—C9, который называется «мембраноатакующий». Терминальная фаза активации комплемента — это образование трансмембранной поры в клетке, выход ее содержимого наружу. В итоге клетка набухает и лизируется.

- Лектиновый путь. Он во многом аналогичен классическому. Различие заключается лишь в том, что при лектиновом пути один из белков острой фазы — связывающий маннозулектин взаимодействует с маннозой на поверхности микробных клеток (прообраз комплекса антиген—антитело), и этот комплекс активирует C4 и C2.
- Альтернативный путь. Он идет без участия антител и минуя первые 3 компонента C1—C4—C2. Иницируют альтернативный путь компоненты клеточной стенки грамотрицательных бактерий (ЛПС, пептидогликаны), вирусы, которые связываются последовательно с белками P (пропердин), B и D. Эти комплексы напрямую конвертируют C3-компонент. Сложная каскадная реакция комплемента протекает только в присутствии ионов Ca и Mg.

Биологические эффекты продуктов активации комплемента: вне зависимости от пути активация комплемента завершается образованием мембраноатакующего комплекса и лизисом клеток (бактерий, эритроцитов и других клеток); образующиеся C3a-, C4a- и C5a-компоненты являются анафилотоксинами, они связываются с рецепторами кровяных и тканевых базофилов, индуцируют их дегрануляцию — выброс гистамина, серотонина и других вазоактивных медиаторов (медиаторов воспалительного ответа). Кроме этого, C5a является хемоаттрактантом для фагоцитов, он привлекает эти клетки в очаг воспаления; C3b, C4b являются опсонинами, повышают адгезию иммунных комплексов с мембранами макрофагов, нейтрофилов, эритроцитов и тем самым усиливают фагоцитоз.

Растворимые рецепторы для патогенов. Это белки крови, непосредственно связывающиеся с различными консервативными, повторяющимися углеводными или липидными структурами микробной клетки (*pattern*-структурами). Эти белки могут выступать в качестве опсонов, некоторые из них активируют комплемент. Основную часть растворимых рецепторов составляют белки острой фазы. Концентрация этих белков в крови быстро нарастает в ответ на развитие воспаления при инфекции или повреждении тканей.

К белкам острой фазы относятся:

- С-реактивный белок (он составляет основную массу белков острой фазы), получивший название вследствие способности связываться с фосфорилхолином (С-полисахаридом) пневмококков. Образование комплекса «С-реактивный белок — фосфорилхолин» способствует фагоцитозу бактерий, поскольку комплекс связывается с С1g и активирует классический путь комплемента. Белок синтезируется в печени, и его концентрация быстро нарастает в ответ на ИЛ-6;
- сывороточный амилоид Р близок по структуре и функции к С-реактивному белку;
- маннозосвязывающий лектин активирует комплемент по лектиновому пути, является одним из представителей сывороточных белков-коллектинов, распознающих углеводные остатки и действующих как опсоины;
- белки сурфактанта легких также принадлежат к семейству коллектинов. Обладают опсоническим свойством, особенно в отношении одноклеточного гриба *Pneumocystis carinii*;
- другую группу белков острой фазы составляют белки, связывающие железо, — трансферрин, гаптоглобин, гемопексин и др. Такие белки препятствуют размножению бактерий, нуждающихся в этом элементе.

Существует ряд белков, которые можно объединить относительно их антимикробного действия. Одним из таких белков является лизоцим — это фермент мурамидаза с молекулярной массой 14 000—16 000 кДа, вызывающий гидролиз муреина (пептидогликана) клеточной стенки бактерий и их лизис. Открыт данный белок в 1909 г. П.Л. Лашенковым, выделен — в 1922 г. А. Флемингом. Известно, что лизоцим содержится во всех биологических жидкостях: сыворотке крови, слюне, слезе, молоке. Он продуцируется нейтрофилами и макрофагами (содержится в их гранулах). Лизоцим в большей степени действует на грамположительные бактерии, основу клеточной стенки которых составляет пептидогликан. Клеточные стенки грамотрицательных бактерий также могут повреждаться лизоцимом, если на них предварительно подействовал мембраноатакующий комплекс системы комплемента.

Антимикробные пептиды. В середине 1980-х годов профессорами R. Lehrer и В.Н. Кокряковым были открыты антимикробные пептиды, которые можно определить как эффекторные молекулы врожденного иммунитета, обладающие прямым противомикробным действием

относительно вирусов, бактерий, грибов, простейших и др. Известно, что данная группа пептидов объединена не только по принципу их действия, антимикробные пептиды также имеют небольшую молекулярную массу (от 2 до 10 кДа) и положительный заряд. Также антимикробные пептиды являются сигнальными молекулами, задействованными в процессах репарации и активации клеток иммунной системы. По литературе известно около тысячи представителей антимикробных пептидов, которые секретируются клетками различных организмов: рептилий, амфибий, насекомых, млекопитающих и др. У человека хорошо охарактеризовано два семейства: дефензины и кателицидины.

Дефензины. Особенность первичной структуры дефенсинов — наличие шести остатков цистеина, участвующих в образовании трех внутримолекулярных дисульфидных мостиков, делающих их устойчивыми к действию протеиназ и стабилизирующих вторичную структуру пептидной молекулы.

У человека определены α - и β -дефензины. Известно, что α -дефензины (HNP — *human neutrophil protein*) продуцируются в основном нейтрофилами и «выбрасываются» в окружающую среду путем дегрануляции нейтрофилов. При стимуляции HNP1–4 могут вырабатываться моноцитами и Т-лимфоцитами. HD-5 и HD-6 вырабатываются клетками Панета в криптах кишечника и участвуют в защите слизистых оболочек от энтеробактерий и энтеровирусов. β -Дефензины (HBD — *human β -defensin*) в основном продуцируются клетками эпителия. Причем некоторые дефензины могут вырабатываться на постоянном уровне (HBD-1) — конститутивно, а другие — только после действия какого-то патогена — индуцибельно.

Другое семейство катионных противомикробных пептидов — кателицидины — состоят из консервативного N-концевого сигнального пептида и варибельного C-концевого противомикробного домена. Основные свойства C-концевого домена следующие: противомикробный эффект, способность нейтрализовать ЛПС бактерий, активировать хемотаксис фагоцитов и других клеток. У человека наиболее распространен кателицидин LL-37, который продуцируется нейтрофилами, эпителиальными клетками, кератиноцитами, моноцитами и др.

Антимикробные пептиды являются одними из основных компонентов защиты слизистых оболочек и кожи от патогенных микроорганизмов. Механизм действия антимикробных пептидов основан на различиях между микробной клеткой и клетками млекопитающих. В состав

мембран эукариот могут входить холестерин и другие компоненты, не несущие на себе электростатического заряда. У прокариот можно обнаружить в большом количестве отрицательно заряженные гидроксигликованные фосфолипиды. Так, трансмембранный потенциал клеток млекопитающих составляет от -90 до -110 мВ, у бактериальных клеток он находится в пределах от -130 до -150 мВ. Соответственно, антимикробные пептиды, которые по природе своей несут положительный заряд, будут связываться с мембранами бактерий и нарушать их целостность. Известны и другие пути действия антимикробных пептидов на бактериальные и вирусинфицированные клетки.

Среди гуморальных факторов иммунитета, в частности врожденного, центральное место занимают *цитокины*. Известно, что цитокины — это гликозилированные полипептиды с молекулярной массой порядка 25 кД, которые являются универсальными регуляторами. Они участвуют в регуляции дифференцировки, пролиферации, функциональной активации, апоптоза и других процессов. Цитокины могут вырабатываться широким спектром клеток: лимфоцитами, клетками макрофагально-моноцитарного звена, клетками, которые не относятся к иммунной системе (клетки эпителия, эндотелия и др.). Цитокины можно классифицировать на провоспалительные (ИЛ-1, 6, 8, ФНО- α) и противовоспалительные [ИЛ-4, -10, трансформирующий фактор роста (ТФР) β].

Ниже представлена классификация цитокинов по их функциональной активности (табл. 8.3).

Цитокины могут действовать на разные мишени: на клетку, которая их же и продуцировала, — аутокринное действие; на соседнюю клетку — паракринное действие; на клетку, которая располагается относительно далеко (необходим транспорт цитокина через кровь), — эндокринное действие. Цитокины между собой могут работать по принципу сети. Взаимодействие между цитокинами может происходить по следующим вариантам: агонизм — цитокины вызывают одинаковый эффект; антагонизм — действие цитокинов направлено на ингибирование действия других цитокинов; каскадность — цитокины активируют продукцию других цитокинов. Цитокины взаимодействуют с клеткой через специальные рецепторы. Среди цитокиновых рецепторов существуют различные семейства, которые отличаются не только по цитокину, но и по строению. Цитокины являются универсальными регуляторами и принимают участие во многих иммунных процессах, о которых речь пойдет в последующих разделах.

Таблица 8.3. Классификация цитокинов, основанная на функциональных свойствах

Группа цитокинов	Клетки-продуценты	Клетки-мишени/функция
Интерлейкины (ИЛ-1–37)	Дендритные клетки, макрофаги, естественные киллеры, Т-, В-клетки и др.	Регулируют межклеточное взаимодействие дендритных клеток, макрофагов, Т-, В-клеток и др.
Интерфероны (ИФН) I тип ИФН- α , ИФН- β	Плазмацитоидные дендритные клетки, макрофаги и др. Фибробласты	Противовирусный иммунитет
II тип ИФН- γ	Th1, T γ δ , NKT, естественные киллеры и др.	Регуляция иммунитета
III тип ИФН- λ	Т-, В-клетки, естественные киллеры, фибробласты, эпителиальные клетки и др.	Противовирусный иммунитет и иммуномодуляция
Провоспалительные цитокины ФНО- α , ИЛ-1, -6	Макрофаги, тучные, лимфоидные клетки и др.	Участвуют в развитии воспалительных реакций
ИЛ-17	Т-клетки памяти, Th17, естественные киллеры, Th1	
Противовоспалительные цитокины ИЛ-10, ТФР- β	Treg, Breg	Иммуносупрессия, ингибирование воспалительных реакций
Факторы роста Г-КСФ ГМ-КСФ	Фибробласты, макрофаги. Фибробласты, макрофаги	Регулируют пролиферацию и дифференцировку гранулоцитов, моноцитов, дендритных клеток и др.
Хемокины CL, CCL, CXCL и др.	Нейтрофилы, моноциты, естественные киллеры, дендритные, Т-, В-клетки, базофилы и др.	Обеспечивают направленное движение клеток

Примечание. NKT — естественные киллеры Т-лимфоциты; Г-КСФ — гранулоцит-колониестимулирующий фактор; ГМ-КСФ — гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор.

Особое место в противовирусном врожденном иммунитете занимают *интерфероны*. ИФН был открыт в 1957 г. А. Айзексом и Ж. Линдеманом при изучении интерференции вирусов (от лат. *inter* — между, *ferens* — несущий).

Интерференция — это явление, когда ткани, инфицированные одним вирусом, становятся устойчивыми к заражению другим вирусом. Было установлено, что такая резистентность связана с продукцией зараженными клетками особого белка, который и был назван интерфероном. В настоящее время ИФН хорошо изучены. В зависимости от источника получения эти белки делят на ИФН I и II типа.

Первый тип включает ИФН- α и - β , которые продуцируются инфицированными вирусом клетками: ИФН- α — лейкоцитами, ИФН- β — фибробластами. В последние годы описаны три новых ИФН:

- 1) ИФН- τ/ϵ (трофобластный ИФН);
- 2) ИФН- λ ;
- 3) ИФН-К.

В противовирусной защите участвуют ИФН- α и - β .

Механизм действия ИФН- α не связан с прямым влиянием на вирусы. Он обусловлен активацией в клетке ряда генов, блокирующих репродукцию вируса. Ключевое звено — индукция синтеза протеинкиназы R, которая нарушает трансляцию вирусной мРНК и запускает апоптоз зараженных клеток через Bcl-2 и каспазазависимые реакции. Другой механизм — это активация латентной РНК-эндонуклеазы, которая вызывает деструкцию вирусной нуклеиновой кислоты.

Второй тип включает ИФН- γ . Он продуцируется Т-лимфоцитами и естественными киллерами после антигенной стимуляции. ИФН синтезируется клетками постоянно, его концентрация в крови в норме мало меняется. Однако продукция ИФН усиливается при заражении клеток вирусами или действии его индукторов — интерферогенов (вирусной РНК, ДНК, сложных полимеров).

В настоящее время интерфероны (как лейкоцитарные, так и рекомбинантные) и интерферогены широко применяются в клинической практике для профилактики и лечения острых вирусных инфекций (грипп), а также в терапевтических целях при хронических вирусных инфекциях (гепатиты В, С, герпес, рассеянный склероз и др.). Поскольку ИФН обладают не только противовирусной, но и противоопухолевой активностью, они применяются также для лечения онкологических заболеваний.

8.2.3. Рецепторы врожденного иммунитета

В реакциях врожденного иммунитета, помимо гуморальных факторов, значительную роль играют и клеточные. Известно, что на клетках врожденного иммунитета присутствует широкий спектр рецепторов. Основными распознающими структурами врожденного иммунитета являются паттернраспознающие рецепторы, которые можно объединить в следующие группы.

- *Маннозный рецептор* — наиболее изученный лектиновый рецептор, который экспрессируется на поверхности мононуклеарных фагоцитов и распознает углеводные компоненты поверхностных структур микроорганизмов. Рецептор содержит лектиновые домены, связывающие углеводы (в состав которых входит манноза). Эндогенными лигандами для маннозного рецептора являются богатые маннозой структуры (экспрессируются микроорганизмами), а также лизосомные гидролазы и миелопероксидазы.
- *Рецепторы-«мусорщики» (Scavenger-рецепторы)* — группа рецепторов на макрофагах, способных распознавать продукты клеточной деградации (продукты сиаловых кислот) и участвующих в фагоцитозе погибших клеток и некоторых патогенов. Основная функция рецепторов состоит в распознавании модифицированных молекул и апоптозных телец, после чего эти компоненты элиминируются из организма.
- *RIG-I-подобные рецепторы (RLRs — retinoic acid inducible gene I-like receptors)* локализуются в цитоплазме клеток. Лигандами данных рецепторов являются двухцепочечные РНК вирусов. Следствием активации RLRs является выработка ИФН I типа, ИЛ-6 и ФНО- α и др.
- *NOD-подобные рецепторы (NLRs — nucleotide-binding oligomer-like receptor)* — NOD1 и NOD2 относятся к паттернраспознающим рецепторам, которые находятся в цитоплазме. NOD1 распознает диаминопимелатсодержащий мурамилтрипептид, а NOD2 — глюкозаминилмурамилдипептид. Связывание NLR с лигандами приводит к активации каспазы 1 или транскрипционного фактора NF- κ B, в результате чего наблюдается продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов.
- *Toll-подобные рецепторы (TLRs — toll-like receptors)*. Впервые ген *toll* был определен у *Drosophilamelanogaster*. В 1992 г. было обнаружено, что белок, кодируемый этим геном, является трансмембранным рецептором, который участвует в эмбриональном развитии дрозо-

филы, а именно регулирует дорзовентральную полярность насекомого. Позже было замечено, что дрозофилы, мутантные по этому рецептору, гибнут от грибковой инфекции. Впоследствии ученые установили, что активация toll-рецептора приводит к экспрессии белков, участвующих в защите от грибов и бактерий. В конце 1990-х годов аналог toll-рецептора был обнаружен у человека. Среди TLRs выделяют поверхностные (TLR 1, 2, 4, 6 и др.) и эндосомальные (TLR 3, 7, 8, 9) рецепторы. Toll-подобные рецепторы узнают не антигены, а *pattern*-структуры (от англ. *pattern* — узор), которых нет на клетках организма хозяина, но которые присутствуют у простейших, грибов, бактерий, вирусов.

TLR — это трансмембранные белки с внеклеточным фрагментом, представленным повторяющимися последовательностями с высоким содержанием лейцина. Рецепторы состоят из двух доменов: внешний домен содержит варьирующее число лейцин-богатых повторяющихся мотивов, которые, как предполагается, обеспечивают прямое взаимодействие рецептора с лигандами микроорганизмов или их продуктов; внутренний домен TLRs сходен с цитоплазматическим доменом рецептора ИЛ-1, участвует в трансдукции сигнала от активированного TLR внутрь клетки.

В настоящее время у человека открыто 10 toll-подобных рецепторов. Каждый рецептор различается по специфичности к разным лигандам. Отдельные TLR отвечают на ограниченное число лигандов, тогда как все семейство TLR может отвечать на широкий спектр протеинов бактерий, вирусов, грибов и паразитов (табл. 8.4).

Следует отметить, что лигандами эндосомальных рецепторов (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) в основном являются нуклеиновые кислоты, характерные для патогенов (двухцепочечная ДНК вирусов, одноцепочечная РНК, неметирированные CpG-повторы ДНК бактерий и вирусов).

TLR распознают не только структуры микробных клеток и вирионов, но и эндогенные молекулы, вырабатываемые при повреждениях ткани и травмах. TLR4 может быть активирован фибронектином, который несет дополнительный домен А. Белки теплового шока 70 и 60 (Hsp70 и Hsp60) увеличивают продукцию провоспалительных цитокинов при действии на TLR4 и TLR2. Биологический смысл активации механизмов врожденного иммунитета эндогенными молекулами до конца не выяснен. Логично предположить, что подобный механизм обеспечивает выведение из организма модифицированных молекул и поддержание антигенного гомеостаза организма.

Таблица 8.4. Toll-подобные рецепторы и некоторые их лиганды

TLRs	Лиганд
TLR1	Триацилированные липопептиды (бактерии, микобактерии), растворимые факторы (<i>Neisseria meningitides</i>)
TLR2	Липопротеины/липопептиды (различных патогенов), пептидогликан (грамположительные бактерии), липотейхоевые кислоты (грамположительные бактерии), липоарабиноманнан (микобактерии), гликолипиды (<i>Treponema maltophilum</i>), порины (<i>Neisseria</i>), зимозан (грибы), ЛПС (<i>Leptospira interrogans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>), ЛПС (<i>Chlamydia trachomatis</i>), белок теплового шока HSP70 (эндогенный), вирусные белки (цитомегаловирус)
TLR3	Двухцепочечная РНК (вирусы)
TLR4	ЛПС (грамотрицательные бактерии), Env-белок оболочки вируса ММТВ, F протеин вируса RSV, домен А фибронектина (эндогенный), фибриноген (эндогенный), олигосахариды гиалуроновой кислоты (эндогенные), полисахаридные фрагменты гепарансульфата (эндогенные), таксол (растения), белок теплового шока HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>), белок теплового шока HSP60 (эндогенный), белок теплового шока HSP70 (эндогенный)
TLR5	Флагеллин (бактерии)
TLR6	Диацилированные липопептиды (микоплазмы)
TLR7	Имидазокунолин (синтетический), локсорибин (синтетический), бропиримин (синтетический), одноцепочечная РНК (грипп, ВИЧ, VSV)
TLR8	Одноцепочечная РНК
TLR9	Неметилированные CpG-повторы ДНК бактерий и вирусов
TLR10	Лиганд не найден

Активация toll-подобных рецепторов приводит к запуску сигнальных каскадов, завершающихся активацией транскрипционных факторов (NF-κB, AP-1, IRF и др.) (рис. 8.3). Общим для всех TLR адаптором является белок MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*). В настоящее время существует огромное количество вариантов путей трансдукции сигнала с TLRs. Рассмотрим два основных: MyD88-зависимый и MyD88-независимый. MyD88-зависимый путь приводит к продукции ФНО-α, ИЛ-1, -6 и -8, а также противомикробных пептидов, а MyD88-независимый — к активации транскрипционного фактора IRF-3/7 (*IFN regulatory factor*) и экспрессии ИФН I типа (ИФН-α и -β).

TLRs экспрессируются практически на всех клетках врожденного иммунитета, а также на других клетках (эпителиальных и др.). Уровень

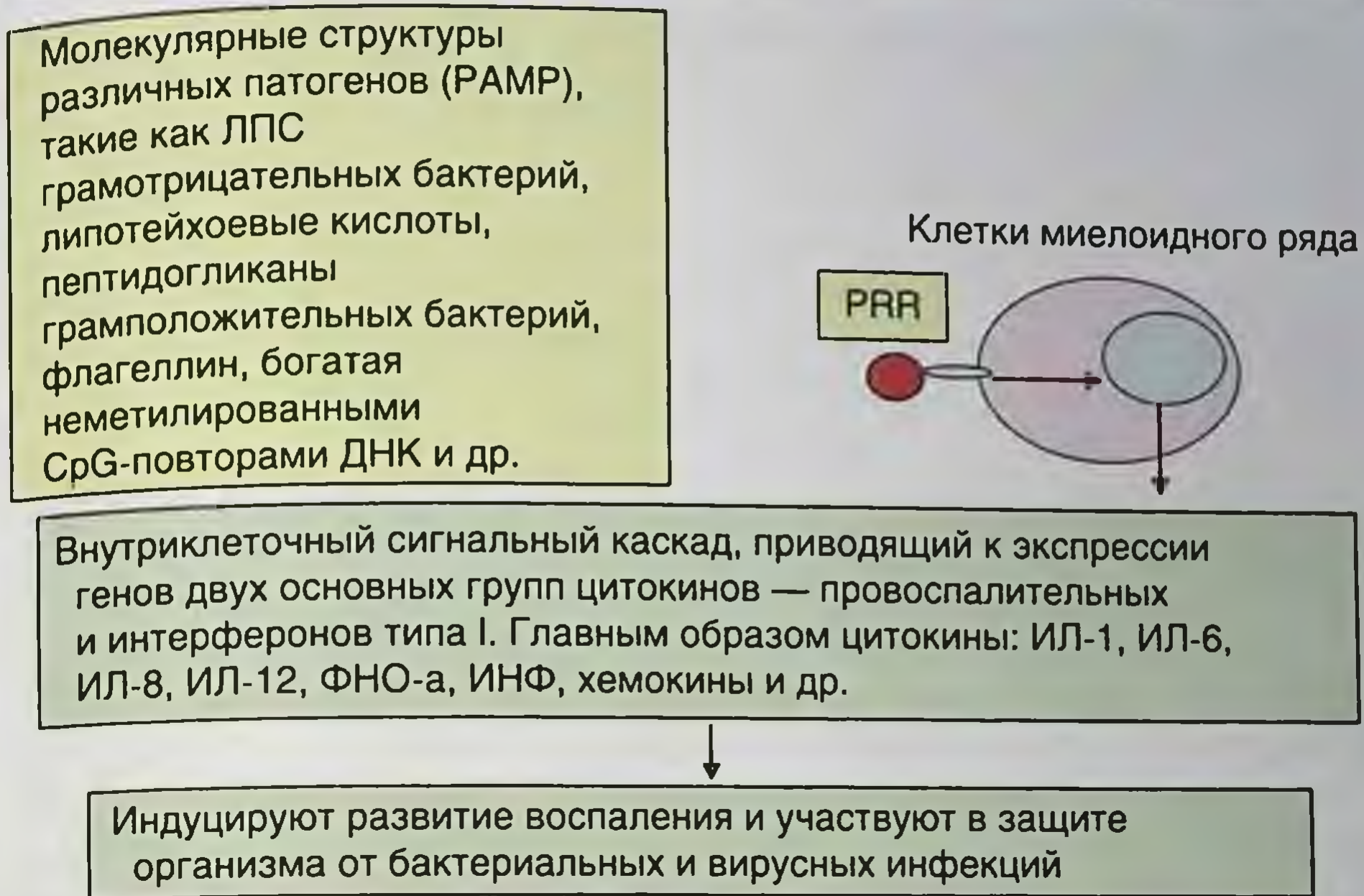


Рис. 8.3. Активация toll-подобных рецепторов; РАМР — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; PRR — паттерн-распознающие рецепторы

экспрессии TLRs может изменяться под действием различных факторов, таких как цитокины, в ответ на микробную инвазию и другие факторы. Так, *Mycobacterium avium* вызывает увеличение экспрессии мРНК TLR2 и снижение экспрессии мРНК TLR4 макрофагами. Под действием *H. influenzae* происходят TLR2-опосредованная активация NF-κB и повышение экспрессии TLR2 на поверхности эпителиальных клеток. Вирусная инфекция приводит к увеличению уровня экспрессии TLR1–3 и TLR7 в макрофагах. При этом экспрессия TLRs снижается при обработке клеток анти-ИФН-α/-β антителами, что указывает на участие ИФН I типа в регуляции экспрессии TLRs. Показано, что под действием ЛПС происходит увеличение экспрессии TLR2 на поверхности макрофагов.

8.2.4. Клетки врожденного иммунитета

В механизмах врожденного иммунитета участвуют следующие клетки: макрофаги, нейтрофилы, естественные киллеры, дендритные клетки, базофилы, В1-лимфоциты и др., а также вспомогательные клетки врожденного иммунитета, которые не являются иммунными, но участвуют в реакциях — клетки эпителия, эндотелия и др.

Нейтрофилы и макрофаги. В процессе эволюции в организме многоклеточных сформировались специализированные клетки, основной функцией которых является фагоцитоз (от греч. *phagos* — пожираю, *cytos* — клетка) — поглощение частиц диаметром не менее 0,1 мкм (в отличие от пиноцитоза — поглощения частиц меньшего диаметра и макромолекул) и уничтожение захваченных микробов. Такими свойствами обладают полиморфноядерные лейкоциты (в основном нейтрофилы) и мононуклеарные фагоциты/макрофаги (эти клетки иногда называют профессиональными фагоцитами).

Впервые идея о защитной роли подвижных клеток (микро- и макрофагов) была сформулирована в 1883 г. И.И. Мечниковым, который за создание клеточно-гуморальной теории иммунитета (в соавторстве с П. Эрлихом) был удостоен в 1909 г. Нобелевской премии. Нейтрофилы и макрофаги имеют общее миелоидное происхождение из стволовой кроветворной клетки. Однако эти клетки различаются рядом свойств.

Нейтрофилы (полиморфноядерные лейкоциты) — наиболее многочисленная (60–75% общего количества лейкоцитов) и подвижная популяция фагоцитов, дифференцировка которых проходит в костном мозге. Нейтрофилы — короткоживущие клетки, продолжительность их жизни около 15 сут. Из костного мозга они выходят в кровоток уже зрелыми клетками, утратившими способность к дифференцированию и пролиферации. Из крови нейтрофилы перемещаются в ткани, в которых они либо гибнут, либо выходят на поверхность слизистых оболочек, где и заканчивают свой жизненный цикл. Нейтрофилы осуществляют свою киллерную функцию посредством двух основных механизмов: внеклеточный киллинг (или внешний цитолиз) с участием контактных взаимодействий и секретируемых из гранул эффекторных молекул («респираторный взрыв») и фагоцитоз. В гранулах нейтрофилов содержатся эффекторные молекулы:

- первичные гранулы (азурофильные) содержат миелопероксидазу, нейтральные протеазы, лизоцим и др.;
- вторичные гранулы (специфические) содержат лактоферрин, лизоцим, фосфолипазу А₂, кателицидин, липокартин, белок NGAL, белок, повышающий проницаемость бактерий;
- третичные гранулы (желатиновые);
- секреторные везикулы.

Также есть везикулы, которые содержат противомикробные пептиды — дефензины. Транспорт нейтрофилов и других клеток врожденного иммунитета осуществляется путем «роллинга» (рис. 8.4).

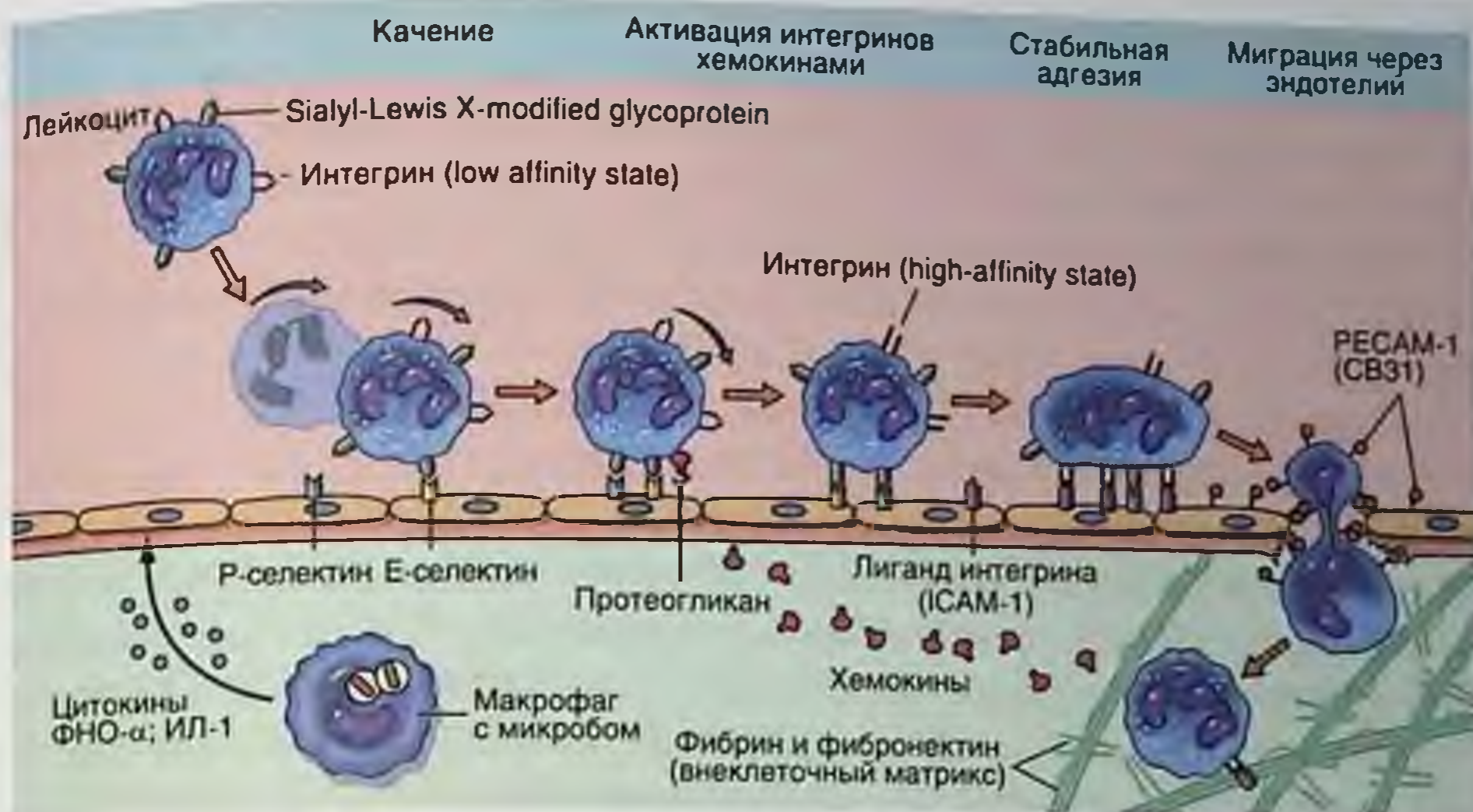


Рис. 8.4. «Роллинг» лейкоцита (нейтрофила и др.) в область воспаления

Мононуклеарные фагоциты представлены промоноцитами костного мозга, моноцитами крови и тканевыми макрофагами. Моноциты, в отличие от нейтрофилов, — незрелые клетки, которые, попадая в кровяное русло и далее в ткани, созревают в тканевые макрофаги (плевральные и перитонеальные, купферовские клетки печени, альвеолярные, интердигитальные клетки лимфатических узлов, костного мозга, остеокласты, микроглиоциты, мезангиальные клетки почек, сертолиевы клетки яичек, клетки Лангерганса и Гринштейна кожи). Продолжительность жизни мононуклеарных фагоцитов от 40 до 60 сут. Макрофаги функционируют во всех тканях и, в отличие от нейтрофилов, имеют необходимость в столь срочной мобилизации. Важной особенностью нейтрофилов и макрофагов является наличие в их цитоплазме большого количества лизосом — гранул размером 200–500 нм, содержащих различные ферменты, бактерицидные и биологически активные продукты (лизоцим, миелопероксидаза, дефензины, бактерицидный протеин, лактоферрин, протеиназы, катепсины, коллагеназа и т.д.). Благодаря столь разнообразному «вооружению» фагоциты обладают мощным деструктивным и регуляторным потенциалом.

Наряду с фагоцитозом эти клетки выделяют наружу продукты, содержащиеся в их лизосомах (лизоцим, пероксидаза, лактоферрин, дефензины, токсичные метаболиты кислорода, азота), которые повышают антимикробные свойства секретов. В основном макрофаги

(в меньшей степени нейтрофилы) оснащены богатым арсеналом рецепторов, располагающихся на их цитоплазматической мембране:

- рецепторы врожденного иммунитета — toll-подобные рецепторы (*Toll-like receptor* — TLR), маннозные рецепторы;
- рецепторы-«мусорщики» (*scavenger receptor*) и др.

Макрофаги также участвуют в фагоцитозе поврежденных и умирающих клеток:

- рецепторы для С3в- и С4в-компонентов комплемента;
- рецепторы для Fc-фрагментов IgG. Эти рецепторы, как и рецепторы для компонентов комплемента, играют важную роль в связывании иммунных комплексов и фагоцитозе бактерии, помеченных иммуноглобулинами и комплементом (эффект опсонизации);
- рецепторы для цитокинов, хемокинов, гормонов, лейкотриенов, простагландинов и т.д. позволяют взаимодействовать с лимфоцитами и реагировать на любые изменения внутренней среды организма.

Основной функцией нейтрофилов и макрофагов является фагоцитоз.

Фагоцитоз — это процесс поглощения клеткой частиц или крупных макромолекулярных комплексов. Он складывается из нескольких последовательно протекающих этапов:

- 1) активация и хемотаксис — целенаправленное движение клетки к объекту фагоцитоза в сторону повышающейся концентрации хемоаттрактантов, роль которых играют хемокины, компоненты комплемента и микробной клетки, продукты деградации тканей организма;
- 2) адгезия (прикрепление) частиц к поверхности фагоцита. В адгезии важную роль играют toll-подобные рецепторы, а также рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулина и С3в-компоненту комплемента (такой фагоцитоз называется «иммунный»). IgM, G, С3в-, С4в-компоненты комплемента усиливают адгезию (являются опсонинами), служат мостиком между микробной клеткой и фагоцитом;
- 3) поглощение частиц, их погружение в цитоплазму и образование вакуоли (фагосомы);
- 4) внутриклеточный киллинг (убийство) и переваривание. После поглощения частицы фагосомы сливаются с лизосомами — образуется фаголизосома, в которой бактерии гибнут под действием бактерицидных продуктов гранул (кислороднезависимая

система бактерицидности). Одновременно в клетке усиливается потребление кислорода и глюкозы — развивается так называемый *респираторный* (окислительный) *взрыв*, что приводит к образованию токсичных метаболитов кислорода и азота (H_2O_2 , супероксиданиона O_2^- , гипохлорной кислоты, пироксинитрита), обладающих высокой бактерицидностью (кислородзависимая система бактерицидности). Не все микроорганизмы чувствительны к бактерицидным системам фагоцитов. Гонококки, стрептококки, микобактерии и другие выживают после контакта с фагоцитами, такой фагоцитоз называется «незавершенный».

Фагоциты, помимо фагоцитоза, могут осуществлять свои цитотоксические реакции путем экзоцитоза — выделения своих гранул наружу (дегрануляция), таким образом фагоциты осуществляют внеклеточный киллинг. Нейтрофилы, в отличие от макрофагов, способны образовывать внеклеточные бактерицидные ловушки — в процессе активации клетка выбрасывает наружу нити ДНК, в которых располагаются гранулы с бактерицидными ферментами. Благодаря липкости ДНК бактерии приклеиваются к ловушкам и под действием фермента погибают. Нейтрофилы и макрофаги являются важнейшим звеном врожденного иммунитета, однако их роль в защите от различных микробов неодинакова. Нейтрофилы эффективны при инфекциях, вызванных внеклеточными патогенами (гноеродные кокки, энтеробактерии и др.), индуцирующими развитие острого воспалительного ответа. При таких инфекциях эффективна кооперация нейтрофил—комплемент—антитело. Макрофаги защищают от внутриклеточных патогенов (микобактерии, риккетсии, хламидии и др.), вызывающих развитие хронического гранулематозного воспаления, где главную роль играет кооперация макрофаг — Т-лимфоцит.

Помимо участия в антимикробной защите, фагоциты участвуют в удалении из организма отмирающих, старых клеток и продуктов их распада, неорганических частиц (уголь, минеральная пыль и др.). Фагоциты (особенно макрофаги) являются антигенпредставляющими, они обладают секреторной функцией, синтезируют и выделяют наружу широкий спектр биологически активных соединений: цитокины (ИЛ-1, -6, -8, -12, фактор некроза опухоли), простагландины, лейкотриены, ИФН- α и - γ . Благодаря этим медиаторам фагоциты активно участвуют в поддержании гомеостаза, в процессах воспаления, в адаптивном иммунном ответе, регенерации.

В организме выделяют два варианта макрофагов: М1- и М2-клетки, которые находятся в состоянии баланса. Реакции воспаления, выработка

эффекторных молекул и другие функции, которые были рассмотрены выше, связаны в основном с М1-макрофагами. Известна также альтернативная активация макрофагов (М2), которые участвуют в реакциях супрессии (угнетения) иммунных механизмов через выработку противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ТФР- β) и других факторов. Иммуносупрессия характерна для М2-клеток. Таким образом, в организме в норме существует некоторый баланс М1- и М2-клеток (рис. 8.5). При гиперактивации М1 или М2 происходит смещение баланса в сторону гипервоспаления или иммуносупрессии соответственно.

Естественные киллеры. Естественные киллеры — большие лимфоцитоподобные клетки, которые происходят из лимфоидных предшественников. Естественные киллеры имеют следующие маркеры на поверхности: $CD16^+$, $CD56^+$, $CD94^+$. Естественные клетки определяются в крови и составляют 10–12% общего числа лимфоцитов. Естественные киллеры относятся к клеткам врожденного иммунитета, которые специализируются на уничтожении вирус-инфицированных клеток, опухолевых клеток, а также клеток с внутриклеточными паразитами. Данные клетки называются «естественными», поскольку они не нуждаются в дополнительной стимуляции для распознавания и активации. Естественные киллеры относятся к большим гранулярным лимфоцитам, которые развиваются из лимфоидного предшественника. Они не экспрессируют на поверхности маркеров, характерных для Т-клеток (Т-клеточный рецеп-

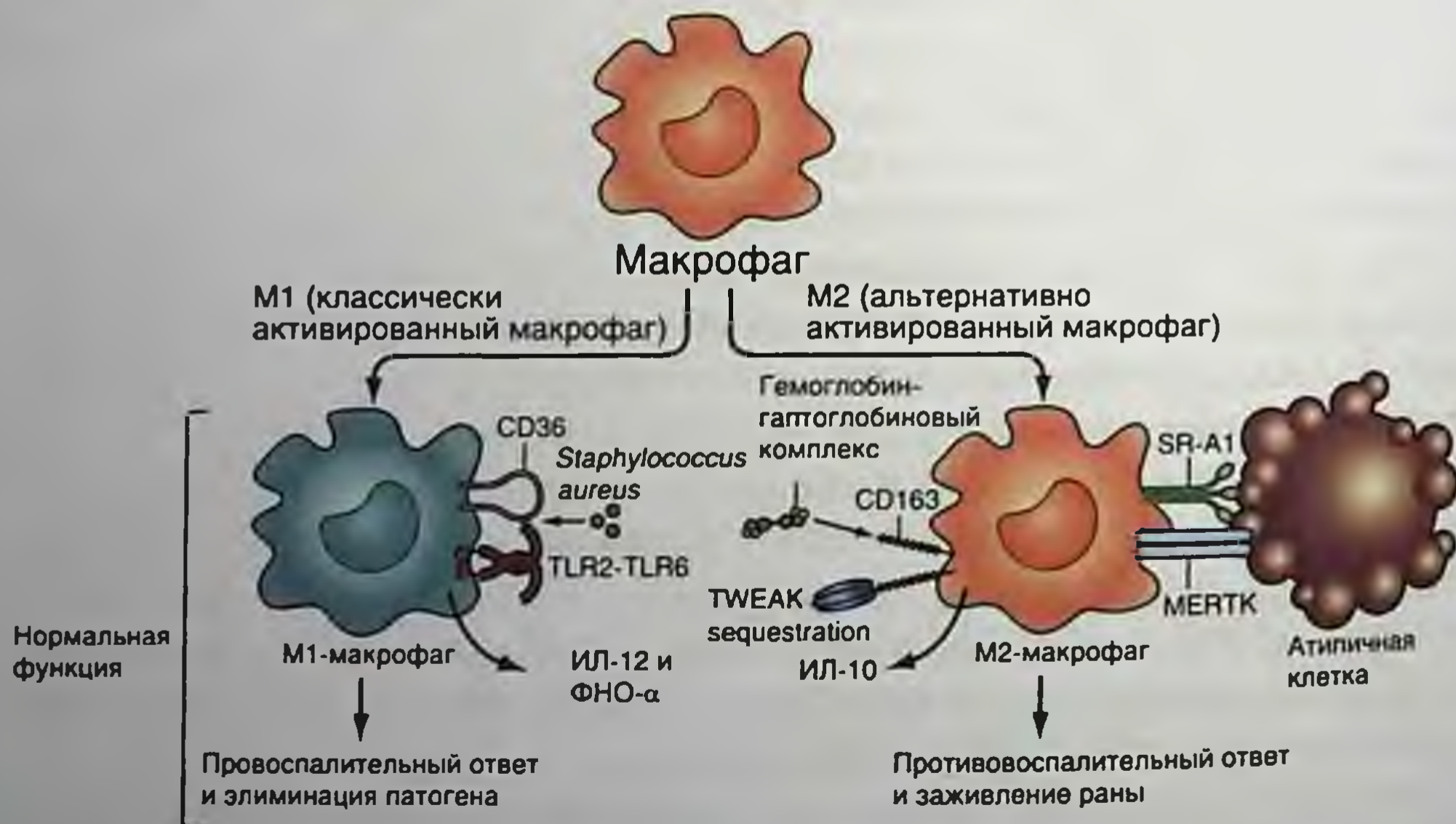


Рис. 8.5. Разновидности и функциональная активность макрофагов

тор). Естественные киллеры содержатся в крови, тканях, особенно их много в печени, слизистой оболочке репродуктивной системы женщин, селезенке. Цитотоксическое действие естественные киллеры оказывают с помощью особого белка перфорина, который, подобно мембрано-атакующему комплексу комплемента, образует поры в мембранах клеток-мишеней.

Взаимодействие естественного киллера с клеткой-мишенью может происходить по двум направлениям.

Во-первых, при межклеточном взаимодействии через специфические рецепторы. На естественных киллерах экспрессируются специфические рецепторы: KIR — *killer inhibitory receptor* (ингибирующий рецептор), KAR — *killer activating receptor* (активирующий рецептор). Лигандом KIR является молекула главного комплекса гистосовместимости (МНС; HLA) I класса. Если суммарный сигнал с KAR-рецепторов не превышает сигнала с KIR, в таком случае активации клеток не происходит.

Если МНС (HLA) I класса содержит генетически чужеродный протеин (вирусный, опухолевый) или нарушено строение молекулы или отсутствует достаточное количество молекул на поверхности клетки-мишени, в таком случае процент сигналов с KIR-рецепторов значительно снижается, соответственно, возрастает относительный уровень сигналов с KAR-рецепторов, что, в свою очередь, приводит к активации естественного киллера и к выбросу активных молекул: перфоринов и гранзимов. Перфорины образуют пору в цитоплазматической мембране клетки-мишени, а гранзимы проникают внутрь клетки и вызывают апоптоз (рис. 8.6).

Во-вторых, известно, что на поверхности естественного киллера, помимо специфических рецепторов, присутствуют FcγR, которые связываются с комплексом IgG–антиген (в качестве антигена может выступать компонент клетки-мишени). В данном случае запускается механизм ADCC (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦТ).

Активированные естественные киллеры помимо прямого цитолиза инфицированных клеток могут продуцировать эффекторные молекулы (ИФН-γ) и выполнять регуляторную функцию в механизмах врожденного иммунитета.

Эозинофилы относятся к полиморфноядерным лейкоцитам. Они отличаются от нейтрофилов тем, что обладают слабой фагоцитарной активностью. Эозинофилы поглощают некоторые бактерии, но внутриклеточный киллинг у них менее эффективен, чем у нейтрофилов.

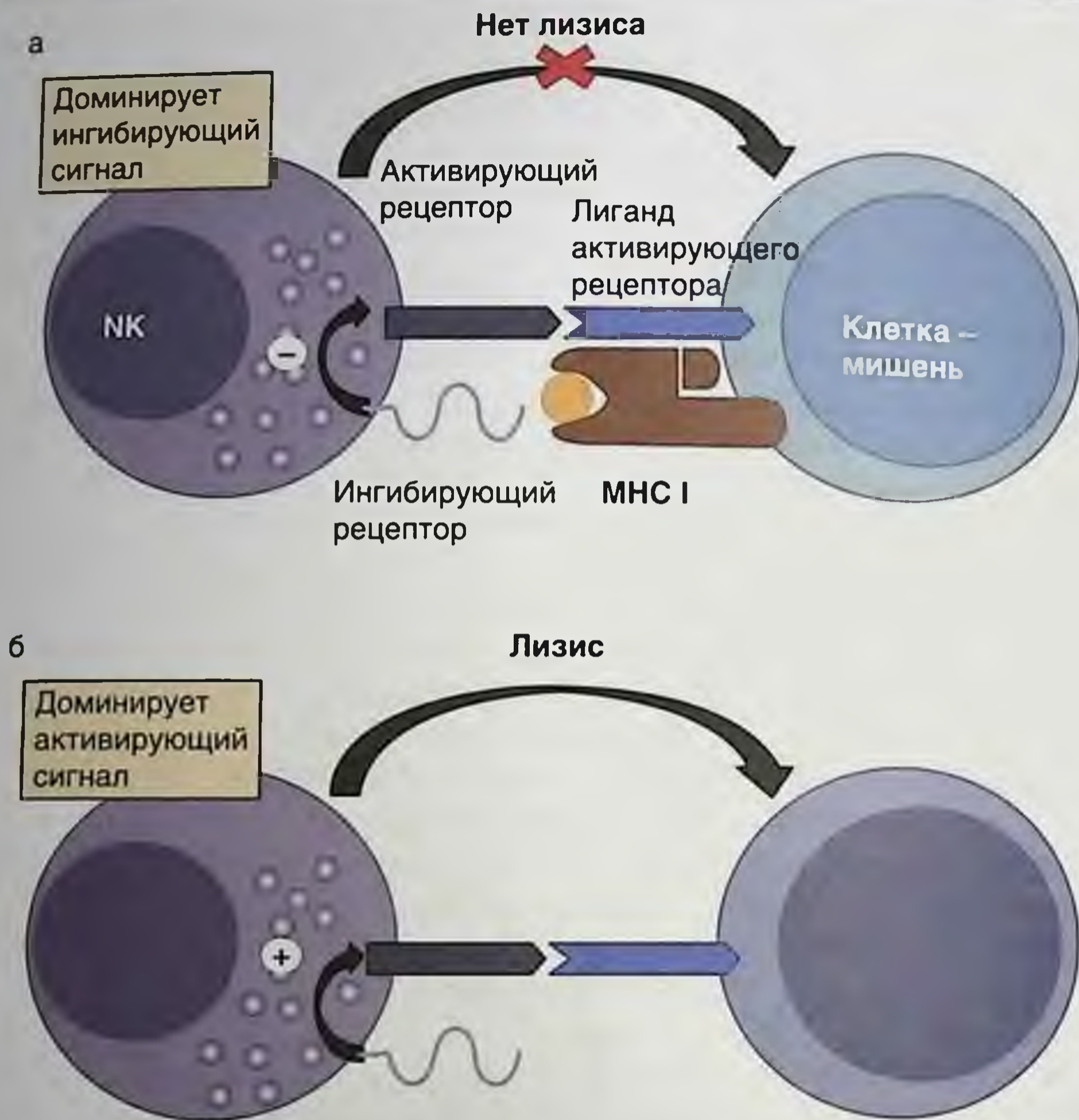


Рис. 8.6. Активация естественного киллера

Основная функция эозинофилов заключается в защите от крупных паразитов. После активации эти клетки выделяют токсичные продукты своих гранул, оказывающих губительное действие на гельминты. К таким продуктам относят: катионный белок — РНКазу, контакт с которой приводит к образованию мембранных каналов в оболочке паразита; пероксидазу эозинофилов, которая, в отличие от пероксидазы нейтрофилов, окисляя субстраты, приводит к образованию гипогалидов, высокотоксичных для некоторых паразитов; главный основной белок эозинофилов — основной компонент гранул, который способен полимеризоваться в оболочке паразита с образованием трансмембранных пор, через которые внутрь мишени проникают другие медиаторы.

Базофилы — гранулоциты крови, имеющие слабо сегментированное ядро и содержащие в цитоплазме крупные гранулы, окрашивающиеся основными красителями метахроматично. Их доля от общего числа лейкоцитов составляет 0,5–1,0%.

Базофилы мигрируют в очаг воспаления под действием анафилоксинов С3а, С4а, С5а. Характерной особенностью базофилов является то, что на мембранах этих клеток присутствуют рецепторы FcR для связывания молекул IgE и G. Индукция воспалительных реакций после рецепции антител определенной структуры и взаимодействия их с полидетерминантными антигенами на поверхности этих клеток сопровождается активацией базофила и его дегрануляцией с выбросом в кровь и ткани биологически активных веществ: гистамина, гепарина, серотонина, лейкотриенов, простагландина, провоспалительных белков, а также ряда ферментов. Базофилы обладают способностью к фагоцитозу, но это не является их основной функцией.

Тучные клетки представляют собой лейкоциты, которые образуются из кроветворных клеток-предшественников. В крови они находятся в незрелой форме непродолжительное время, после чего мигрируют в хорошо васкуляризированные ткани, где завершается их дифференцировка и созревание под действием микроокружения и цитокинов.

Тучные клетки присутствуют во всех органах и тканях организма человека, но наибольшее их количество сосредоточено в местах контакта с внешней средой — кожа, слизистые оболочки дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. На поверхности тучных клеток находятся рецепторы для IgE. В цитоплазме этих клеток содержатся сотни везикул с гистамином, гепарином, серотонином, лейкотриенами, тромбоксаном, гликозаминогликанами, хемотаксическими факторами, ферментами триптазой/химазами, фактором сосудистой проницаемости, фактором роста эндотелия и пр. Тучные клетки принимают участие в развитии реакции ГНТ, коагуляции крови, иммунном ответе.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

- А. Отметьте гуморальные факторы врожденного иммунитета!
1. Комплемент.
 2. ИФН.
 3. IgE.
 4. Лизоцим.
 5. Дефензины.

Б. Отметьте компоненты комплемента, которые являются анафилатоксинами:

1. C3a.
2. C1q.
3. C5a.
4. C2.

В. Отметьте клетки врожденного иммунитета:

1. Моноциты/макрофаги.
2. Дендритные клетки.
3. Т-лимфоциты.
4. В-лимфоциты.
5. Тромбоциты.

Г. Отметьте участников классического пути активации комплемента:

1. C1.
2. C2.
3. C4.
4. Пропердин.
5. IgM.
6. IgG.

Глава 9

АНТИГЕНЫ И ИММУННАЯ СИСТЕМА ЧЕЛОВЕКА

9.1. АНТИГЕНЫ

9.1.1. Общие сведения

Жизнедеятельность каждого макроорганизма проходит в непосредственном контакте с разнообразными чужеродными для него объектами: клетками, доклеточными формами жизни и отдельными биоорганическими молекулами. Будучи чужеродными, эти объекты таят в себе огромную опасность, так как могут нарушить гомеостаз, повлиять на течение биологических процессов в макроорганизме и даже повлечь его гибель. Контакт с чужеродными объектами представляет собой ранний сигнал опасности для иммунной системы, они являются основным раздражителем и объектом системы приобретенного иммунитета. Такие объекты получили название «антигены» (от греч. *anti* — против, *genos* — создавать).

Современное определение термина «антиген» — это объект органической природы, генетически чужеродный для макроорганизма, который при попадании в последний распознается его иммунной системой и вызывает иммунные реакции, направленные на его устранение. Учение об антигенах является ключевым для понимания основ молекулярно-генетических механизмов иммунной защиты макроорганизма, а также принципов иммунотерапии и иммунопрофилактики.

Антигены имеют разнообразное происхождение. Они являются продуктом природного биологического синтеза любого чужеродного организма, могут образовываться в собственном организме при нарушении нормального биосинтеза или генетической мутации клеток, а также при структурных изменениях уже синтезированных молекул в ходе их

биодegradации. Кроме того, антигены могут быть получены искусственно в результате научной работы или путем направленного химического синтеза. Однако в любом случае молекулу антигена будет отличать генетическая чужеродность по отношению к макроорганизму, в который она попала. Теоретически антигеном может быть молекула любого органического соединения.

Антигены могут попадать в макроорганизм самыми разными путями: через кожные покровы или слизистые оболочки, непосредственно во внутреннюю среду организма, минуя покровы или образовываясь внутри него. При попадании в макроорганизм антигены распознаются иммунокомпетентными клетками и вызывают каскад разнообразных иммунных реакций, направленных на их инактивацию, разрушение и удаление.

9.1.2. Свойства антигенов

Характерными свойствами антигенов являются антигенность, иммуногенность и специфичность.

Антигенность — это потенциальная способность молекулы антигена взаимодействовать с факторами иммунитета (антитела, клон эффекторных лимфоцитов). При этом во взаимодействие вступает не вся молекула антигена, а только ее небольшой участок, который получил название «антигенная детерминанта», или «эпитоп».

Различают *линейные*, или *секвенциальные*, антигенные детерминанты, например первичная аминокислотная последовательность пептидной цепи, и *поверхностные*, или *конформационные*, расположенные на поверхности молекулы антигена и возникшие в результате вторичной или более высокой конформации. На концевых участках молекулы антигена расположены *концевые эпитопы*, а в центре молекулы — *центральные*. Существуют также *глубинные*, или *скрытые*, антигенные детерминанты, которые проявляются при деградации конечной конформации макромолекулы.

Размер антигенной детерминанты невелик. Он определяется характеристиками рецепторной части фактора иммунитета и структурой эпитопа. Например, антигенсвязывающий участок молекулы иммуноглобулина способен распознать линейную антигенную детерминанту, состоящую из 5 аминокислотных остатков. Для образования конформационной детерминанты требуется 6–12 аминокислотных остатков. Рецепторному аппарату Т-киллера для определения чужеродности тре-

буется нанопептид, а Т-хелперу — олигопептид размером 12–25 аминокислотных остатков.

Молекулы большинства антигенов имеют довольно большие размеры. В их структуре определяется множество антигенных детерминант, которые распознаются разными по специфичности антителами и клонами лимфоцитов. Поэтому антигенность зависит не только от наличия, но и от числа антигенных детерминант в структуре молекулы.

Структура и состав эпитопа имеют критическое значение. Например, замена хотя бы одной аминокислоты приводит к образованию принципиально новой антигенной детерминанты. Денатурация приводит к потере имеющихся антигенных детерминант или появлению новых.

Вместе с тем антигенные детерминанты даже генетически неродственных существ или веществ могут иметь определенное подобие и способны специфически взаимодействовать с одними и теми же факторами иммунитета. Такие антигены получили название «перекрестно реагирующие». Обнаружено также сходство антигенных детерминант стрептококка, сарколеммы миокарда и базальной мембраны почек, *Treponema pallidum* и липидной вытяжки из миокарда крупного рогатого скота, возбудителя чумы и эритроцитов человека 0(I) группы крови. Явление, когда один организм маскируется антигенами другого для защиты от факторов иммунитета, получило название «антигенная мимикрия».

Иммуногенность

Иммуногенность — потенциальная способность антигена вызывать по отношению к себе в макроорганизме специфический продуктивный ответ. Иммуногенность зависит от трех групп факторов:

- 1) молекулярных особенностей антигена;
- 2) кинетики антигена в организме;
- 3) реактивности макроорганизма.

К первой группе факторов отнесены чужеродность, природа, химический состав, молекулярная масса, структура и некоторые другие характеристики.

Чужеродность — обязательное условие для реализации иммуногенности. Понятие «чужеродность» относительное, так как иммунокомпетентные клетки не способны напрямую анализировать генетический код, а лишь продукты, синтезированные на его матрице. В норме иммунная система невосприимчива к собственным биополимерам, если они не приобрели черты чужеродности. Однако при некоторых

патологических состояниях в результате нарушения регуляции иммунного ответа (см. аутоантигены, аутоантитела, аутоиммунитет, аутоиммунные болезни) собственные биополимеры могут восприниматься иммунной системой как чужие.

Чужеродность находится в прямой зависимости от эволюционного расстояния между организмом и источником антигенов. Чем дальше в таксономическом плане организмы отстоят друг от друга, тем большей чужеродностью и, следовательно, иммуногенностью обладают их антигены. Чужеродность заметно проявляется даже между особями одного вида, так как замена хотя бы одной аминокислоты эффективно распознается антителами в серологических реакциях.

Природа антигена в значительной степени определяет иммуногенность. Наиболее выраженной иммуногенностью обладают белки и полисахариды, наименьшей — нуклеиновые кислоты и липиды. В то же время их сополимеры — ЛПС, гликопротеиды, липопротеиды способны в достаточной мере активировать иммунную систему.

Иммуногенность в определенной мере зависит от *химического состава* молекулы антигена. Для белковых антигенов важно разнообразие их аминокислотного состава. Монотонные полипептиды, построенные из одной аминокислоты, практически не активируют иммунную систему. Наличие в структуре молекулы белка ароматических аминокислот, таких как тирозин, триптофан, существенно повышает иммуногенность.

Важна оптическая изомерия структурных компонентов молекулы антигена. Пептиды, построенные из L-аминокислот, высокоиммуногенны. Полипептидная цепочка, построенная из правовращающих изомеров аминокислот, напротив, может проявлять ограниченную иммуногенность при введении в малых дозах.

В спектре иммуногенности существует определенная иерархия антигенных детерминант. Эпитопы различаются по способности индуцировать иммунный ответ, и некоторые из них будут доминировать. При иммунизации некоторым антигеном будут преобладать реакции к отдельным антигенным детерминантам. Это явление получило название «иммунодоминантность» и обусловлено различиями в сродстве эпитопов к рецепторам иммунокомпетентных клеток.

Большое значение имеют *размер и молекулярная масса* антигена. Олигопептид, способный индуцировать иммунный ответ, должен состоять из 6–12 аминокислотных остатков и иметь молекулярную массу около 450 Д. С увеличением размера пептида возрастает его иммуногенность, однако эта зависимость на практике не всегда выполняется. Так,

при равной молекулярной массе (около 70 кД) альбумин является более сильным антигеном, чем гемоглобин.

Опытным путем было доказано, что высокодисперсные коллоидные растворы антигена плохо индуцируют иммунный ответ. Гораздо большей иммуногенностью обладают агрегаты молекул и корпускулярные антигены — цельные клетки (эритроциты, бактерии и т.д.). Это связано с тем, что корпускулярные и высокоагрегированные антигены лучше фагоцитируются, чем отдельные молекулы.

Оказалась также существенной стерическая стабильность молекулы антигена. При денатурации белков до желатина вместе с конформационной жесткостью теряется иммуногенность. Поэтому растворы желатина широко используются для парентерального введения.

Важным условием иммуногенности является *растворимость* антигена. Например, высокомолекулярные соединения кератин, меланин, натуральный шелк и другие нерастворимы в воде, не образуют коллоидных растворов в нормальном состоянии и не являются иммуногенами. Благодаря этому свойству конский волос, шелк и другие применяют в клинической практике для сшивания органов и тканей.

Вторая группа факторов связана с динамикой поступления антигена в организм и его выведения. Так, хорошо известна зависимость иммуногенности антигена от *места* и *способа* его введения, что обусловлено особенностями строения иммунной системы в местах интервенции антигена.

Сила иммунного ответа зависит от *количества* поступающего антигена: чем его больше, тем выраженнее иммунная реакция макроорганизма.

Третья группа объединяет факторы, определяющие зависимость иммуногенности от состояния макроорганизма: наследственности и функциональных характеристик. Хорошо известно, что результат иммунизации в определенной мере связан с генотипом особи. Существуют чувствительные и нечувствительные к определенным антигенам роды и виды животных. Например, кролики и крысы практически не реагируют на некоторые бактериальные антигены, которые могут вызывать у морской свинки или мыши чрезвычайно бурный иммунный ответ.

Специфичность

Специфичностью называют способность антигена индуцировать иммунный ответ к строго определенному эпитопу. Специфичность антигена во многом определяется свойствами составляющих его эпитопов.

9.1.3. Классификация антигенов

Основываясь на отдельных характерных свойствах, все многообразие антигенов можно классифицировать по происхождению, природе, молекулярной структуре, степени иммуногенности, степени чужеродности, направленности активации и обеспеченности иммунного реагирования.

По происхождению различают:

- экзогенные (возникшие вне организма);
- эндогенные (возникшие внутри организма) антигены.

Среди эндогенных особого внимания заслуживают ауто- и неоантигены.

Аутогенные антигены (аутоантигены) — это структурно неизмененные антигены собственного организма, синтезируемые в организме в физиологических условиях.

В норме аутоантигены неиммуногенны вследствие сформировавшейся *иммунологической толерантности* (невосприимчивости) либо их недоступности для контакта с факторами иммунитета — это так называемые *забарьерные* антигены. При срыве толерантности или нарушении целостности биологических барьеров (воспаление, травма) компоненты иммунной системы начинают контактировать и специфически реагировать на аутоантигены выработкой специфических факторов иммунитета (аутоантитела, клон аутореактивных лимфоцитов).

Неоантигены, в отличие от аутоантигенов, возникают в организме в результате генетических мутаций или модификаций и всегда чужеродны.

По природе они подразделяются:

- на биополимеры белковой природы (протеиды);
- небелковой природы (полисахариды, липиды, ЛПС, нуклеиновые кислоты и др.).

По молекулярной структуре бывают:

- глобулярные (молекула имеет шаровидную форму);
- фибриллярные (форма нити).

По степени иммуногенности антигены делятся:

- на *полноценные*. Обладают выраженной антигенностью и иммуногенностью — иммунная система чувствительного организма реагирует на их введение выработкой факторов иммунитета. Такие вещества, как правило, имеют достаточно большую молекулярную массу (более 10 кД), большой размер молекулы (частицы) в виде глобулы и хорошо взаимодействуют с факторами иммунитета;

- *неполноценные*, или «гаптены» (термин предложен К. Ландштейнером). Обладают антигенностью, способны специфически взаимодействовать с уже готовыми факторами иммунитета (антителами, лимфоцитами), но не способны при введении в нормальных условиях индуцировать в организме иммунный ответ. Чаще всего гаптенами являются низкомолекулярные соединения (молекулярная масса менее 10 кД).

Если искусственно укрупнить молекулу гаптена — соединить ее прочной связью с достаточно большой белковой молекулой, удастся заставить иммунную систему макроорганизма специфически реагировать на гаптен как на полноценный антиген и вырабатывать факторы иммунитета. Молекула белка-носителя получила название «шлеппер» (тягач). При этом специфичность в составе молекулы конъюгата определяется гаптенной частью, а иммуногенность — белком-носителем. Используя для иммунизации конъюгаты, получают антитела к гормонам, лекарственным препаратам и другим низкоиммуногенным соединениям.

По степени чужеродности антигены бывают следующих видов.

- *Ксеногенные антигены* (или гетерологичные) — общие для организмов, стоящих на разных ступенях эволюционного развития, например, относящиеся к разным родам и видам. Впервые феномен общности ряда антигенов у животных разных видов был отмечен Д. Форсманом (1911). При иммунизации кролика суспензией органов морской свинки ученый получил иммунную сыворотку, способную взаимодействовать с эритроцитами барана. Позже было установлено, что морская свинка и баран имеют ряд структурно сходных антигенных детерминант, дающих перекрестное реагирование. В дальнейшем перечень подобных ксеногенных антигенов был значительно расширен и они получили обобщенное название «антигены Форсмана».
- *Аллогенные антигены* (или групповые) — общие для генетически неродственных организмов, но относящихся к одному виду. На основании аллоантигенов общую популяцию организмов можно подразделить на отдельные группы. Примером таких антигенов у людей являются антигены групп крови (системы АВ0 и др.). Аллогенные ткани при трансплантации иммунологически несовместимы — они отторгаются или лизируются реципиентом. Микробы на основании групповых антигенов могут быть подразделены на серогруппы, что используется в микробиологической диагностике.

- *Изогенные антигены* (или индивидуальные) — общие только для генетически идентичных организмов, например для однояйцовых близнецов, инбредных линий животных. Изотрансплантаты обладают практически полной иммунной совместимостью и не отторгаются. К изоантигенам у людей относятся антигены гистосовместимости, а у бактерий — типовые антигены, не дающие дальнейшего расщепления.

В пределах отдельного организма в определенных органах или тканях обнаруживаются специфичные для них антигены, которые нигде больше не встречаются. Такие антигены получили название «органо- и тканеспецифические».

В зависимости от физико-химических свойств антигена, условий его внедрения, характера реакции и реактивности макроорганизма различают следующее.

- *Иммуногены* способны индуцировать нормальную продуктивную реакцию иммунной системы — выработку факторов иммунитета (антитела, антигенореактивные клоны лимфоцитов). В клинической практике иммуногены используют для иммунодиагностики, иммунотерапии и иммунопрофилактики многих патологических состояний.
- *Толероген* является полной противоположностью иммуногену. Он формирует иммунологическую толерантность или неответчаемость на эпитопы данного вещества (см. раздел 11.6). Толероген, как правило, — мономер с низкой молекулярной массой и высокой степенью дисперсности. Толерогены используют для профилактики и лечения иммунологических конфликтов и аллергии путем наведения искусственной неответчаемости на отдельные антигены.
- *Аллерген*, в отличие от иммуногена, формирует патологическую реакцию организма в виде ГНТ или ГЗТ (см. раздел 10.4). По своим свойствам аллерген не отличается от иммуногена. В клинической практике аллергены применяют для диагностики инфекционных и аллергических заболеваний.

По направленности активации и обеспеченности иммунного реагирования, то есть необходимости вовлечения Т-лимфоцитов в индукцию иммунного ответа, выделяют:

- Т-зависимые антигены;
- Т-независимые антигены.

Иммунная реакция в ответ на введение Т-зависимого антигена реализуется при обязательном участии Т-хелперов. К ним относятся

большая часть известных антигенов. Для развития иммунного ответа на Т-независимые антигены не требуется привлечение Т-хелперов. Эти антигены способны непосредственно стимулировать В-лимфоциты к антителопродукции, дифференцировке и пролиферации, а также вызывать иммунный ответ у бестимусных животных. Т-независимые антигены имеют относительно простое строение.

От Т-независимых антигенов следует отличать *суперантигены*. Это крупные молекулы в основном микробного происхождения с молекулярной массой более 10 кД. Они поливалентны и имеют многочисленные однотипные эпитопы, являются митогенами (стимулируют митоз) и поликлональными активаторами (действуют на несколько клонов) и способны вмешиваться в кооперацию АЗКЦТ и Т-хелпера и формировать ложный сигнал распознавания чужеродной субстанции.

Суперантигены способны одновременно неспецифически активировать огромное количество иммунокомпетентных клеток (до 20% и более), вызывать ложное, неспецифическое клонирование антигенспецифических лимфоцитов, гиперпродукцию цитокинов и низкоспецифичных иммуноглобулинов, массовую гибель лимфоцитов вследствие апоптоза и развитие вторичного функционального иммунодефицита. Свойства суперантигена обнаружены у стафилококкового энтеротоксина, белков вирусов Эпштейна–Барр, бешенства, ВИЧ, полимерного флагеллина (сократительного белка жгутиков бактерий), ЛПС грамотрицательных бактерий, туберкулина и некоторых других микробных агентов.

9.1.4. Антигены организма человека

Начало изучению аллоантигенных свойств тканей было положено К. Ландштайнером, который в 1901 г. открыл систему групповых антигенов эритроцитов (ABO). В организме человека выделяют множество разнообразных антигенов. Они не только нужны для полноценного развития и функционирования всего организма в целом, но также несут важную информацию при клинко-лабораторной диагностике, определении иммунной совместимости органов и тканей в трансплантологии, а также в научных исследованиях. Наибольший медицинский интерес из числа аллогенных антигенов представляют антигены групп крови, среди изогенных — антигены гистосовместимости, а в группе органо- и тканеспецифических — раково-эмбриональные антигены.

Антигены групп крови человека

Антигены групп крови человека располагаются на цитоплазматической мембране клеток. Наиболее легко они определяются на поверхности эритроцитов, поэтому и получили название «эритроцитарные антигены». В настоящее время известно более 250 различных эритроцитарных антигенов. Однако наиболее важное клиническое значение имеют антигены системы АВ0 и Rh (резус-фактор): их необходимо учитывать при проведении переливания крови, пересадке органов и тканей, предупреждении и лечении иммуноконфликтных осложнений беременности и т.д.

Антигены системы АВ0 обнаруживаются в плазме крови, лимфе, секретах слизистых оболочек и других биологических жидкостях, но наиболее выражены на эритроцитах. Они синтезируются многими клетками организма, включая ядродержащие предшественники эритроцитов, и свободно секретируются в межклеточное пространство. На мембране клеток эти антигены могут появиться либо как продукт клеточного биосинтеза, либо в результате сорбции из межклеточных жидкостей.

Антигены системы АВ0 представляют собой высокогликозилированные пептиды: 85% приходится на углеводную часть и 15% — на полипептидную. Пептидный компонент состоит из 15 аминокислотных остатков. Он постоянен для всех групп крови АВ0 и иммунологически инертен. Иммуногенность молекулы антигена системы АВ0 определяется его углеводной частью.

В системе антигенов АВ0 выделяют три варианта антигенов, различаемых по строению углеводной части: Н, А и В. Базовой молекулой является антиген Н, специфичность которого определяют три углеводных остатка. Антиген А имеет в структуре дополнительный четвертый углеводный остаток — N-ацетил-D-галактозу, а антиген В — D-галактозу. Антигены системы АВ0 имеют независимое аллельное наследование, что определяет наличие в популяции 4 групп крови: 0(I), А(II), В(III) и АВ(IV). Кроме того, антигены А и В имеют несколько аллотипов (например, А₁, А₂, А₃,... или В₁, В₂, В₃,...), которые встречаются в популяции людей с разной частотой.

Антигены системы АВ0 определяют в реакции агглютинации. Однако, учитывая высокий популяционный полиморфизм данной антигенной системы, перед гемотрансфузией обязательно проводят биологическую пробу на совместимость крови реципиента и донора. Ошибка в определении групповой принадлежности и переливание пациенту несовместимой по группе крови приводят к развитию острого внутрисосудистого гемолиза.

Другой важнейшей системой эритроцитарных антигенов является *система резус-антигенов (Rh)*, или *резус-факторов*. Эти антигены синтезируются предшественниками эритроцитов и обнаруживаются главным образом на эритроцитах. Резус-антиген представляет собой водорастворимый термолабильный липопроteid. Выделяют 6 разновидностей этого антигена. Генетическая информация о его строении закодирована в многочисленных аллелях трех сцепленных между собой локусов (D/d, C/c, E/e). В зависимости от наличия или отсутствия резус-антигена, в популяции людей различают резус-положительных и резус-отрицательных индивидуумов.

Совпадение по резус-антигену важно не только при переливании крови, но также для течения и исхода беременности. При беременности резус-отрицательной матери резус-положительным плодом может развиться *резус-конфликт*. Это патологическое состояние связано с выработкой антирезусных антител, способных вызвать иммунологический конфликт: невынашивание беременности или желтуху новорожденного (внутрисосудистый иммунный лизис эритроцитов).

Вследствие того что плотность резус-антигена на мембране эритроцитов невысока и его молекула обладает слабой антигенностью, резус-фактор определяют на мембране эритроцитов в реакции непрямой агглютинации (реакция Кумбса), используя «вторые», антииммуноглобулиновые антитела.

Антигены гистосовместимости

Практически все клетки макроорганизма синтезируют и экспрессируют на своей цитоплазматической мембране **антигены гистосовместимости**. Большая часть из них относится к системе *главного комплекса гистосовместимости*, или МНС (от англ. *Main Hystocompatibility Complex*). Установлено, что антигены гистосовместимости играют ключевую роль в осуществлении специфического распознавания «свой—чужой», то есть «иммунологического надзора», и индукции приобретенного иммунного ответа, определяют совместимость органов и тканей при трансплантации в пределах одного вида и другие эффекты. Большая заслуга в изучении МНС принадлежит Дж. Доссе, П. Догерти, П. Гореру, Г. Снеллу, Р. Цинкернагелю, Р.В. Петрову, ставшим основоположниками *иммуногенетики*.

Впервые МНС был обнаружен в 1960-х годах в опытах на генетически чистых (инбредных) линиях мышей при попытке межлинейной пересадки опухолевых тканей (П. Горер, Г. Снелл). У мышей этот комплекс получил название H-2 и был картирован в хромосоме 17.

У человека МНС был описан несколько позже в работах Дж. Доссе. Его обозначили как **HLA** (от англ. *Human Leukocyte Antigen*). Биосинтез *HLA* определяется генами, локализованными сразу в нескольких локусах короткого плеча хромосомы 6.

МНС имеет сложную структуру и высокую полиморфность. Антигены гистосовместимости представляют собой гликопротеины, прочно связанные с цитоплазматической мембраной клеток. Их отдельные фрагменты имеют структурное сходство с молекулами иммуноглобулинов и поэтому относятся к единому *суперсемейству иммуноглобулинов*. Различают два основных класса молекул МНС (I и II), которые объединяют множество сходных по структуре антигенов, кодируемых множеством аллельных генов. На клетках индивидуума могут одновременно экспрессироваться не более двух разновидностей продуктов каждого гена МНС. МНС I класса индуцирует преимущественно клеточный иммунный ответ, а МНС II класса — гуморальный.

МНС I класса состоит из двух нековалентно связанных полипептидных цепей (α и β) с разной молекулярной массой (рис. 9.1). α -Цепь имеет внеклеточный участок с доменным строением (α_1 -, α_2 - и α_3 -домены),

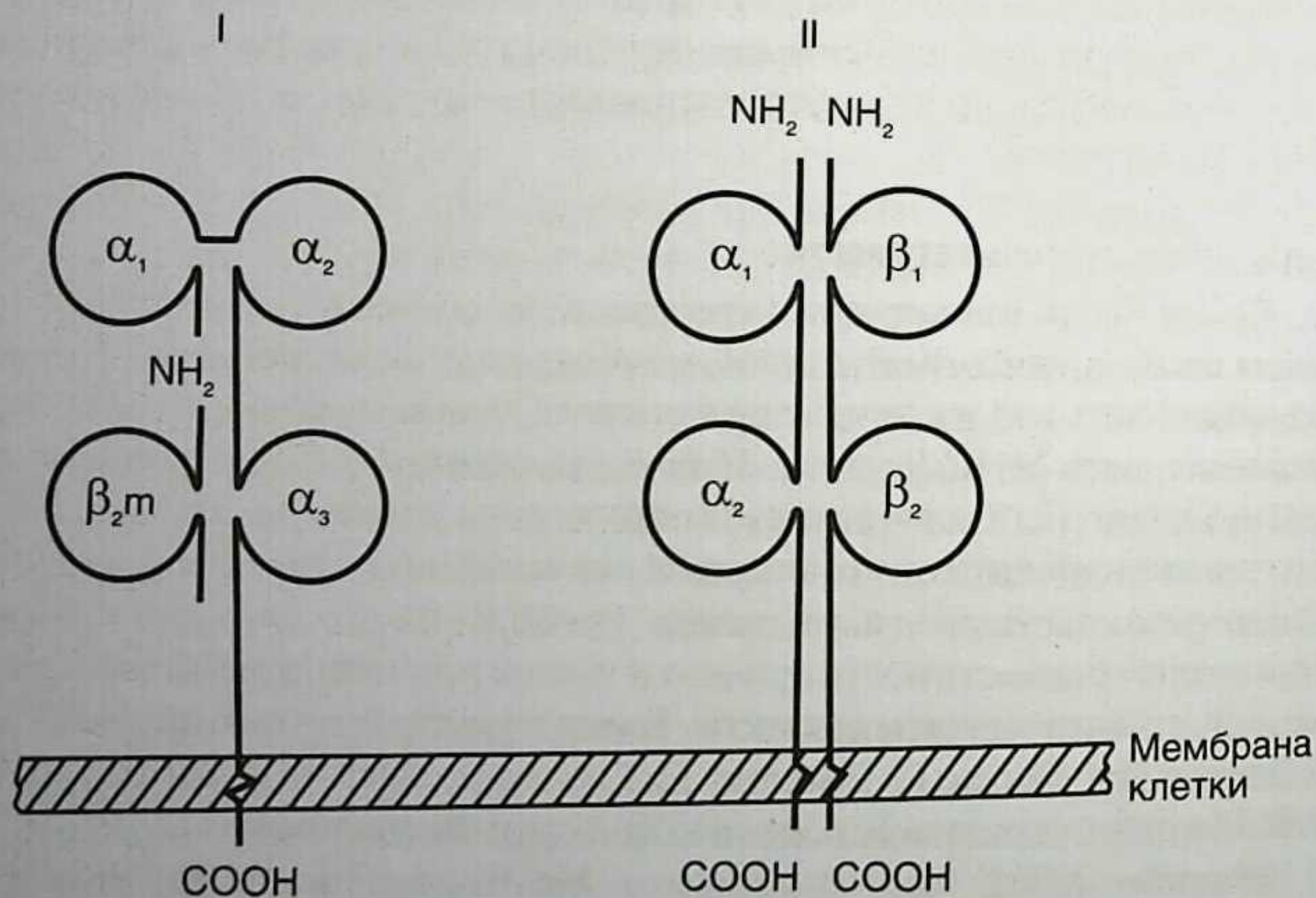


Рис. 9.1. Схема строения антигенов главного комплекса гистосовместимости: I — главный комплекс гистосовместимости I класса; II — главный комплекс гистосовместимости II класса антигена

трансмембранный и цитоплазматический. β -Цепь представляет собой β_2 -микроглобулин, адгезированный на α_3 -домен после экспрессии α -цепи на цитоплазматической мембране клетки. α_1 - и α_2 -Домены α -цепи формируют щель Бьеркмана — участок, ответственный за сорбцию и презентацию олигопептида. Щель Бьеркмана МНС I класса вмещает нанопептид, который легко выявляется специфическими антителами.

Сборка комплекса МНС I класса — антиген протекает внутриклеточно непрерывно на эндоплазматическом ретикулуме. В его состав включаются любые эндогенно синтезированные пептиды, в том числе вирусные, куда они переносятся из цитоплазмы с помощью особого белка — *протеосомы*. Включенный в комплекс пептид придает структурную устойчивость МНС I класса. В его отсутствие функцию стабилизатора выполняет *шаперон (калнексин)*.

МНС I класса экспрессируются на поверхности практически всех клеток, кроме эритроцитов и клеток ворсинчатого трофобласта (профилактика отторжения плода). Плотность МНС I класса достигает 7000 молекул на клетку, и они покрывают около 1% ее поверхности. Для них характерна высокая скорость биосинтеза — процесс завершается за 6 ч. Экспрессия МНС I класса усиливается под влиянием цитокинов, например ИФН- γ .

В настоящее время у человека различают более 200 различных вариантов HLA I класса. Они кодируются генами, картированными в трех основных сублокусах хромосомы 6 и наследуются и проявляются независимо: HLA-A, HLA-B и HLA-C. Локусы A, B и C объединяют десятки вариантов. Независимое наследование генов сублокусов в популяции формирует бесконечное разнообразие неповторяющихся комбинаций HLA I класса. Каждый человек строго уникален по набору антигенов гистосовместимости, исключение составляют только однойцовые близнецы. Основная биологическая роль HLA I класса — обеспечение биологической индивидуальности («биологический паспорт»), так как они являются маркерами «своего» для иммунокомпетентных клеток. Заражение клетки вирусом или ее мутация изменяют структуру HLA I класса, что является сигналом для активации Т-киллеров (CD8⁺-лимфоциты) к уничтожению объекта.

HLA I класса выявляют на лимфоцитах в серологической реакции микролимфоцитолита со специфическими сыворотками, которые получают от многорожавших женщин, пациентов после массивной гемотрансфузии, а также с использованием моноклональных антител.

В структуре и функции МНС II класса есть ряд принципиальных отличий. Комплекс образован двумя нековалентно связанными полипептидными цепями (α и β), имеющими сходное доменное строение (см. рис. 9.1). Обе цепи являются трансмембранными пептидами и «заякорены» в цитоплазматической мембране. Щель Бьеркмана в МНС II класса образована одновременно обеими цепями. Она вмещает олигопептид размером 12–25 аминокислотных остатков, недостижимый для специфических антител. МНС II класса включает в себя пептид, захваченный из внеклеточной среды путем эндоцитоза. Молекулы МНС II класса экспрессируются на поверхности ограниченного числа клеток: дендритных, В-лимфоцитах, Т-хелперах, активированных макрофагах, тучных, эпителиальных и эндотелиальных клетках. Биосинтез МНС II класса протекает в эндоплазматическом ретикулуме и экспрессируется на цитоплазматической мембране клетки в течение 1 ч после эндоцитоза антигена. Экспрессия комплекса может быть усилена ИФН- γ и снижена простагландином E_2 . У мыши антиген гистосовместимости получил название «Ia-антиген», а у человека — «HLA II класса».

По имеющимся данным, человеческому организму свойствен чрезвычайно высокий полиморфизм HLA II класса, который в большей степени определяется особенностями строения β -цепи. В состав комплекса входят продукты трех основных локусов: HLA-DR, -DQ и -DP, объединяющих сотни вариантов.

Наличие и тип МНС II класса определяют в серологических (микрولىмфоцитотоксический тест) на В-лимфоцитах и клеточных реакциях иммунитета (смешанная культура лимфоцитов). Специфические антитела к МНС II класса получают так же, как и к I классу. Тестирование в смешанной культуре лимфоцитов позволяет выявить минорные компоненты МНС II класса, не определяемые серологически.

МНС II класса участвуют в индукции приобретенного иммунного ответа. Фрагменты молекулы антигена экспрессируются на цитоплазматической мембране особой группы клеток, которая получила название «антигенпрезентирующие». Основными являются дендритная клетка, макрофаг и В-лимфоцит. Структура МНС II класса с включенным в него пептидом в комплексе с кофакторными молекулами CD-антигенов воспринимается и анализируется Т-хелперами (CD4⁺-лимфоциты). В случае распознавания чужеродности Т-хелпер начинает синтез соответствующих иммуноцитоклинов, которые включают механизм специфического иммунного реагирования: пролиферацию и дифференцировку антигенспецифических клонов В-лимфоцитов.

Помимо описанных выше антигенов гистосовместимости, идентифицирован III класс молекул МНС. Локус, содержащий кодирующие их гены, вклинивается между I и II классами и разделяет их. К МНС III класса относятся некоторые компоненты комплемента (C2, C4), белки теплового шока, ФНО и др.

Опухоль-ассоциированные антигены

В 1948–1949 гг. видный отечественный микробиолог и иммунолог Л.А. Зильбер при разработке вирусной теории рака доказал наличие антигена, специфичного для опухолевой ткани. Позже, в 1960-х годах, Г.И. Абелев (в опытах на мышах) и Ю.С. Татаринев (при обследовании людей) обнаружили в сыворотке крови больных первичным раком печени эмбриональный вариант сывороточного альбумина — *α-фетопротейн*. К настоящему моменту обнаружено и охарактеризовано множество опухоль-ассоциированных антигенов. Однако не все опухоли содержат специфические маркерные антигены, равно как и не все маркеры обладают строгой тканевой специфичностью.

Опухоль-ассоциированные антигены классифицируют по локализации и генезу. Различают *сывороточные*, секретируемые опухолевыми клетками в межклеточную среду, и *мембранные*. Последние получили название «опухолеспецифические трансплантационные антигены», или *TSTA* (от англ. *Tumor-Specific Transplantation Antigen*).

Выделяют также вирусные, эмбриональные, нормальные гиперэкспрессируемые и мутантные опухоль-ассоциированные антигены.

Вирусные антигены — продукты онковирусов, *эмбриональные* в норме синтезируются в зародышевом периоде. Хорошо известен *α-фетопротейн* (эмбриональный альбумин), нормальный протеин тестикул (*MAGE 1, 2, 3* и др.), маркеры меланомы, рака молочной железы и др. Хорионический гонадотропин, в *норме* синтезируемый в плаценте, обнаруживается при хориокарциноме и других опухолях. В меланоме в большом количестве синтезируется нормальный фермент тирозиназа. Из *мутантных* белков следует отметить протеин *Ras* — гуанозинтрифосфат-связывающий белок, участвующий в трансмембранном проведении сигнала. Маркерами рака молочной и поджелудочной желез, карцином кишечника являются модифицированные муцины (*MUC 1, 2* и др.).

В большинстве случаев опухоль-ассоциированные антигены представляют собой продукты экспрессии генов, в норме включаемых в эмбриональном периоде. Они являются слабыми иммуногенами, хотя

в отдельных случаях могут индуцировать реакцию цитотоксических Т-лимфоцитов (Т-киллеров) и распознаваться в составе молекул МНС (HLA) I класса.

CD-антигены

На мембране клеток обнаруживаются групповые антигены, объединяющие клетки с определенными морфофункциональными характеристиками. Эти молекулы получили название антигенов кластеров дифференцировки клетки, или CD-антигенов (от англ. *Cell Differentiation Antigens*, или *Cluster Definition*). По структуре они являются гликопротеинами и в большинстве своем относятся к суперсемейству иммуноглобулинов.

Список CD-маркеров довольно обширный и насчитывает около 200 вариантов. Среди многообразия CD-антигенов наиболее широкое распространение получили маркеры иммунокомпетентных клеток. Например, CD3 экспрессируется в популяции Т-лимфоцитов, CD4 — Т-хелперов, а CD8 — цитотоксических Т-лимфоцитов Т-киллеров, CD11a — моно- и гранулоцитов, CD11b — естественных киллеров, CD19–22 — В-лимфоцитов. Информация о структуре закодирована в различных участках генома, а экспрессия зависит от стадии дифференцировки клетки и ее функционального состояния.

CD-антигены имеют значение в диагностике иммунодефицитных состояний. Определение CD-маркеров осуществляется в иммунологических реакциях с использованием моноклональных антител.

9.1.5. Антигены микробов

Антигены бактерий

В структуре бактериальной клетки различают жгутиковые, соматические, капсульные и некоторые другие антигены (рис. 9.2).

Жгутиковые, или *H-антигены*, локализуются в жгутиках и представляют собой эпитопы сократительного белка флагеллина. При нагревании они денатурируют и теряют свою специфичность. Фенол на них не действует.

Соматический, или *O-антиген*, связан с клеточной стенкой бактерий. Его основу составляют ЛПС. O-антиген термостабилен и не разрушается при длительном кипячении. Однако альдегиды (например, формальдегид) и спирты нарушают его структуру.

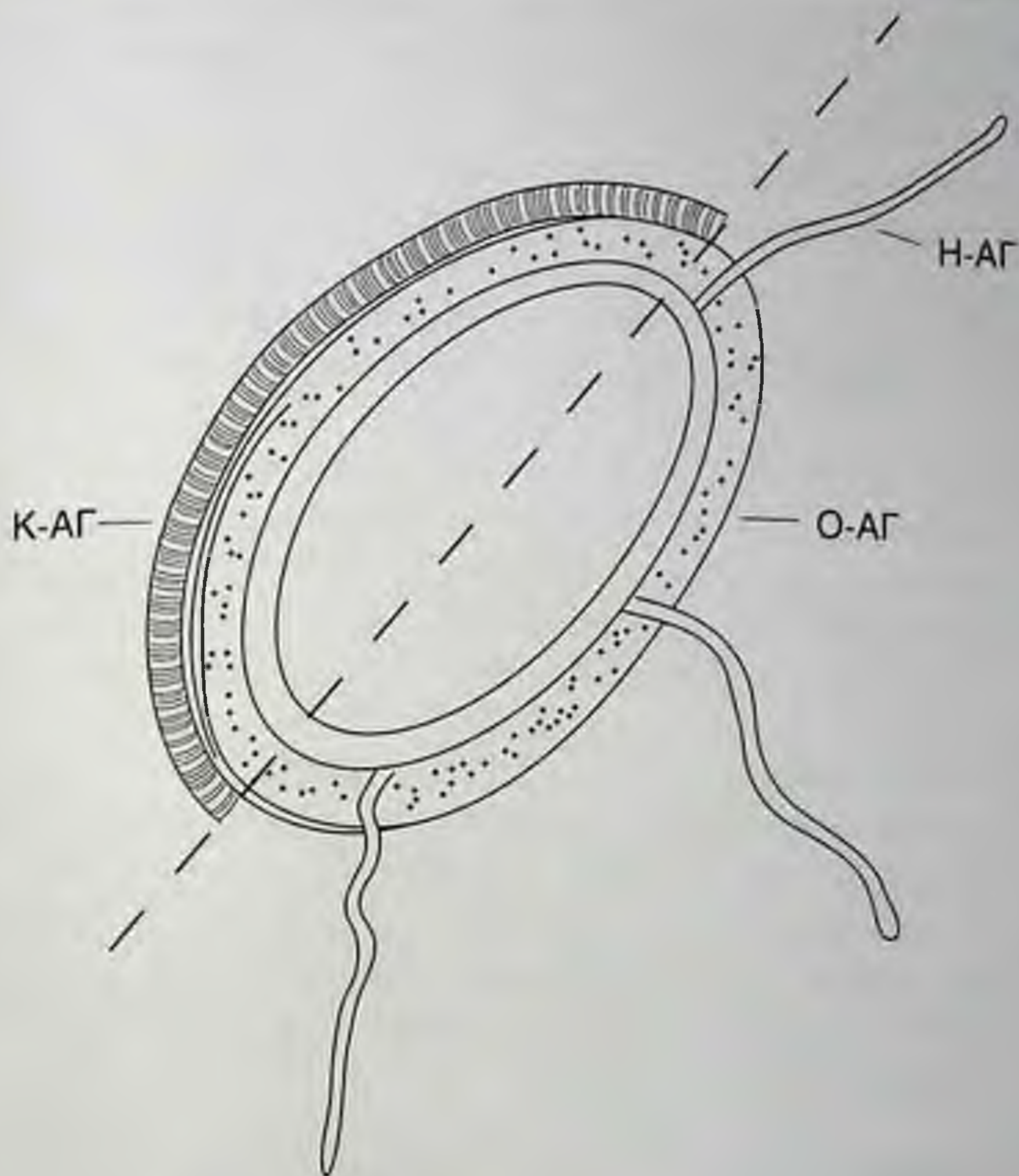


Рис. 9.2. Основные бактериальные антигены (см. пояснение в тексте)

На поверхности возбудителя брюшного тифа и других энтеробактерий, которые обладают высокой вирулентностью, можно обнаружить особый вариант соматического антигена. Он получил название «антиген вирулентности», или «Vi-антиген». Обнаружение этого антигена или специфичных к нему антител имеет большое диагностическое значение.

Если проиммунизировать животное живыми бактериями, имеющими жгутики, то будут вырабатываться антитела одновременно к O- и H-антигенам. Введение животному прокипяченной культуры стимулирует биосинтез антител к соматическому антигену. Культура бактерий, обработанная фенолом, вызовет образование антител к жгутиковым антигенам.

Капсульные, или *K-антигены*, встречаются у бактерий, образующих капсулу. Как правило, K-антигены состоят из кислых полисахаридов

(уроновые кислоты). В то же время у бациллы сибирской язвы этот антиген построен из полипептидных цепей. По чувствительности к нагреванию различают три типа К-антигена: А, В и L.

Наибольшая термостабильность характерна для группы А — они не денатурируют даже при длительном кипячении. Группа В выдерживает непродолжительное нагревание (около 1 ч) до 60 °С. Группа L быстро разрушается при этой температуре. Поэтому частичное удаление К-антигена возможно путем длительного кипячения бактериальной культуры.

Антигенными свойствами обладают также бактериальные *белковые токсины, ферменты* и некоторые другие вещества, которые секретируются бактериями в окружающую среду (например, туберкулин). Столбнячный, дифтерийный и ботулинический токсины относятся к числу сильных полноценных антигенов, поэтому их используют для получения молекулярных вакцин — анатоксинов.

В антигенном составе некоторых бактерий выделяется группа антигенов с сильно выраженной иммуногенностью, чья биологическая активность играет ключевую роль в формировании патогенности возбудителя — связывание таких антигенов специфическими антителами практически полностью инактивирует вирулентные свойства микроорганизма и обеспечивает к нему иммунитет. Эти антигены получили название «протективные».

Антигены вирусов

В структуре вирусной частицы различают *ядерные* (или *коровые*), *капсидные* (или *оболочечные*) и *суперкапсидные* антигены. На поверхности некоторых вирусных частиц встречаются особые *V-антигены* — гемагглютинин и фермент нейраминидаза. Антигены вирусов различаются по происхождению. Часть из них вирусспецифические, кодируются геномом вируса. Другие, служащие компонентами клетки-хозяина (углеводы, липиды), формируют суперкапсид вируса при его рождении путем почкования.

Антигенный состав вириона зависит от строения самой вирусной частицы. В просто организованных вирусах антигены ассоциированы с нуклеопротеидами. Эти вещества хорошо растворяются в воде и поэтому обозначаются как *S-антигены* (от лат. *solutio* — раствор). У сложноорганизованных вирусов часть антигенов связана с нуклеокапсидом, а другая находится во внешней оболочке, или суперкапсиде.

Антигены многих вирусов отличаются высокой степенью изменчивости, что связано с постоянными мутациями в генетическом материале вирусов. Примером могут служить вирус гриппа, ВИЧ и др.

9.1.6. Процессы, происходящие с антигеном в макроорганизме

Антигенная интервенция — это процесс, протекающий поэтапно с определенной динамикой. При этом на каждом этапе появления и распространения в макроорганизме антиген сталкивается с мощным противодействием развитой сети разнообразных факторов иммунитета (табл. 9.1).

Таблица 9.1. Процессинг антигена в макроорганизме

Происхождение антигена	Входные ворота	Факторы иммунной защиты		Механизмы защиты	Исход
		врожденные	приобретенные		
Экзогенное. Эндогенное	Кожа. Слизистые оболочки. Желудочно-кишечный тракт. Дыхательные пути. Урогенитальный тракт. Кровь. Лимфа	Механические барьеры (кожа, слизистые оболочки). Физико-химические барьеры (ферменты, лизоцим, рН и др.). Биологические барьеры (фагоцитоз, комплемент, ИФН, защитные белки сыворотки крови и др.)	Антителообразование. Иммунный фагоцитоз. Киллерная функция лимфоцитов. ГЗТ. ГНТ. Толерантность. Иммуннологическая память	Инактивация. Деструкция. Элиминация антигена. Ареактивность	Восстановление гомеостаза. Формирование иммунологической памяти. Формирование иммунологической толерантности. Формирование аллергии

Выделяют несколько путей проникновения и распространения антигена в макроорганизме. Они могут появляться внутри самого макроорганизма (эндогенное происхождение) или поступать извне (экзогенное происхождение). Экзогенные антигены могут проникнуть в макроорганизм:

- через дефекты кожных покровов и слизистых оболочек (как результат ранений, микротравм, укусов насекомых, расчесов и др.);
- путем всасывания в желудочно-кишечном тракте (эндоцитоз эпителиальными клетками);
- межклеточно (при незавершенном фагоцитозе);

- чресклеточно (так распространяются облигатные внутриклеточные паразиты, например вирусы).

В организме антиген может распространяться с лимфой (лимфогенный путь) и кровью (гематогенный путь) по различным органам и тканям. При этом чаще всего он фильтруется в лимфатических узлах, селезенке, а также в лимфоидных скоплениях печени, кишечника и других органов, где вступает в контакт с факторами иммунной защиты.

Ответная реакция этих факторов возникает практически немедленно. Первыми вступают в действие факторы врожденного иммунитета, так как эта система не требует длительного времени для активации. Если антиген не был инактивирован или элиминирован в течение 4 ч, включается система приобретенного иммунитета: обеспечивается специфическое распознавание «свой—чужой», вырабатываются факторы регуляции (цитокины) и иммунной защиты (специфические антитела, клоны антигенореактивных лимфоцитов).

Совокупный эффект всех звеньев и уровней иммунной защиты макроорганизма, независимо от степени их вовлечения в процесс, направлен:

- на связывание и блокирование биологически активных участков молекулы антигена;
- разрушение или отторжение антигена;
- утилизацию, изоляцию (инкапсуляцию) или выведение остатков антигена из макроорганизма.

В итоге достигается восстановление гомеостаза и структурной целостности макроорганизма. Параллельно в целях профилактики повторного контакта формируются иммунологическая память, толерантность или аллергия.

9.2. ИММУННАЯ СИСТЕМА ЧЕЛОВЕКА

Специфическую функцию надзора за генетическим постоянством внутренней среды организма, сохранения его биологической и видовой индивидуальности осуществляет иммунная система.

9.2.1. Структурно-функциональные элементы иммунной системы

Иммунная система — это специализированная, анатомически обособленная лимфоидная ткань. Она распределена по всему организму в виде различных лимфоидных образований и отдельных клеток. На ее долю приходится 1–2% массы тела. В анатомическом плане иммун-

ная система подразделена на центральные и периферические органы, в функциональном — на органы воспроизводства и селекции клеток (костный мозг, тимус), контроля внешней среды или экзогенной интервенции (лимфоидные системы кожи и слизистых оболочек), контроля генетического постоянства внутренней среды (селезенка, лимфатические узлы, печень, кровь, лимфа).

Основными функциональными клетками являются лимфоциты. Их количество в организме достигает 10^{12} . К числу функциональных клеток иммунной системы относят также мононуклеарные и гранулярные лейкоциты, тучные и дендритные клетки. Часть клеток сосредоточена в отдельных органах иммунной системы, другие свободно перемещаются по всему организму. Схематическое строение иммунной системы представлено на рис. 9.3.

Центральные органы иммунной системы

Центральные органы иммунной системы — костный мозг и вилочковая железа, или тимус. Это органы воспроизводства и селекции клеток иммунной системы. Здесь происходят *лимфопоэз* — рождение, размножение (пролиферация) и дифференцировка лимфоцитов до стадии предшественников или зрелых неиммунных («наивных») клеток, а также их «обучение». У птиц к центральным органам иммунной системы относят сумку Фабрициуса (*bursa Fabricii*), локализованную в области клоаки.

Костный мозг располагается в губчатом веществе трубчатых (эпифизы) и плоских (грудина, ребра и др.) костей. Здесь находятся полипотентные стволовые клетки, которые являются родоначальницами всех форменных элементов крови, включая иммунокомпетентные клетки. В строме костного мозга формируются предшественники В- и Т-лимфоцитов, которые впоследствии мигрируют соответственно в В-зоны периферических тканей и тимус. Фагоциты и некоторые дендритные клетки также образуются в костном мозгу. В нем можно также обнаружить плазматические клетки — результат терминальной дифференцировки В-лимфоцитов.

Вилочковая железа (тимус), или *зобная железа*, располагается в верхней части за грудиного пространства. Этот орган отличается особым морфогенезом. К моменту рождения масса тимуса достигает 10–15 г, окончательно он созревает к 5-летнему возрасту, а максимального размера достигает к 10–12 годам жизни (масса 30–40 г). После периода полового созревания начинается инволюция органа — происходит замещение лимфоидной ткани жировой и соединительной.

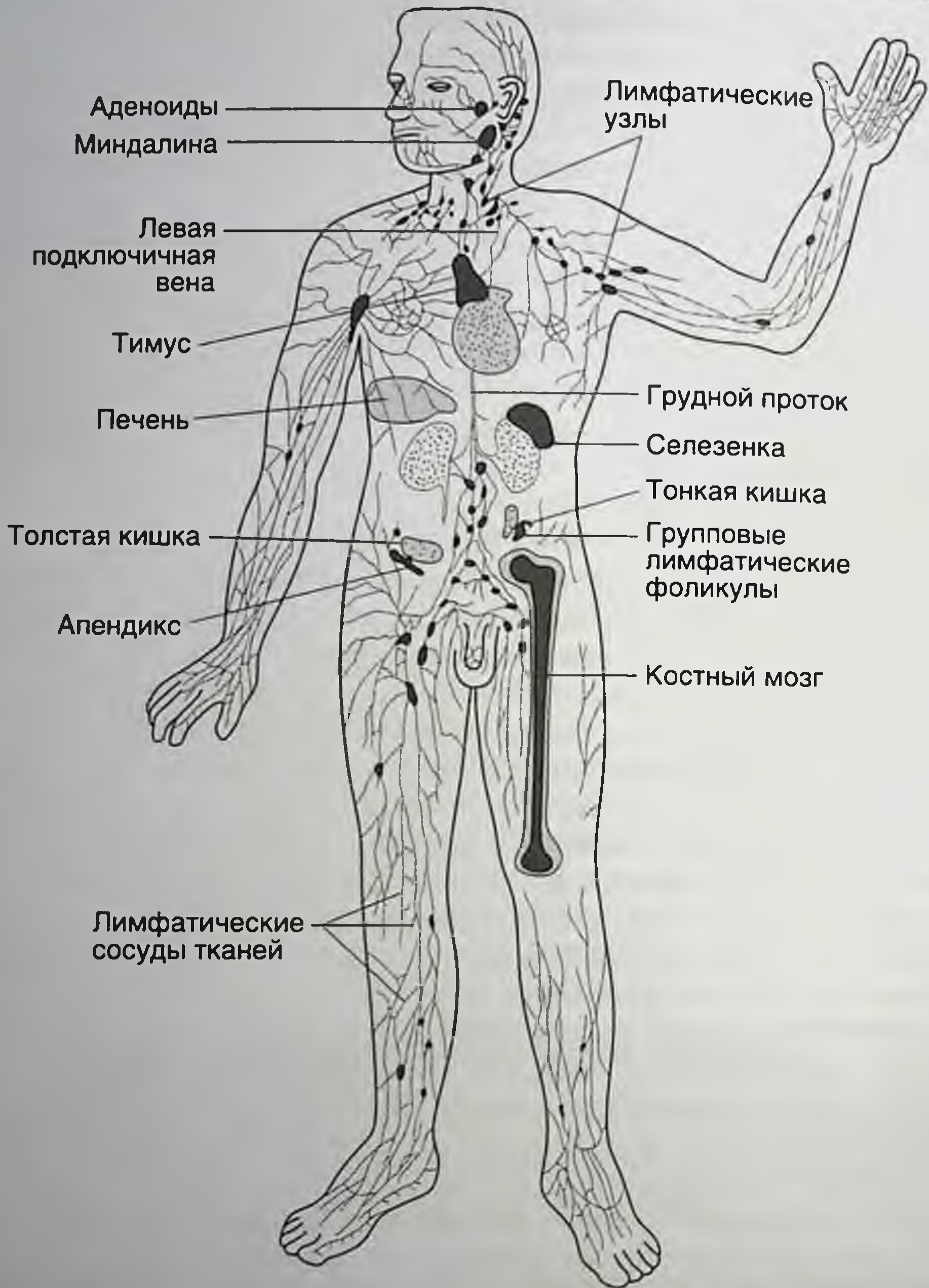


Рис. 9.3. Органы иммунной системы человека

Тимус имеет дольчатое строение. В его структуре различают мозговую и корковый слой. В строме коркового слоя находится большое количество эпителиальных клеток коры, названных «клетки-няньки», ко-

торые своими отростками образуют мелкочаеистую сеть, где располагаются созревающие лимфоциты. В пограничном, корково-мозговом, слое располагаются дендритные клетки тимуса, а в мозговом — эпителиальные клетки мозгового слоя.

Предшественники Т-лимфоцитов поступают из костного мозга в корковый слой тимуса. Здесь под влиянием тимических факторов они активно размножаются, дифференцируются (превращаются) в зрелые Т-лимфоциты и «учатся» распознавать чужеродные антигенные детерминанты.

Процесс «обучения» включает *положительную и отрицательную селекцию*. Критерием «обученности» являются качество Т-клеточной антигенной рецепции (специфичность и аффинность) и жизнеспособность клетки.

Положительная селекция происходит в корковом слое. Суть ее заключается в поддержке клонов Т-лимфоцитов, рецепторы которых эффективно связались с экспрессированными на эпителиальных клетках молекулами МНС, независимо от структуры инкорпорированных собственных олигопептидов. Эпителиоциты коры выделяют ростовые факторы тимуса, активирующие размножение Т-лимфоцитов. Ареактивные клетки погибают.

Отрицательную селекцию осуществляют дендритные клетки в пограничной корково-мозговой зоне тимуса. Ее цель — выбраковка аутореактивных клонов Т-лимфоцитов. Клетки, позитивно реагирующие на комплекс «МНС — аутологичный пептид», подвергаются уничтожению путем индукции у них апоптоза.

В итоге селекции более 99% Т-лимфоцитов не выдерживают испытаний и погибают. Лишь менее 1% клеток превращается в зрелые формы, способные распознать в комплексе с аутологичными МНС только чужеродные биополимеры. Ежедневно около 10^6 зрелых «обученных» Т-лимфоцитов покидают тимус с кровотоком и лимфотоком и мигрируют в различные органы и ткани.

Созревание и «обучение» Т-лимфоцитов в тимусе имеет большое значение для формирования иммунитета. Отсутствие или недоразвитие тимуса при врожденном дефекте развития вилочковой железы — аплазии или гипоплазии органа, ее хирургическом удалении или радиационном поражении, ведет к резкому снижению эффективности иммунной защиты макроорганизма. Между тем тимэктомиа у взрослых практически не приводит к серьезным дефектам в иммунитете.

Периферические органы иммунной системы

К периферическим органам иммунной системы относят селезенку, лимфатические узлы, аппендикс, печень, миндалины глоточного кольца, групповые лимфатические фолликулы, кровь, лимфу и др. В этих органах проходит *иммунопоз* — размножение и окончательное созревание предшественников иммунокомпетентных клеток, и осуществляется иммунологический надзор: происходят распознавание антигена и стимуляция иммунокомпетентных клеток, включается система специфического иммунного реагирования, направленная на обезвреживание чужеродного агента.

В функциональном плане периферические органы иммунной системы могут быть подразделены на органы контроля внутренней среды организма (лимфатические узлы, селезенка, тканевые мигрирующие клетки) и его кожных и слизистых покровов (аппендикс, лимфатические фолликулы и скопления).

Лимфатические узлы — мелкие округлые анатомические образования бобовидной формы, которые располагаются по ходу лимфатических сосудов. Каждый участок тела имеет региональные лимфатические узлы. В общей сложности в организме человека насчитывается до 1000 лимфатических узлов. Лимфатические узлы выполняют функцию биологического сита — через них фильтруется лимфа и задерживаются и концентрируются антигены. Через лимфатический узел проходит в среднем около 10^9 лимфоцитов в 1 ч.

В строении лимфатического узла различают корковое и мозговое вещество. Строма коры разделена соединительнотканными трабекулами на сектора. В ней выделяют поверхностный корковый слой и паракортикальную зону. В секторах поверхностного коркового слоя расположены лимфатические фолликулы с центрами размножения В-лимфоцитов (герминативные центры). Здесь же обнаруживаются фолликулярные дендритные клетки, способствующие созреванию В-лимфоцитов. Паракортикальный слой — это зона Т-лимфоцитов и интердигитальных дендритных клеток, потомков дермальных клеток Лангерганса. Мозговое вещество образовано тяжами соединительной ткани, между которыми располагаются макрофаги и плазматические клетки.

Селезенка — это орган, через который фильтруется вся кровь. Он располагается в левой подвздошной области и имеет дольчатое строение. Лимфоидная ткань образует белую пульпу. В строении различают первичные, периартериальные лимфоидные фолликулы (окружают артерии по их ходу) и вторичные, располагающиеся на границах первич-

ных фолликулов. Первичные лимфоидные скопления заселены преимущественно Т-лимфоцитами, а вторичные — В-лимфоцитами и плазматическими клетками. Кроме того, в строме селезенки обнаруживают фагоциты и ретикулярные дендритные клетки. В селезенке, как в селе, задерживаются антигены, оказавшиеся в кровотоке, и состарившиеся эритроциты. Этот орган называют кладбищем эритроцитов.

Печень играет особую роль в иммунной системе. В ней находятся более половины всех тканевых макрофагов и большая часть естественных киллеров. Лимфоидные популяции печени обеспечивают толерантность к пищевым антигенам, а макрофаги утилизируют иммунные комплексы, в том числе сорбированные на стареющих эритроцитах.

Групповые лимфатические фолликулы (пейеровы бляшки) являются скоплением лимфоидной ткани в слизистой оболочке тонкой кишки. Такие образования также находятся в червеобразном отростке слепой кишки — аппендиксе. Кроме того, на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, начиная с пищевода и кончая анальным отверстием, располагаются единичные лимфатические фолликулы. Они обеспечивают местный иммунитет слизистой оболочки кишки и ее просвета и регулируют видовой и количественный состав ее нормальной микрофлоры.

Скопление лимфоидных элементов в виде *миндалин глоточного кольца* обеспечивает местный иммунитет в носоглотке, ротовой полости и верхних дыхательных путях, защищает их слизистые оболочки от внедрения микробов и других генетически чужеродных агентов, передаваемых воздушно-капельным или воздушно-пылевым путем, и регулирует локальную нормофлору.

Лимфа — жидкая ткань организма, которая содержится в лимфатических сосудах и узлах. Она включает в себя все соединения, поступающие из межтканевой жидкости. Основными и практически единственными клетками лимфы являются лимфоциты, которые таким образом осуществляют кругооборот в организме.

В *крови* циркулируют предшественники и зрелые Т- и В-лимфоциты, полиморфноядерные лейкоциты, моноциты. Лимфоциты составляют 30% общего количества лейкоцитов. Одновременно в крови присутствует менее 2% общего количества лимфоцитов.

Клетки иммунной системы

Специфическую функцию иммунной защиты непосредственно осуществляет многочисленный пул клеток миелоидного и лимфоидного

ростков крови: лимфоциты, фагоциты и дендритные клетки. Это основные клетки иммунной системы. Кроме них, в иммунный ответ может вовлекаться множество других клеточных популяций (эпителий, эндотелий, фибробласты и др.). Перечисленные клетки различаются морфологически, по функциональной активности, маркерам (специфические молекулярные метки), рецепторному аппарату и продуктам биосинтеза. Тем не менее большую часть клеток иммунной системы объединяет близкое генетическое родство: они имеют общего предшественника, полипотентную стволовую клетку костного мозга (рис. 9.4).

На поверхности цитоплазматической мембраны клеток иммунной системы существуют особые молекулы, которые служат их маркерами. В 1980-х годах была принята международная номенклатура мембранных маркеров лейкоцитов человека, названных «CD-антигены» (табл. 9.2).

По функциональной активности клетки-участники иммунного ответа подразделяют на регуляторные, эффекторные и антигенпрезентирующие.

- *Регуляторные* клетки управляют функционированием компонентов иммунной системы путем выработки иммуоцитокинов и лигандов. Эти клетки определяют направление развития иммунного реагирования, его интенсивность и продолжительность.



Рис. 9.4. Схема иммуногенеза (см. пояснения в тексте)

Таблица 9.2. Основные CD-маркеры клеток, участвующих в иммунном ответе

CD-маркер	Тип клеток	Функция
CD1	T-лимфоцит	Молекула МНС I класса, связанная с β -микроглобулином, участвует в представлении антигена
CD2	T-лимфоцит	Осуществляет адгезию цитотоксических T-лимфоцитов к клеткам-мишеням, T-лимфоцитов к эндотелию, тимоцитов к тимическим эпителиальным клеткам
CD3	T-лимфоцит	Молекулы, ассоциированные с рецептором T-лимфоцитов. Участвуют в проведении сигнала от рецептора путем активации цитоплазматической тирозинкиназы. Маркер абсолютного большинства всех зрелых T-лимфоцитов
CD4	T-лимфоцит	Маркер T-хелперов. Корецептор для T-клеточного рецептора
CD5	T- и B-лимфоциты	Маркер B1-лимфоцитов
CD8	T-лимфоцит	Маркер цитотоксических T-лимфоцитов. Корецептор для T-клеточного рецептора
CD11d	Лейкоциты	α D-субъединица интегрин α , связанная с CD18
CD14	Моноциты	Рецептор для ЛПС
CD16	Естественный киллер	Участвуют в АЗКЦТ. Является Fc-рецептором
CD18	Лейкоциты	Интегрин R, вовлекаемый в процесс взаимодействия между клетками и клеток с матриксом
CD19	B-лимфоцит	Корецептор для B-клеточного иммунорецептора
CD20	B-лимфоцит	Регулирует активацию B-клеток, формируя кальциевые каналы
CD21	Зрелые B-лимфоциты	Корецептор для B-клеточного иммунорецептора. Рецептор для C3d-компонента комплекса и вируса Эпштейна–Барр
CD22	B-лимфоцит	Маркер зрелых B-лимфоцитов Осуществляет адгезию B-клеток к эритроцитам, T-клеткам, моноцитам и нейтрофилам
CD25	T-лимфоцит	Маркер активированного лимфоцита. Рецептор для ИЛ-2

Окончание табл. 9.2

CD-маркер	Тип клеток	Функция
CD28	Т-лимфоцит	Рецептор Т-хелпера для взаимодействия с костимулирующим фактором (CD80/86) АЗКЦТ
CD30	Активированные Т- и В-лимфоциты, естественный киллер и моноциты	Усиливает пролиферацию Т- и В-клеток после связывания с лигандом
CD40	В-лимфоцит	Участвует в В-клеточной активации, пролиферации и дифференцировке после связывания CD40-лиганда
CD56	Естественный киллер	Активация цитотоксичности и цитокиновой продукции
CD64	Моноциты, макрофаги	Высокоаффинный рецептор для IgG (IgG ³ > IgG ¹ , > IgG ⁴ >>> IgG ²)
CD94	Естественный киллер	Ингибция/активация цитотоксичности естественных киллеров
CD95	Разные клетки	Маркер апоптоза клетки

- *Эффекторы* являются непосредственными исполнителями иммунной защиты путем прямого воздействия на объект либо биосинтеза биологически активных веществ со специфическим эффектом (антитела, токсичные субстанции, медиаторы и пр.).
- *АЗКЦТ* выполняют ответственную задачу: захватывают, процессируют (перерабатывают путем ограниченного протеолиза) и представляют антиген Т-хелперам в составе комплекса с МНС II класса. АЗКЦТ лишены специфичности в отношении самого антигена. Молекула МНС II класса может включать в себя любые эндоцитированные из межклеточной среды олигопептиды, как свои собственные, так и чужие. Для презентации липоидных или полисахаридных антигенов АЗКЦТ экспрессируют CD1. Установлено, что большая часть комплексов МНС II класса содержит аутогенные молекулы и лишь малая доля — чужеродный материал.

Помимо МНС II класса, АЗКЦТ экспрессируют костимулирующие факторы (CD40, 80, 86) и множество молекул адгезии. Последние обеспечивают тесный, пространственно стабильный и продолжительный контакт АЗКЦТ с Т-хелпером.

Основными профессиональными АЗКЦТ являются дендритные клетки костномозгового происхождения, В-лимфоциты и макрофаги. Дендритные клетки почти в 100 раз эффективнее макрофагов, однако

последние могут запускать *первичный иммунный ответ*. Функцию непрофессиональных АЗКЦТ могут также выполнять некоторые другие клетки в состоянии стресса — эпителиальные клетки и эндотелиоциты.

Осуществление целенаправленной иммунной защиты макроорганизма возможно благодаря наличию на клетках иммунной системы специфических антигенных рецепторов (иммунорецепторов). По механизму функционирования они подразделяются на прямые и непрямые. *Прямые иммунорецепторы* непосредственно связываются с молекулой антигена. *Непрямые иммунорецепторы* взаимодействуют с молекулой антигена опосредованно — через Fc-фрагмент молекулы иммуноглобулина (см. раздел 10.1.2). Это так называемый *Fc-рецептор (FcR)*.

Fc-рецепторы различаются по аффинности. Высокоаффинный рецептор может связываться с интактными молекулами IgE или IgG4 и образовывать рецепторный комплекс, в котором антигенспецифическую функцию выполняет молекула иммуноглобулина. Такой вид рецептора есть у базофилов и тучных клеток. Низкоаффинный *FcR* распознает молекулы иммуноглобулина, уже связанные в иммунные комплексы. Он обнаруживается на макрофагах, естественных киллерах, эпителиальных, дендритных и множестве других клеток.

Иммунное реагирование основано на тесном взаимодействии различных клеточных популяций. Это достигается с помощью непосредственного контакта либо биосинтеза широкого спектра иммуоцитокинов. Подавляющее большинство клеток иммунной системы постоянно перемещается во внутренних средах организма с крово- и лимфотоком и благодаря амебоидной подвижности.

Клеточно-элементный состав иммунной системы постоянно возобновляется за счет деления стволовых клеток. Состарившиеся, выработавшие свой биологический ресурс, ложно активированные, зараженные и генетически трансформированные клетки уничтожаются.

Лимфоциты

Лимфоциты — подвижные мононуклеарные клетки. В зависимости от места созревания эти клетки подразделяются на две популяции: Т- (тимус) и В- (костный мозг) *лимфоцитов*. Лимфоциты играют ключевую роль в обеспечении приобретенного (адаптивного) иммунитета. Они осуществляют специфическое распознавание антигена, индукцию клеточного и гуморального иммунного ответа, различные формы иммунного реагирования.

В организме непрерывно идет возобновление популяций лимфоцитов, клетки активно мигрируют между различными органами и тканями. Вместе с тем миграция и расселение лимфоцитов в тканях не являются хаотическим процессом. Он имеет направленный характер и строго регулируется экспрессией на мембране лимфоцитов, эндотелии сосудов и клеточных элементах стромы особых молекул адгезии (интегрины, селектины и др.). Так, незрелые Т-лимфоциты активно мигрируют в тимус. Зрелые неиммунные («наивные») В-лимфоциты тропны к периферическим лимфоидным органам и тканям. При этом Т- и В-лимфоциты заселяют только «свои» области — это так называемый *эффект хоминговой рецепции* (от англ. *home* — дом). Зрелые иммунные (активированные) лимфоциты распознают эпителий в очаге воспаления. Клетки иммунологической памяти всегда возвращаются в места своего происхождения.

Продолжительность жизни неиммунных лимфоцитов достаточно большая. У Т-лимфоцитов она достигает нескольких месяцев или лет, а у В-клеток — недель или месяцев. Дольше всех живут клетки иммунологической памяти (см. раздел 10.5) — до 10 лет и более. Однако активированные или терминально дифференцированные лимфоциты имеют короткую продолжительность жизни (несколько суток). Состарившиеся, ложно активированные и аутореактивные (реагирующие на аутоантигены) лимфоциты подвергаются уничтожению путем индукции апоптоза. Погибшие лимфоциты постоянно заменяются новыми за счет их пролиферации в центральных и периферических органах иммунной системы. Численность лимфоидных популяций находится под жестким контролем клеток самой иммунной системы.

Для выполнения специфической функции лимфоциты несут на своей поверхности прямые антигенные рецепторы и являются иммунокомпетентными клетками. Иммунорецептор В-лимфоцита и особого уδТ-лимфоцита непосредственно распознает эпитоп чужеродного агента. Иммунорецептор Т-киллера ориентирован на олигопептиды в составе МНС и распознает «чужое».

Антигенспецифические рецепторы лимфоцитов имеют сложное молекулярное строение, уникальное для каждой клетки. Например, у Т-лимфоцитов они состоят из нескольких полипептидных субъединиц, каждая из которых имеет полигенное кодирование. Число генов, детерминирующих структуру V-области этого рецептора (вариабельный участок, ответственный за специфическое распознавание), в незрелой клетке достигает 100. При созревании лимфоцита в результате реком-

бинационных перестроек в V-генах, индивидуальных для каждой клетки, образуется бесконечно большое количество вариантов антигенной специфичности рецептора, достигающее 10^{12} , что сопоставимо с общей численностью популяции T-лимфоцитов. Формирование B-клеточного рецептора имеет те же закономерности. Биологический смысл феномена чрезвычайно важен: в организме постоянно поддерживается широкий репертуар специфичностей лимфоидных рецепторов, и клетки готовы в любой момент ответить защитной реакцией на любой возможный вариант антигена.

В такой ситуации закономерно появление T-лимфоцитов, специфичных для антигенов собственного организма. Однако они элиминируются в тимусе на ранних этапах своего развития. Поэтому различают *первичный* и *вторичный антигенраспознающий репертуар* T-лимфоидных популяций. Первичный характеризуется набором рецепторных специфичностей, формирующимся при образовании лимфоцитов в костном мозге индивидуума. Вторичный репертуар является совокупностью вариантов рецептора после отбраковки аутореактивных клонов клеток.

Антигенспецифическая рецепция в лимфоцитах имеет стандартные механизмы реализации. Для запуска продуктивной реакции лимфоцита необходима агрегация его рецепторов. Кроме того, для стабилизации рецептор-лигандного взаимодействия и восприятия костимулирующего сигнала требуются вспомогательные молекулы. Полученный внеклеточной частью рецептора сигнал от раздражителя (антигена) передается по трансмембранному участку на его внутриклеточную часть, которая уже активирует внутриклеточные ферменты (тирозинкиназу, фосфоорилазу и др.).

Среди лимфоцитов встречаются клетки без отличительных признаков T- и B-лимфоцитов. Они получили название *нулевых клеток*. В костном мозге на их долю приходится около 50% всех лимфоцитов, а в крови — примерно 5%. Функциональная активность остается неясной.

B-лимфоциты. B-лимфоциты — это преимущественно эффекторные иммунокомпетентные клетки, на долю которых приходится около 15% всей численности лимфоцитов. Выделяют две субпопуляции B-лимфоцитов: традиционные B-клетки, не имеющие маркера CD5⁻, и CD5⁺ B1-лимфоциты.

При электронной микроскопии CD5⁻ B-лимфоциты имеют шероховатую поверхность, на ней определяются CD19–22 и некоторые другие. Функцию антигенспецифического рецептора (BCR) выполняют особые мембраноассоциированные формы иммуноглобулинов. Клетки

экспрессируют МНС II класса, костимулирующие молекулы CD40, -80, -86, *FcR* к иммунным комплексам и нативным молекулам иммуноглобулина класса G, рецептор к эритроцитам мыши, иммуноцитокинам и др.

Функцией CD5⁺ В-лимфоцитов и их потомков (плазмоцитов) является продукция иммуноглобулинов. Кроме того, В-лимфоциты являются профессиональными АЗКЦТ. Они участвуют в формировании гуморального иммунитета, В-клеточной иммунологической памяти и ГНТ.

Дифференцировка и созревание В-лимфоцитов (рис. 9.5) происходят сначала в костном мозге, а затем в периферических органах иммунной системы, куда они отселяются на стадии предшественников. Потомками В-лимфоцитов считаются клетки иммунологической памяти и плазматические клетки. Основные морфологические признаки последних — развитый эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи с большим количеством рибосом. Плазмоцит имеет короткий период

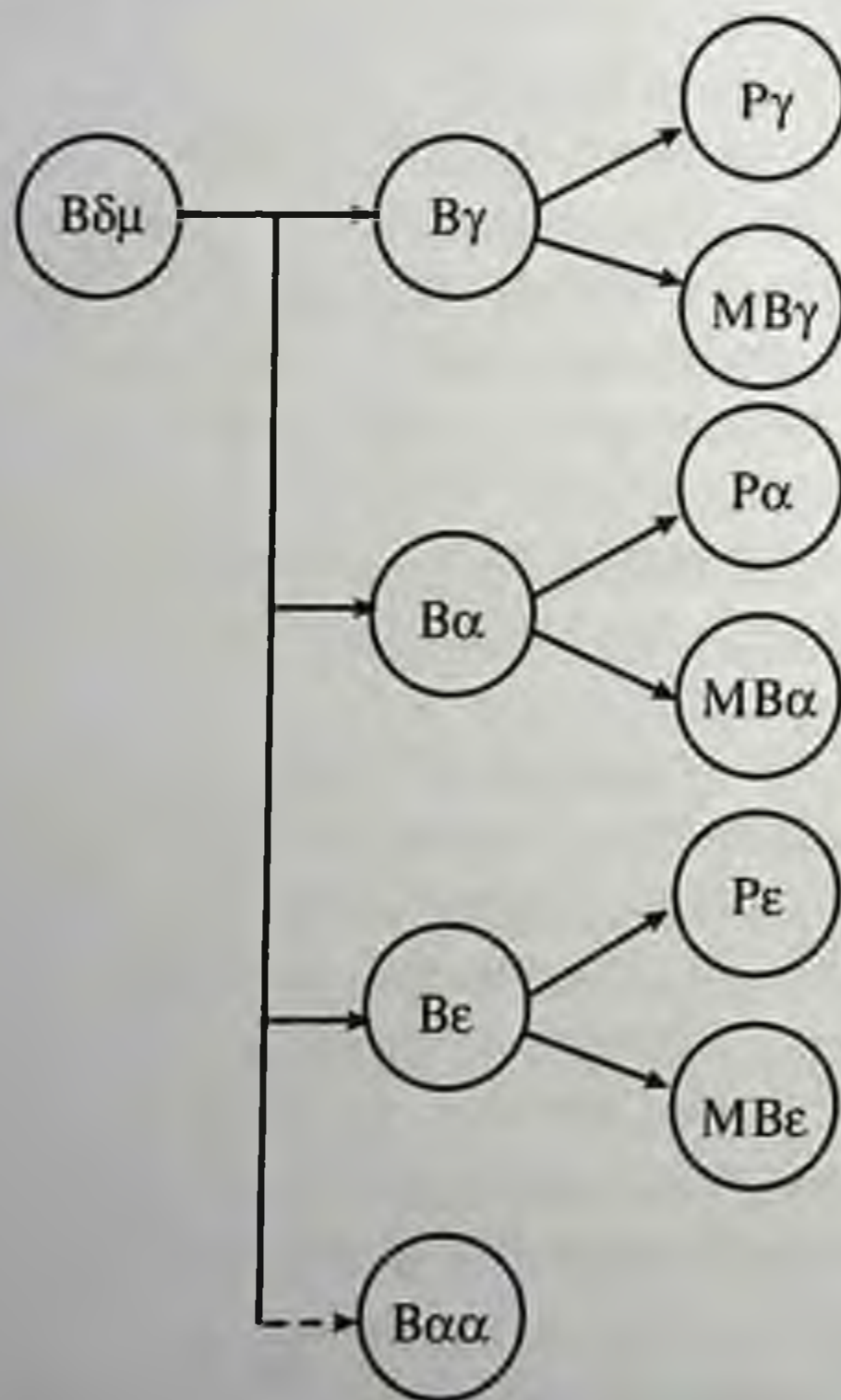


Рис. 9.5. Схема дифференцировки В-лимфоцита: Р — плазматическая клетка; МВ — В-лимфоцит иммунологической памяти; В $\alpha\alpha$ — синтезирует полимерный иммуноглобулин А в слизистых оболочках

жизни — не более 2–3 сут, и высокий темп биосинтеза иммуноглобулинов.

В1-лимфоциты считают филогенетически наиболее древней ветвью антителопродуцирующих клеток. Предшественники этих клеток в эмбриональном периоде мигрируют в ткани слизистых оболочек, где автономно от центральных органов иммунной системы поддерживают численность своей популяции. Клетки экспрессируют CD5, синтезируют низкоаффинные IgA и IgM к полисахаридным и липидным антигенам микробов и обеспечивают иммунную защиту слизистых оболочек от условно-патогенных бактерий.

Функциональной активностью В-лимфоцитов управляют молекулярные антигены и иммуноцитокينات Т-хелпера, макрофага и других клеток.

Т-лимфоциты. *Т-лимфоциты* — это сложная по составу группа клеток, которая происходит от полипотентной стволовой клетки костного мозга, а созревает и дифференцируется в тимусе из предшественников. На долю этих клеток приходится около 75% всей лимфоидной популяции. На электронограмме все Т-лимфоциты имеют гладкую поверхность, их общим маркером являются CD3, а также рецептор к эритроцитам барана. В зависимости от строения антигенного рецептора (*TCR*) и функциональной направленности сообщество Т-лимфоцитов может быть разделено на группы.

Различают два типа *TCR*: $\alpha\beta$ и $\gamma\delta$. Первый тип — гетеродимер, который состоит из двух полипептидных цепей — α и β . Он характерен для традиционных Т-лимфоцитов, известных как Т-хелперы и Т-киллеры. Второй обнаруживается на поверхности особой популяции $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов.

Т-лимфоциты функционально также разделяются на две субпопуляции: иммунорегуляторов и эффекторов. Задачу регуляции иммунного ответа (активацию или торможение) выполняют Т-хелперы. Эффекторную функцию осуществляют цитотоксические лимфоциты Т-киллеры.

В организме Т-лимфоциты обеспечивают клеточные формы иммунного ответа (ГЗТ, трансплантационный иммунитет и т.д.), определяют силу и продолжительность иммунной реакции. Их созреванием, дифференцировкой и активностью управляют цитокины и макрофаги.

Т-хелперы. Т-хелперы или Т-помощники — субпопуляция Т-лимфоцитов, которые выполняют регуляторную функцию. На их долю приходится около 75% всей популяции Т-лимфоцитов. Они несут маркер CD4, а также $\alpha\beta$ TCR, с помощью которого анализируют природу антигена, представляемую им АЗКЦТ.

Рецепция антигена Т-хелпером, то есть анализ его чужеродности, — весьма сложный процесс, требующий высокой точности. Ему способствуют (рис. 9.6) молекула CD3 (комплексируется с TCR), ко-рецепторные молекулы CD4 (имеют сродство к молекулярному комплексу МНС II класса), молекулы адгезии (стабилизируют межклеточный контакт), рецепторы (взаимодействуют с костимулирующими факторами АЗКЦТ — CD28, 40L).

Активированный Т-хелпер продуцирует широкий спектр иммуноцитоклинов, с помощью которых он управляет биологической активностью множества клеток, вовлеченных в иммунный ответ.

Популяция Т-хелперов гетерогенна по функциональной активности и спектру синтезируемых цитокинов. В настоящий момент различают:

- T_0 -хелпер — считается родоначальником. Это «наивная» клетка, которая в зависимости от варианта цитокинового стимула превращается в одну из «специализированных» клеток (рис. 9.7);
- T_1 -хелпер — активирует Т-киллеры и способствует развитию преимущественно клеточной формы иммунного ответа. Основной вырабатываемый им цитокин — ИФН- γ ;
- T_2 -хелпер — активирует В-лимфоциты и способствует развитию гуморального иммунного ответа, синтезирует ИЛ-4, -5 и -13;
- T_3 -хелпер — несет на поверхности маркер CD25, вырабатывает ИЛ-10 и ТФР- β , способен супрессировать иммунный ответ;
- T_{17} -хелпер — продуцирует ИЛ-17 и участвует в развитии аутоиммунных процессов;
- T_{22} -хелпер — продуцирует ИЛ-22, ассоциируется с воспалительными поражениями кожных покровов, в том числе микозами.

В организме поддерживается баланс видов хелперов, который необходим для развития адекватного иммунного ответа. Так, установле-

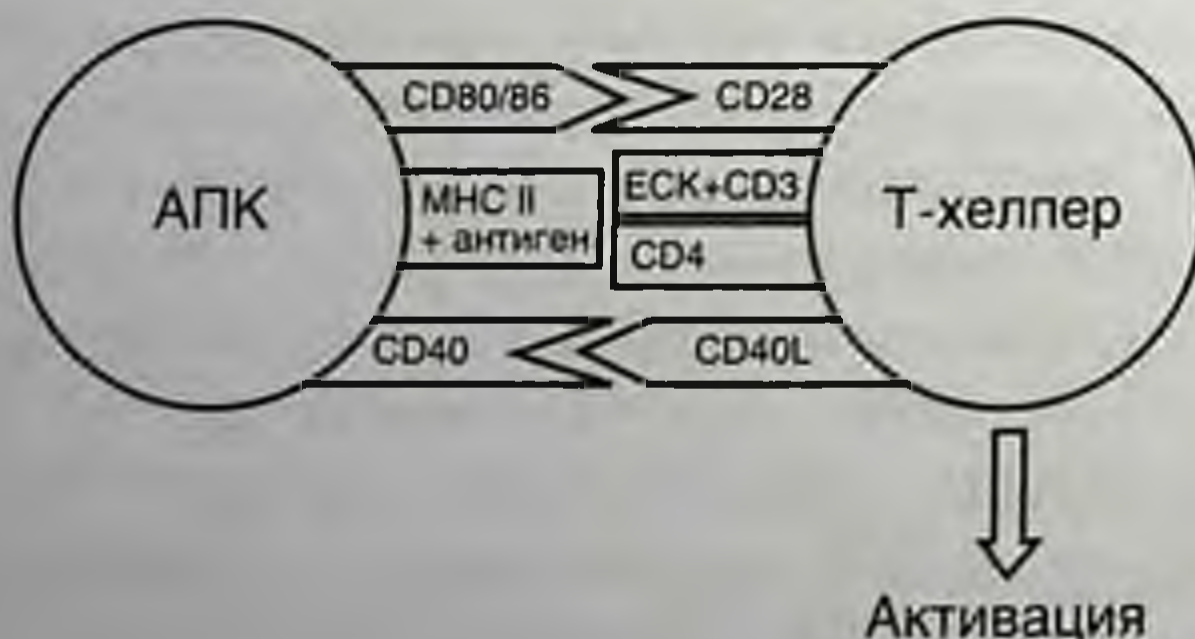


Рис. 9.6. Схема активации Т-хелпера (см. пояснение в тексте)

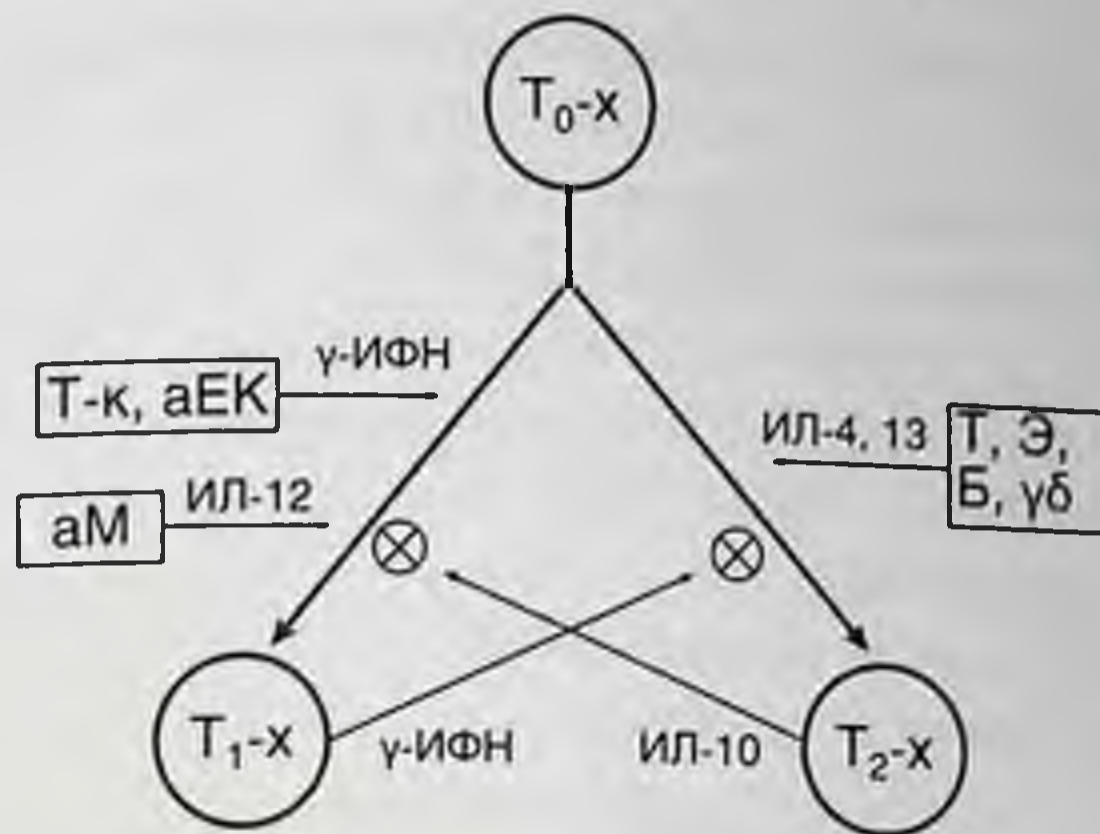


Рис. 9.7. Схема одного из вариантов дифференцировки Т-хелпера: Т-х — Т-хелпер; аМ — активированный макрофаг; Т-к — Т-киллер; аЕК — активированный естественный киллер; Э — эозинофил; Б — базофил; Т — тучная клетка; $\gamma\delta T$ — $\gamma\delta T$ -лимфоцит

но, что T_1 - и T_2 -хелперы являются антагонистами и тормозят развитие друг друга. В организме новорожденных, например, преобладают T_2 -хелперы. Нарушение заселения желудочно-кишечного тракта нормальной микрофлорой тормозит развитие субпопуляции T_1 -хелперов и ведет к аллергизации организма.

Т-киллеры (цитотоксические Т-лимфоциты). Т-киллер — субпопуляция Т-лимфоцитов-эффекторов, на долю которых приходится примерно 25% всех Т-лимфоцитов. На поверхности Т-киллера определяются молекулы CD8, а также $\alpha\beta TCR$ к антигену в комплексе с МНС I класса, по которому «свои» клетки отличаются от «чужих». В рецепции принимают участие молекула CD3, комплексирующая с TCR , и корцепторные молекулы CD8, тропные к МНС I класса (рис. 9.8).

Т-киллер анализирует поверхность клеток в поисках чужеродного МНС I класса. Его мишенью являются мутантные или зараженные вирусом клетки и аллогенный трансплантат.

Т-киллер устраняет клетки-мишени путем антителонезависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (см. раздел 10.3.2), для чего синтезирует ряд токсичных субстанций: перфорин, гранзимы и гранулизин.

- **Перфорин** — токсичный белок, обладает неспецифическим действием. Перфорин образуется в виде растворимого белка-предшественника и накапливается в цитоплазме в гранулах, которые сосредоточиваются около TCR , связавшегося с клеткой-мишенью,

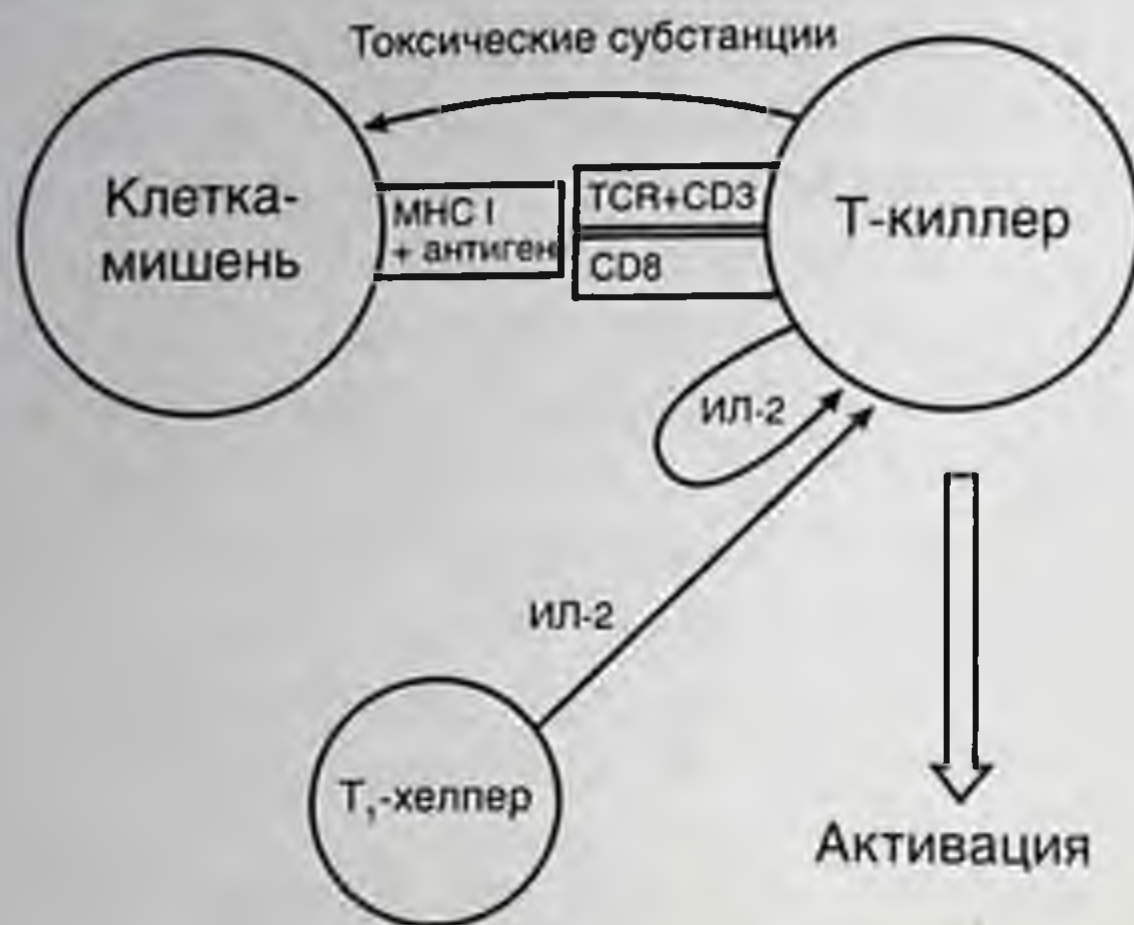


Рис. 9.8. Схема активации Т-киллера (пояснения в тексте)

для обеспечения локального, адресного поражения клетки-мишени. Содержимое гранул высвобождается в узкую синаптическую щель, образованную тесным контактом цитотоксического лимфоцита и клетки-мишени. За счет гидрофобных участков перфорин встраивается в цитоплазматическую мембрану клетки-мишени, где в присутствии ионов Ca^{2+} полимеризуется в трансмембранную пору диаметром 16 нм. Образовавшийся канал может вызвать осмотический лизис клетки-мишени (некроз) и/или обеспечить проникновение в нее гранзимов и гранулизина.

- **Гранзимы** — это обобщающее название сериновых протеаз. Различают три типа гранзимов: А, В и С. После синтеза гранзимы накапливаются в гранулах подобно перфोरину и вместе с ним выделяются из клетки в синаптическую щель. В клетку-мишень проникают через поры, образованные перфорином. Мишенью для гранзимов являются внутриклеточные ферменты, инициирующие апоптоз и обладающие широкой нуклеазной активностью, в том числе способностью разрушать нуклеиновые кислоты внутриклеточных паразитов. Таким образом, гранзимы индуцируют гибель клетки путем апоптоза и санацию организма от зараженных клеток.
- **Гранулизин** — эффекторная молекула с ферментативной активностью. Способен запускать в клетках-мишенях апоптоз, повреждая мембрану их митохондрий.

Т-киллер обладает огромным биологическим потенциалом — его называют «серийный убийца». За короткий срок он может уничтожить

несколько клеток-мишеней, затрачивая на каждую около 5 мин. Эффекторную функцию Т-киллера стимулирует T_H -хелпер, хотя в ряде случаев его помощь не требуется. Помимо эффекторной функции, активированный Т-киллер синтезирует ИФН- γ и ФНО, стимулирующие макрофаг и потенцирующие иммунное воспаление.

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты. Среди Т-лимфоцитов существует малочисленная популяция клеток с фенотипом $CD4-CD8-$, которые несут на своей поверхности особый *TCR* $\gamma\delta$ -типа — $\gamma\delta$ Т-лимфоциты. Локализуются в эпидермисе и слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. Их общая численность не превышает 1% общего пула Т-лимфоцитов, однако в покровных тканях она может достигать 10%.

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты происходят из автономного ростка стволовых клеток, мигрировавших в покровные ткани на ранних этапах эмбриогенеза. В созревании минуют тимус. Активируются клетками поврежденного эпителия желудочно-кишечного тракта и эпидермиса, размножение усиливается ИЛ-7.

Антигенный рецептор $\gamma\delta$ Т-лимфоцита сходен с *BCR*, его активный центр непосредственно связывается с эпитопом антигена без его предварительного процессинга и участия МНС. Антигенные детерминанты могут быть представлены, например, молекулами *CD1*. $\gamma\delta$ TCR ориентированы на распознавание некоторых широко распространенных микробных антигенов (липопротеинов, белков теплового шока, бактериальных суперантигенов и др.).

$\gamma\delta$ Т-лимфоциты могут быть как эффекторными, цитотоксическими клетками (принимают участие в удалении патогенов на ранних этапах антиинфекционной защиты), так и регуляторами иммунореактивности. Синтезируют цитокины, активирующие местный иммунитет и локальную воспалительную реакцию, в том числе усиливают образование T_H -хелперов. Кроме того, $\gamma\delta$ -клетки продуцируют ИЛ-7 и управляют численностью собственной популяции.

Другие клетки иммунной системы

Помимо лимфоцитов, в развитии иммунного ответа участвует множество различных клеточных популяций, относящихся в основном к миелоидному ростку. Особого внимания заслуживают естественные киллеры, гранулоциты, тучные и дендритные клетки.

Естественные, или нормальные, киллеры были изначально описаны как большие гранулярные лимфоциты, способные распознать в организме некоторые виды раково-трансформированных клеток и унич-

тожить их без предварительной подготовки, что обусловило название клеток.

Сейчас установлено, что естественные киллеры (ЕК) имеют морфологию малых лимфоцитов, на долю которых приходится около 15% всех лимфоцитов. Они образуются из полипотентных стволовых клеток костного мозга, мигрируют с кровотоком, но отсутствуют в лимфе. Обнаруживаются в печени, селезенке, слизистых оболочках, матке.

По маркерам, местам типичной локализации и эффекторным механизмам выделяют две субпопуляции естественных киллеров: кровяную и тканевую.

Кровяные естественные киллеры — это активно циркулирующие в кровотоке клетки. Обнаруживаются в красной пульпе селезенки. Несут на себе маркер $CD16^+CD56^{\text{мало}}$, FcR к иммуноглобулину класса G, связанному в иммунный комплекс, и рецептор к МНС I класса. При активации синтезируют, накапливая в гранулах, перфорин, гранзимы и гранулизин. Эффекторная функция кровяных естественных киллеров в отношении меченных иммуноглобулинами клеток реализуется в АЗКЦТ (см. раздел 11.3.1). Мишенями являются клетки, инфицированные внутриклеточными паразитами (бактерии, вирусы, простейшие), аллогенные клетки трансплантата и некоторые опухоли.

Рецептор к МНС I класса анализирует плотность его экспрессии на мембране клетки. Дефицит этих молекул, наблюдаемый при раковой трансформации клеток, также потенцирует цитотоксичность естественных киллеров.

Тканевые естественные киллеры ведут более оседлый образ жизни и обнаруживаются в большом количестве в печени и децидуальной оболочке беременной матки. Несут маркер $CD16-56^{\text{много}}$ и много Fas-лиганда. Реализуют антителонезависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (см. раздел 11.3.2). Клетками-мишенями являются лимфоциты, активированные, например, пищевыми антигенами или аллоантигенами плода и экспрессирующие *Fas*.

Помимо цитотоксических функций, естественные киллеры вырабатывают цитокины (ИЛ-5, -8, ИФН- γ , ФНО, ГМ-КСФ — гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор и др.), активируют макрофагально-фагоцитарное звено, развитие иммунного ответа и иммунного воспаления. Эффекторная функция естественных киллеров усиливается цитокинами (ИЛ-2, -4, -10, -12, ИФН- γ и др.).

Макрофаги (см. раздел 8.2.3.1) — самая многочисленная морфологически гетерогенная фракция иммунокомпетентных клеток. Выполняют

регуляторную и эффекторную функции. Вырабатывают иммуоцитокины, ферменты, ион-радикалы и другие биологически активные вещества, осуществляют вне- и внутриклеточный киллинг и фагоцитоз. Кроме того, макрофаги являются АЗКЦТ — обеспечивают процессинг и презентацию антигена Т-хелперам.

Эозинофилы — гранулярные лейкоциты крови. Содержатся в крови, рыхлой соединительной ткани, в большом количестве накапливаются в очагах местного воспаления, вызванного гельминтами, и обеспечивают АЗКЦТ.

Эозинофилы несут на мембране низкоаффинные FcR к IgA или IgE, распознающие паразитов, отмеченных такими антителами. Активированная клетка выделяет ферменты (эозинофильная пероксидаза и коллагеназа) и белковые токсины (главный щелочной протеин, эозинофильный катионный белок и нейротоксин), губительно действующие на гельминты.

Эозинофилы также синтезируют цитокины (ИЛ-3, -5, -8, гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор и др.), стимулирующие клеточное звено иммунитета и образование T_2 -хелпера, и липидные медиаторы (лейкотриены, тромбоцитактивирующий фактор и др.), запускающие воспалительную реакцию в месте внедрения гельминта.

Тучные клетки — немигрирующие морфологические элементы неясного происхождения, располагаются оседло вдоль барьерных тканей (*lamina propria* слизистых оболочек, в подкожной соединительной ткани) и в соединительной ткани кровеносных сосудов. По набору синтезируемых биологически активных соединений и локализации выделяют две разновидности тучных клеток — клетки *слизистых оболочек* и *соединительной ткани*.

Базофилы — гранулоциты, происходящие из костномозговой полипотентной стволовой клетки и родственные эозинофилам. Их дифференцировка альтернативно определяется цитокинами. Постоянно мигрируют с кровотоком, привлекаются в очаг воспаления анафилоксинами (C3a, C4a и C5a) и задерживаются там с помощью соответствующих хоминговых рецепторов.

Базофил и тучная клетка синтезируют сходный набор биологически активных веществ. Вырабатывают, накапливая в гранулах, вазоактивные амины (гистамин у человека и серотонин у грызунов), сульфатированные глюкозаминогликаны (хондроитинсульфат, гепарин), ферменты (сериновые протеазы и др.), а также цитокин ФНО- α . Напрямую выделяют в межклеточное пространство лейкотриены (C4, D4, E4),

простагландины (*PGD2*, *PGE2*), цитокины (ИЛ-3, -4, -5, -13 и гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор) и фактор активации тромбоцитов.

На поверхности базофил и тучная клетка несут высокоаффинный *FcR* к IgE и IgG4. Образованный рецепторный комплекс специфически взаимодействует с эпитопом антигена/аллергена. Экспрессируют также низкоаффинный *FcR* к IgG в составе иммунного комплекса. Базофил и тучная клетка активируются аллергенами, анафилотоксинами, медиаторами активированных нейтрофилов, норадреналином, ингибируются иммунными комплексами.

Связывание аллергена с рецепторным комплексом вызывает дегрануляцию базофила и тучной клетки — залповый выброс биологически активных соединений, содержащихся в гранулах, в межклеточное пространство, которые вызывают развитие локального отека и доиммунного воспаления, а также ГНТ (аллергической реакции I типа).

Базофил и тучная клетка направляют дифференцировку Т-хелперов в сторону T_2 -субпопуляции и усиливают эозинофилогенез.

Дендритные клетки — отростчатые клетки костномозгового происхождения. Локализуются в лимфоидных органах и барьерных тканях. Экспрессируют на своей поверхности МНС II класса и костимулирующие факторы (CD40, 80, 86). Способны поглощать путем эндоцитоза, перерабатывать (процессировать) и представлять (презентировать) антиген Т-хелперам в комплексе с МНС II класса. Является наиболее активной АЗКЦТ. Из числа дендритных клеток хорошо известны клетки Лангерганса (в эпидермисе), интердигитальные клетки (в лимфатических узлах) и дендритные клетки тимуса.

9.2.2. Организация функционирования иммунной системы

Иммунная система имеет сложную организацию — для осуществления специфической функции задействовано множество различных клеточных популяций и растворимых факторов иммунитета. Клетки постоянно циркулируют в организме, погибают в процессе жизнедеятельности, воспроизводятся и клонируются.

В зависимости от конкретной потребности специфическая функция иммунной системы может быть активирована либо подавлена (супрессирована). Раздражителем (активирующим сигналом) является антиген. В развитии любого иммунного реагирования прослеживается каскад последовательно сменяющихся этапов.

Взаимодействие клеток иммунной системы

Необходимым условием функционирования иммунной системы является взаимодействие практически всех типов ее клеток, то есть *тесная межклеточная кооперация*. Для связи между собой клетки используют различные дистантные растворимые факторы или прямой контакт.

Синтез растворимых факторов является одним из универсальных способов коммутации клеток между собой. К таковым относятся цитокины (Cohen S., 1974). В настоящее время их известно более 30. Они представляют собой гетерогенное семейство разнообразных по структуре и функции небольших по размеру пептидов (около 30 kD), имеющих ряд общих свойств:

- как правило, цитокины не депонируются в клетке, а синтезируются после соответствующего стимула;
- для восприятия цитокинового сигнала клетка экспрессирует соответствующий рецептор, который может взаимодействовать с несколькими различными цитокинами;
- цитокины синтезируются клетками разных ростков, уровней и направлений дифференцировки;
- субпопуляции клеток иммунной системы различаются по спектру синтезируемых цитокинов и их рецепторов;
- цитокины обладают универсальностью, множественностью эффектов и синергизмом;
- цитокины могут воздействовать как на рядом расположенную клетку (паракринная регуляция), так и на сам продуцент (аутокринная регуляция);
- цитокиновая регуляция носит каскадный характер: активация клетки одним цитокином вызывает синтез другого;
- в подавляющем большинстве цитокины — короткодистантные медиаторы: их эффекты проявляются на месте выработки;
- ряд провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, -6, ФНО- α и др.) могут оказывать системное действие.

Цитокины различаются по ведущей функциональной направленности:

- медиаторы доиммунного воспаления (ИЛ-1, -6, -12, ФНО- α и др.);
- медиаторы иммунного воспаления (ИЛ-5, -9, -10, ИФН- α и др.);
- стимуляторы пролиферации и дифференцировки лимфоцитов (ИЛ-2, -4, -13, ТФР- β и др.);
- факторы роста клеток, или колониестимулирующие факторы (ИЛ-3, -7, гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор и др.);
- хемокины, или клеточные хемоаттрактанты (ИЛ-8 и др.).

Краткая характеристика некоторых цитокинов приведена в табл. 9.3.

Таблица 9.3. Характеристика основных цитокинов

Цитокин	Размер молекулы (аминокислотных остатков)	Клетка-продуцент	Рецептор	Биологический эффект
ИЛ-1(β)	153	Макрофаг	CD121	<i>Локальный эффект:</i> активация Т-лимфоцитов и макрофагов. <i>Системный эффект:</i> развитие симптомов септического шока (лихорадка и пр.)
ИЛ-2	133	Активированный Т ₁ -хелпер	CD25, 122, 132	Потенцирует выживание клеток. Стимулирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов и естественных киллеров
ИЛ-3	133	Т-лимфоцит	CD123	Мультиколониестимулирующий фактор
ИЛ-4	129	Т-лимфоцит, естественный киллер, тучная клетка	CD124, 132	Направляет дифференцировку Т ₀ -хелпера в сторону Т ₂ -клетки. Активация В-лимфоцитов. Переключение синтеза иммуноглобулинов на класс Е. Противовоспалительное действие
ИЛ-5	115	Т ₂ -хелпер, тучная клетка	CD125	Активирует эозинофилы. Стимулирует синтез иммуноглобулина класса Е
ИЛ-6	184	Т-лимфоцит, макрофаг	CD126, 130	<i>Локальный эффект:</i> стимуляция пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов; усиление биосинтеза иммуноглобулина класса А. <i>Системный эффект:</i> индукция лихорадки; стимуляция биосинтеза в печени белков острой фазы
ИЛ-7	152	Клетки костного мозга, уδТ-лимфоцит	CD127, 132	Поддерживает размножение пре-Т-, пре-В- и уδТ-лимфоцитов

Продолжение табл. 9.3

Цитокин	Размер молекулы (аминокислотных остатков)	Клетка-продукцент	Рецептор	Биологический эффект
ИЛ-9	125	T ₂ -хелпер	CD132	Активация тучных клеток
ИЛ-10	160	T ₂ -хелпер, макрофаг, В-лимфоцит	ИЛ-10R	Стимулирует переключение синтеза иммуноглобулинов на класс G4. Мощный ингибитор активности макрофага и Т-киллера
ИЛ-11	178	Фибробласт	CD130	Синергист ИЛ-3
ИЛ-12	503	Макрофаг, В-лимфоцит	CD132	Направляет дифференцировку T ₀ -хелпера в сторону T ₁ -клетки. Стимулирует созревание Т-киллеров. Активирует естественные киллеры
ИЛ-13	132	T ₂ -хелпер	CD132	Направляет дифференцировку T ₀ -хелпера в сторону T ₂ -клетки. Активация В-лимфоцитов. Стимулирует переключение синтеза иммуноглобулинов на класс Е. Противовоспалительное действие
ИЛ-15	114	Т-лимфоцит	CD122, 132	Стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и естественных киллеров
ИЛ-16	130	Т-лимфоцит, тучная клетка, эозинофил	CD4	Хемоаттрактант для Т-хелперов, моноцитов, эозинофилов. Блокирует апоптоз в Т-лимфоцитах
ИЛ-17	150	CD4 ⁺ Т-лимфоциты иммунной памяти	ИЛ-17R	Стимулирует эпителиальные, эндотелиальные клетки и фибробласты к продукции цитокинов
ИЛ-18	157	Активированный макрофаг	ИЛ-1Rrp (гомолог CD121)	Индукция синтеза ИФН-γ Т-лимфоцитами и естественными киллерами. Потенцирует дифференцировку T ₁ -хелпера

Окончание табл. 9.3

Цитокин	Размер молекулы (аминокислотных остатков)	Клетка-продукцент	Рецептор	Биологический эффект
ИФН- γ	143	T _H -хелпер, T-киллер, естественный киллер	CD119	Активирует макрофаг и естественный киллер. Индуцирует экспрессию на клетках MHC I и II классов. Потенцирует образование T _H -хелпера. Стимулирует в В-лимфоцитах переключение биосинтеза изотипов иммуноглобулинов. Обладает противовирусным действием
ГМ-КСФ	127	T-лимфоцит, макрофаг	CD116	Поддержка роста миелопоэза в костном мозгу
ТФР- β	112	Активированные T-лимфоциты и моноциты	β -TGF-R	Мощный иммуносупрессор: ингибирует активацию T-киллеров, макрофагов и гранулоцитов и пролиферацию лимфоцитов. Стимулирует ангиогенез
ФНО- α	157	Активированные макрофаг, нейтрофил, естественный киллер и тучная клетка	CD120	<i>Локальный эффект:</i> создает очаг местного воспаления в покровных тканях при инфицировании; активирует биосинтез ИЛ-1, -6; стимулирует синтез белков острой фазы. <i>Системный эффект:</i> индуцирует симптомы септического шока (лихорадка, коллапс, ДВС-синдром и др.)
МИФ	115	T-лимфоцит	MTF-R	Тормозит миграцию моноцитов из очага воспаления. Стимулирует дифференцировку моноцита в макрофаг. Активирует макрофаг

Примечание. ГМ-КСФ — гранулоцит-моноцит-колониестимулирующий фактор; МИФ — миграции ингибирующий фактор.

По механизму действия цитокины подразделяются:

- на провоспалительные (ИЛ-1, -2, -6, -8, ФНО- α , ИФН- γ);
- противовоспалительные (ИЛ-4, -10, ТФР- β);
- эффекторные молекулы с противовирусным и цитотоксическим действием.

Прямое межклеточное взаимодействие основано на рецепции структур, экспрессированных на мембране клетки-оппонента. Для этого требуется достаточно продолжительный и стабильный контакт клеток. Такой способ коммутации используют Т-хелперы и Т-киллеры при анализе чужеродности презентированных структур. Механизм действия костимулирующих факторов (пары CD40–CD40-лиганд, CD28–80, 86) также требует непосредственного контакта.

Активация иммунной системы

Активация иммунной системы подразумевает развитие продуктивной иммунной реакции в ответ на антигенное раздражение и появление продуктов деструкции тканей макроорганизма. Это сложный многоступенчатый процесс, требующий продолжительного времени для своей индукции — около 4 сут. Критическим событием является невозможность элиминации антигена факторами врожденного иммунитета в течение указанного срока.

Пусковым механизмом адаптивного иммунитета является распознавание «свой–чужой», которое осуществляют Т-лимфоциты с помощью своих прямых иммунорецепторов — TCR. В случае установления чужеродности биоорганической молекулы включается второй этап реагирования — запускается интенсивное тиражирование клона высокоспецифичных для антигена лимфоцитов-эффекторов, способных прервать антигенную интервенцию. Это явление получило название «экспансия клона». Параллельно, но несколько позже пролиферации стимулируются дифференцировка иммунных лимфоцитов и формирование из него клеток иммунологической памяти, гарантирующих выживание в будущем.

Таким образом, продуктивная активация иммунной системы связана с размножением и дифференцировкой антигенореактивных клонов иммунокомпетентных клеток. Антигену в этом процессе отведена роль индуктора и фактора клональной селекции. Механизмы основных этапов активации иммунной системы рассмотрены ниже.

Активация Т-хелпера. Процесс (см. рис. 9.6) осуществляется при непосредственном участии АЗКЦТ (дендритные клетки, В-лимфоциты и макрофаги). После эндоцитоза и процессинга антигена во внутрикле-

точных везикулах АЗКЦТ встраивает образовавшийся олигопептид в молекулу МНС II класса и выставляет полученный комплекс на наружной мембране. На поверхности АЗКЦТ также экспрессируются костимулирующие факторы — молекулы CD40, 80, 86, мощным индуктором которых являются продукты некроза на этапе доиммунного воспаления.

T-хелпер с помощью молекул адгезии прочно соединяется с поверхностью АЗКЦТ. Иммунорецептор T-хелпера совместно с молекулой CD3 при поддержке корецепторной молекулы CD4 взаимодействует с комплексом «антиген–МНС II класса» и анализирует чужеродность его структуры. Продуктивность рецепции зависит от костимулирующих воздействий в парах CD28–CD80/86 и CD40-лиганд–CD40.

В случае признания чужеродности комплекса «антиген–МНС II класса» (точнее, «не своего») T-хелпер активируется. Он экспрессирует рецептор к ИЛ-2 и начинает синтезировать ИЛ-2 и другие цитокины. Итогом активации T-хелпера являются его размножение и дифференцировка в одного из своих потомков. Любое изменение условий рецепции прекращает активацию T-хелпера и может индуцировать в нем апоптоз.

Активация В-лимфоцита. Для активации В-лимфоцита (рис. 9.9) необходима суммация трех последовательных сигналов. Первый сигнал — результат взаимодействия молекулы антигена со специфичным для него BCR, второй — интерлейкиновый стимул активированного T-хелпера и третий — результат взаимодействия костимулирующих молекул CD40 с CD40-лигандом.

Активация инициирует размножение и дифференцировку специфического для конкретного антигена В-лимфоцита (см. рис. 9.2). В итоге в пределах зародышевых (герминативных) центров лимфоидных фол-



Рис. 9.9. Схема активации В-лимфоцита (см. пояснения в тексте)

ликулов появляется клон специфических антителопродуцентов. Дифференцировка позволяет переключить биосинтез иммуноглобулинов с классов М на более экономные: G, A или E (редко), повысить аффинность синтезируемых антител и образовать В-клетки иммунологической памяти или плазматические клетки.

Активация В-лимфоцита — весьма тонкий процесс. Отсутствие хотя бы одного из стимулов (нарушение межклеточной кооперации, неспецифичность рецептора В-лимфоцита или элиминация антигена) блокирует развитие антительного иммунного ответа.

Активация Т-киллера. Для исполнения надзорной функции Т-киллер вступает в тесный и прочный контакт с потенциальной клеткой-мишенью, используя молекулы адгезии (см. рис. 9.8). Затем иммунорецептор Т-киллера ($\alpha\beta$ TCR) совместно с молекулой CD3 при поддержке корцепторной молекулы CD8 взаимодействует с антигенным комплексом МНС I класса и анализирует его структуру. Обнаружение отклонений в пользу аллогенности активирует Т-киллер к экспрессии рецептора к ИЛ-2 и синтезу ИЛ-2 и высвобождение эффекторных молекул (перфорин, гранзимы, гранулизин) из цитоплазматических гранул в синаптическую щель межклеточного контакта.

Для адекватного развития клеточной формы иммунного ответа требуются активизирующие стимулы со стороны T_H -хелпера. Т-киллер может функционировать автономно, самостоятельно иницируя и поддерживая клонообразование за счет аутокринной стимуляции ИЛ-2. Однако это свойство реализуется редко.

Супрессия иммунного ответа

Супрессия, или подавление, иммунного ответа является физиологической реакцией организма, которая в норме завершает иммунный ответ и направлена на торможение экспансии антигенспецифических клонов лимфоцитов. В отличие от иммунологической толерантности, супрессии подвергается уже иницированное иммунное реагирование. Различают три механизма иммуносупрессии: уничтожение клонов иммунокомпетентных клеток, торможение активности иммунокомпетентных клеток, элиминация антигенного стимула.

Устранить иммунокомпетентные клетки можно путем апоптоза. При этом элиминации подвергаются следующие группы клеток:

- терминально дифференцированные лимфоциты, завершившие свою биологическую программу;
- активированные лимфоциты, не получившие антигенного стимула;

- «изношенные» лимфоциты;
- аутореактивные клетки.

Естественными факторами, инициирующими апоптоз, являются глюкокортикоидные гормоны, Fas-лиганд, ФНО- α и другие иммуноцитокнины, гранзимы и гранулизин. Апоптотическое уничтожение клеток-мишеней могут активировать Т-киллеры, естественные киллеры с фенотипом CD16–56^{много} и Т-хелперы.

Помимо апоптоза, возможен антителозависимый лимфоцитоллиз. Например, с медицинской целью применяют антилимфоцитарную сыворотку, которая в присутствии комплемента вызывает лизис лимфоцитов. Устранить лимфоидную популяцию возможно также воздействием ионизирующего излучения или цитостатиков.

Функциональная активность иммунокомпетентных клеток может быть ингибирована растворимыми факторами их конкурентов или потомков. Ведущая роль принадлежит иммуноцитокинам с множественными эффектами. Известно, например, что Т₂-хелперы, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты и тучные клетки с помощью ИЛ-4, -13 препятствуют дифференцировке Т₀-хелпера в Т₁-клетку. Последний, в свою очередь, может блокировать образование Т₂-хелпера, синтезируя ИФН- γ . Пролиферацию Т- и В-лимфоцитов ограничивает ТФР- β , который продуцируют терминально дифференцированные Т-хелперы. Продукты Т₂-хелпера подавляют биологическую активность макрофагов.

Супрессия гуморального звена иммунитета может быть вызвана иммуноглобулинами. Избыточные концентрации свободного иммуноглобулина класса G, связываясь со специальными рецепторами на мембране В-лимфоцита, тормозят биологическую активность клетки и ее способность дифференцироваться в плазмоцит.

Устранение из организма антигена в природе наблюдается при полном освобождении организма от патогена при развитии стерильного иммунитета. В клинической практике эффект достигается очищением организма плазмо- или лимфосорбцией, а также нейтрализацией антигена антителами, специфичными для высокоиммуногенных эпитопов.

Возрастные изменения иммунной системы

В развитии иммунной системы четко прослеживаются два этапа.

- Первый, *антигеннезависимый*, который начинается с эмбрионального периода развития и частично продолжается всю жизнь. В течение этого периода образуются разнообразные по антиген-

ной специфичности лимфоциты. Предшественники $\gamma\delta$ T- и V β -лимфоцитов мигрируют в покровные ткани и формируют автономные лимфоидные ростки.

- Второй этап, *антигензависимый*, продолжается с момента рождения особи до ее гибели. В этот период идет «ознакомление» иммунной системы с многообразием окружающих нас антигенов. По мере накопления биологического опыта, то есть количества и качества продуктивных контактов с антигенами, происходят селекция и формирование отдельных клонов иммунокомпетентных клеток. Особенно интенсивная экспансия клонов характерна для детского возраста. В течение первых 5 лет жизни иммунной системе ребенка приходится усваивать примерно 90% биологической информации. Еще 9% воспринимается до наступления пубертата, на взрослое состояние остается лишь около 1%.

Иммунной системе ребенка приходится справляться с чудовищными нагрузками, которые в основном падают на гуморальное звено иммунитета. В местах с повышенной плотностью населения и частыми межиндивидуальными контактами (крупные города) создаются условия для длительной персистенции высокой концентрации разнообразных патогенов. Поэтому дети в мегаполисах часто болеют. Однако создается впечатление о тотальном иммунодефиците, порожденном крайним экологическим неблагополучием. Между тем эволюционно заложенные механизмы иммунной защиты позволяют организму ребенка успешно справиться с трудными естественными испытаниями на жизнеспособность и адекватно отреагировать на вакцинопрофилактику.

С возрастом иммунная система меняет свою структуру. В организме взрослого до 50% всего лимфоидного пула представлено клонами клеток, прошедших антигенную стимуляцию. Накопленный иммунной системой биологический опыт проявляется образованием узкой «библиотеки» жизненно важных (актуальных) клонов лимфоцитов, специфичных для основных патогенов. Благодаря долгоживучести клеток иммунологической памяти актуальные клоны со временем становятся самодостаточными. Они приобретают способность к самоподдержанию и независимость от центральных органов иммунной системы. Функциональная нагрузка на тимус снижается, что проявляется его возрастной инволюцией. Тем не менее в организме сохраняется широкий набор невостребованных «наивных» клеток, которые способны отреагировать на любую новую антигенную агрессию.

Структура популяции Т-лимфоцитов также претерпевает возрастные изменения. Установлено, что в организме новорожденных преобладают T_2 -хелперы, необходимые для развития антительной защиты. Однако со временем перед организмом все острее встает проблема внутриклеточного паразитизма, различных инвазий, мутаций, что требует надежного и хорошо организованного иммунологического надзора. Поэтому после рождения начинает усиленно развиваться система адаптивного клеточного иммунитета, а вместе с ней — образование клонов T_1 -хелперов и Т-киллеров. Отмечено, что нарушение постнатальной колонизации желудочно-кишечного тракта нормальной флорой тормозит процесс адекватного формирования популяции T_1 -хелперов в пользу T_2 -клеток. Избыточная активность последних оборачивается аллергизацией детских организмов.

Продуктивный иммунный ответ после своего завершения (нейтрализации и элиминации антигена из организма) также сопровождается изменениями клональной структуры антигенореактивных лимфоцитов. При отсутствии активирующих стимулов клон инволюционирует. Невостребованные клетки со временем погибают от старости или индукции апоптоза, причем этот процесс начинается с наиболее дифференцированных лимфоцитов-эффекторов. Численность клона постепенно снижается и проявляется постепенным угасанием иммунного ответа. Однако в организме длительно персистируют клетки иммунологической памяти.

Старческий период жизни характеризуется доминированием в иммунной системе актуальных клонов антигенспецифических лимфоцитов. В стремлении сдержать клональную экспансию нарастает иммунодепрессия и снижается общая реактивность. Инфекции, вызванные даже условно-патогенными микробами, зачастую принимают затяжной или угрожающий характер, постепенно нарастает объем злокачественно трансформированных клеток.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Отметьте эффекторные клетки иммунной системы:

1. Дендритные клетки.
2. В-лимфоциты.
3. Т-хелперы.
4. Т-киллеры.

Б. Отметьте АЗКЦТ:

1. Дендритные клетки.
2. В-лимфоциты.
3. Макрофаги.
4. Т-хелперы.

В. Отметьте клетки, на которых экспрессируется рецептор МНС II класса:

1. Т-киллеры.
2. Дендритные клетки.
3. Макрофаги.
4. В-лимфоциты.

Г. Отметьте маркеры В-лимфоцитов:

1. МНС II класса.
2. CD40.
3. CD80.
4. CD28.

Д. Отметьте рецепторные молекулы Т-хелперов:

1. CD4.
2. CD3.
3. CD28.
4. CD40L.

Е. Назовите клетки и медиаторы, принимающие участие в формировании T_1 -хелперов:

1. ИЛ-12.
2. Т-киллеры.
3. ИФН- γ .
4. Активированный макрофаг.
5. Тучная клетка.

Ж. Назовите клетки и медиаторы, принимающие участие в формировании T_2 -хелперов:

1. Базофилы.
2. Т-киллеры.
3. Тучные клетки.
4. ИЛ-4.
5. ФНО- α .

З. Назовите рецептор-лигандную пару, необходимую для костимуляции Т-хелперов АЗКЦТ:

1. CD80/CD28.
2. МНС класс II/CD4.

3. МНС класс I/CD8.

4. МНС класс II/TCR

И. Назовите рецептор-лигандную пару, необходимую для стимуляции Т-киллера (CD8):

1. МНС класс II/CD4.

2. МНС класс I/CD8.

3. CD40/CD40L.

4. CD80/CD28.

К. Некоторые вирусы и бактериальные токсины обладают свойством суперантигенов, вызывая неспецифическую активацию лимфоцитов, приводящую их к гибели. Объясните механизм их действия.

Глава 10

ОСНОВНЫЕ ФОРМЫ ИММУННОГО РЕАГИРОВАНИЯ

Иммунная система осуществляет свою биологическую функцию с помощью сложного комплекса взаимосвязанных реакций. В них задействованы все ее структурные и функциональные элементы. Конкретные проявления иммунного реагирования можно подразделить на отдельные формы: антителообразование, иммунный фагоцитоз, клеточно-опосредованный киллинг, реакции гиперчувствительности, иммунологическую память и толерантность.

Все элементы иммунной системы имеют единый принцип управления и активируются практически одновременно, однако в зависимости от характера антигенного воздействия одна или несколько форм доминируют. Например, при токсинемической инфекции преимущественно активируется продукция антител, способных нейтрализовать молекулы токсина, при туберкулезной инфекции основную функциональную нагрузку выполняют факторы клеточного иммунитета.

10.1. АНТИТЕЛА И АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ

10.1.1. Природа антител

Одной из филогенетически наиболее древних форм иммунной защиты является биосинтез антител — белков, специфически реагирующих с антигенами и участвующих во многих иммунных реакциях. Антитела относятся преимущественно к γ -глобулиновой фракции белков плазмы крови, на долю которых приходится 15–25% ее белкового содержания, что составляет примерно 10–20 г/л. Поэтому антитела получили название «иммуноглобулины», и их обозначают символом Ig. Следовательно антитела — это γ -глобулины плазмы крови, способные специфически связываться с антигеном и образовывать иммунный комплекс.

Антитела синтезируются В-лимфоцитами и их потомками — плазматическими клетками. Они существуют в циркулирующей форме и в виде рецепторных молекул на иммунокомпетентных клетках. Циркулирующие антитела подразделяются на сывороточные и секреторные. К антителам могут быть также отнесены белки Бенс-Джонса, которые являются фрагментами молекулы иммуноглобулина (его легкая цепь) и синтезируются в избытке при миеломной болезни.

Строение и функцию антител изучали многие видные ученые: П. Эрлих (1885) предложил первую теорию гуморального иммунитета, Э. Беринг и С. Китагато (1887) получили первые антитоксические сыворотки к дифтерийному и столбнячному токсинам, А. Безредка (1923) разработал метод безопасного введения пациентам лечебных иммунных сывороток. Большая заслуга в расшифровке молекулярного строения иммуноглобулинов принадлежит Д. Эдельману и Р. Портеру (1959), а разгадка многообразия антител — Ф. Бернету (1953) и С. Тонегаве (1983).

10.1.2. Молекулярное строение антител

Молекулы иммуноглобулинов имеют универсальное строение (рис. 10.1). Они состоят из 2 пар полипептидных цепей:

- 1) двух тяжелых (550–660 аминокислотных остатков, молекулярная масса — 50 кД);
- 2) двух легких (220 аминокислотных остатков, молекулярная масса — 20–25 кД).

Обозначают их как Н- (от англ. *heavy* — тяжелый) и L- (от англ. *light* — легкий) цепи. Тяжелые и легкие цепи связаны между собой по-

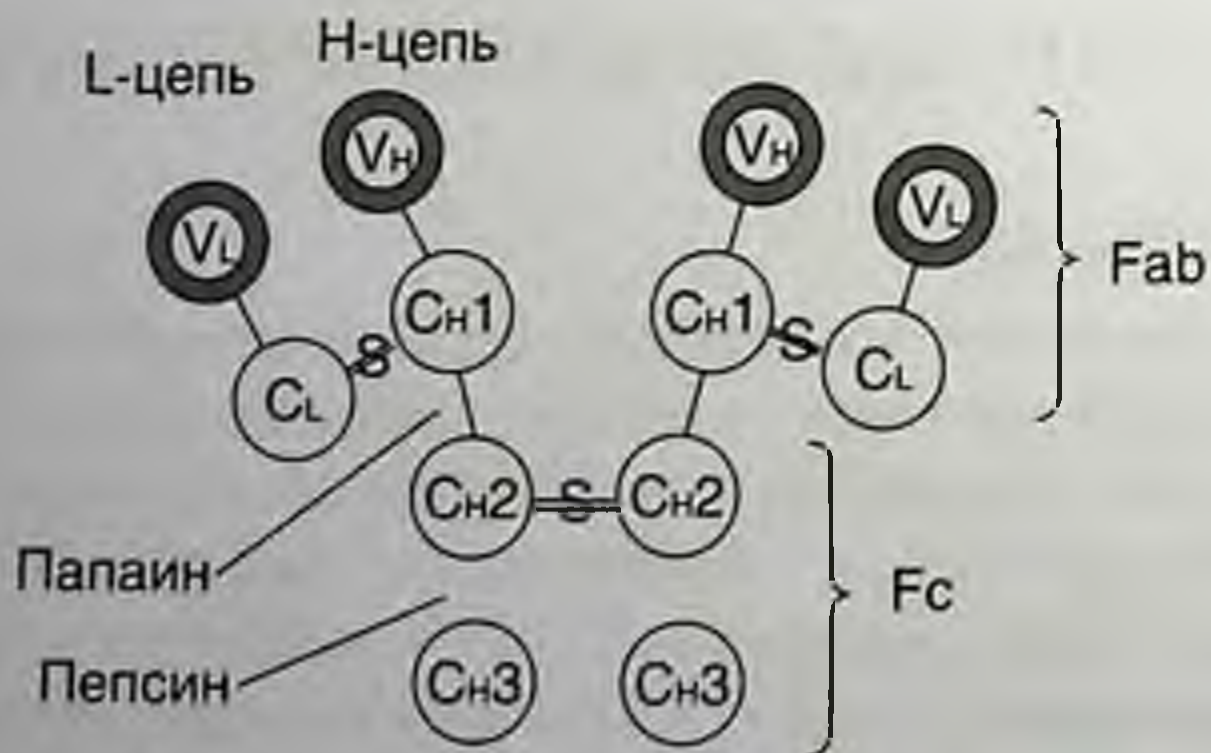


Рис. 10.1. Схема строения молекулы иммуноглобулина класса G: V — вариабельный домен; C — константный домен; S — дисульфидная связь шарнирного участка

парно дисульфидными связями ($-S-S-$). Между тяжелыми цепями также есть дисульфидная связь — это так называемый шарнирный участок. Такой тип межпептидного соединения позволяет молекуле иммуноглобулина легко менять свою конформацию в зависимости от условий окружающей среды. Область шарнирного участка ответственна за взаимодействие с первым компонентом комплемента (C1) и его активацию по классическому пути.

Различают структурные варианты легких и тяжелых полипептидных цепей молекулы иммуноглобулина. Легкие цепи бывают 2 типов: κ и λ (каппа и лямбда). Тяжелых цепей известно 5 типов: α , γ , μ , ϵ и δ (альфа, гамма, мю, эпсилон и дельта). Среди многообразия цепей α -типа выделяют α_1 - и α_2 -подтипы, μ -цепей — μ и μ_2 , γ -цепей — γ_1 -, γ_2 -, γ_3 - и γ_4 -подтипы.

Вторичная структура полипептидных цепей молекулы иммуноглобулина имеет доменное строение — ее отдельные участки свернуты в глобулы (домены), стабилизированные внутренней дисульфидной связью. Таких доменов в составе тяжелой цепи иммуноглобулина бывает 4–5, в легкой — 2. Каждый домен состоит примерно из 110 аминокислотных остатков.

Домены различаются по постоянству аминокислотного состава. Выделяют *C-домены* (от англ. *constant* — постоянный) с относительно постоянной структурой и *V-домены* (от англ. *variable* — изменчивый) с переменной структурой. Легкая цепь состоит из одного V- и C-домена, а в составе тяжелой цепи есть один V- и 3–4 C-домена. Примечательно, что не весь вариабельный домен изменчив по своему аминокислотному составу, а лишь его незначительная часть — *гипервариабельная область*, на долю которой приходится около 25%.

Вариабельные домены легкой и тяжелой цепей совместно образуют участок, который специфически связывается с антигеном, — *антигенсвязывающий центр*, или *паратоп*. Гипервариабельные области тяжелой и легкой цепей определяют индивидуальные особенности строения антигенсвязывающего центра иммуноглобулина для каждого клона В-лимфоцитов и многообразие их специфичностей.

Обработка ферментами молекулы иммуноглобулина приводит к ее гидролизу на отдельные фрагменты. Так, папаин разрывает молекулу выше шарнирного участка и ведет к образованию трех фрагментов (см. рис. 10.1). Два из них способны специфически связываться с антигеном. Они состоят из цельной легкой цепи и участка тяжелой (V- и C-домен), и в их структуру входят антигенсвязывающие участки. Эти

фрагменты получили название *Fab* (от англ. — фрагмент, связывающийся с антигеном). Третий фрагмент, способный образовывать кристаллы, получил название *Fc* (от англ. — фрагмент кристаллизующийся). Он ответствен за связывание с рецепторами на мембране клеток макроорганизма (*Fc*-рецепторы) и некоторыми микробными суперантигенами (например, белком А стафилококка). Пепсин расщепляет молекулу иммуноглобулина ниже шарнирного участка и ведет к образованию 2 фрагментов: *Fc* и двух сочлененных *Fab*, или $F(ab)_2$.

В структуре молекул иммуноглобулина обнаруживают дополнительные полипептидные цепи. Так, полимерные молекулы IgM и IgA содержат *J-пептид* (от англ. *join* — соединяю), который объединяет отдельные мономеры в единое макромолекулярное образование (см. раздел 10.1.3). Молекулы секреторных иммуноглобулинов обладают *S-пептидом* (от англ. *secret* — секрет). Это так называемый *секреторный компонент*. Его молекулярная масса составляет 71 кД, он является β -глобулином и предохраняет молекулу иммуноглобулина в секрете слизистых оболочек от ферментативного расщепления. Рецепторный иммуноглобулин, локализуемый на цитоплазматической мембране антителопродуцирующих клеток, имеет дополнительный гидрофобный трансмембранный *M-пептид* (от англ. *membrane* — мембрана). Он прочно удерживает молекулу иммуноглобулина в липидном бислое цитоплазматической мембраны и проводит рецепторный сигнал через цитоплазматическую мембрану внутрь клетки. J- и M-пептиды присоединяются к молекуле иммуноглобулина в процессе ее биосинтеза. S-пептид является продуктом эпителиальной клетки — он присоединяется к J-пептиду полимерной молекулы иммуноглобулина при ее транслокации через эпителиальную клетку.

10.1.3. Структурно-функциональные особенности иммуноглобулинов различных классов

В зависимости от особенностей молекулярного строения тяжелой цепи, а следовательно, наличия изотипических, или групповых, антигенных детерминант различают 5 классов или изотипов иммуноглобулина (рис. 10.2). Молекулы, содержащие тяжелую цепь α -типа, относят к изотипу, или классу A (сокращенно IgA), δ -типа — IgD, ϵ -типа — IgE, γ -типа — IgG и μ -типа — IgM. Различают также отдельные подклассы иммуноглобулинов.

Для каждого изотипа иммуноглобулина характерны свои особенности. В частности, IgD, E и G имеют мономерное строение, IgM практи-

чески всегда является пентамером, а молекула IgA может быть моно-, ди- и тримером. Наиболее характерные черты различных изотипов иммуноглобулина приведены в табл. 10.1.

Иммуноглобулин класса G составляет основную массу иммуноглобулина сыворотки крови, на его долю приходится 70–80% всех циркулирующих иммуноглобулинов, при этом 50% содержится в тканевой жид-

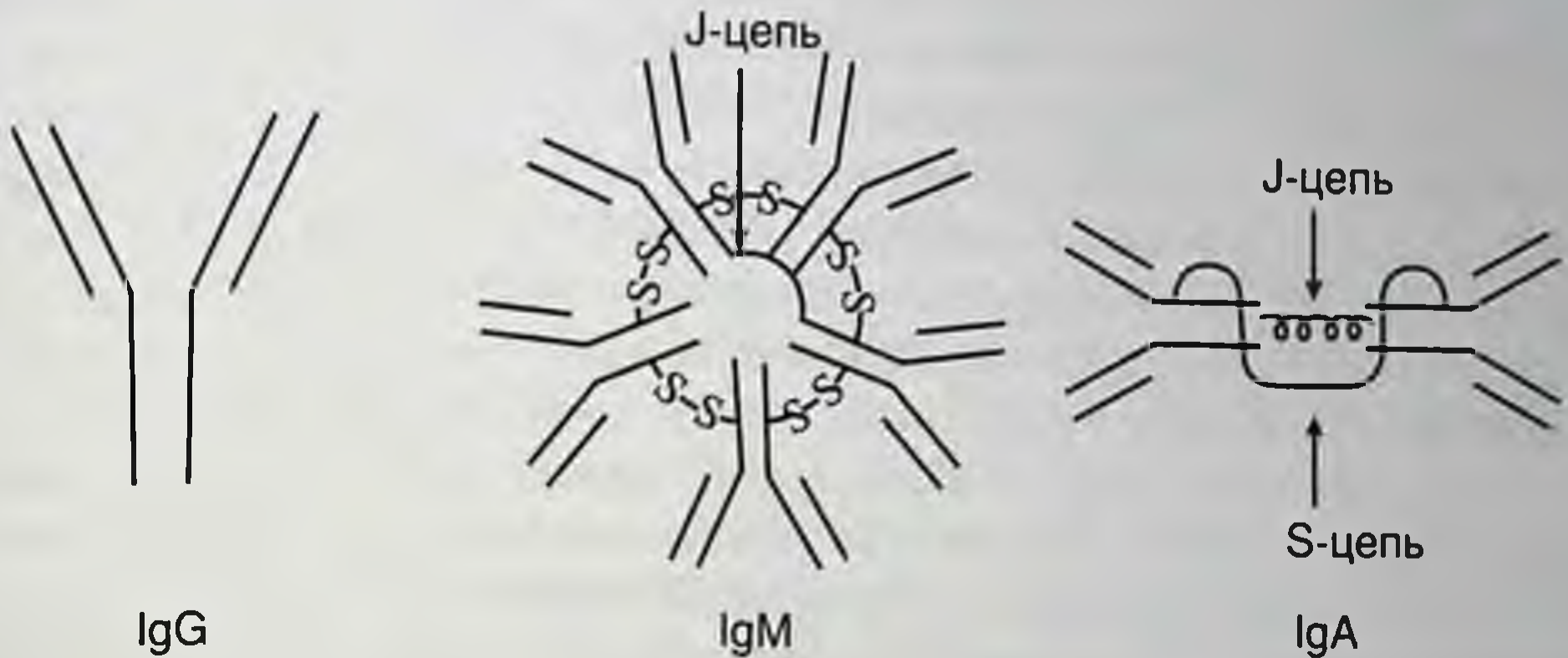


Рис. 10.2. Схема строения иммуноглобулинов различных классов (см. пояснение в тексте)

Таблица 10.1. Основные характеристики иммуноглобулинов человека

Характеристика	IgM	IgG	IgA	IgD	IgE
Молекулярная масса, кД	900	150	160	185	190
Количество мономеров	5	1	1–3	1	1
Валентность	10	2	2–6	2	2
Уровень в сыворотке крови, г/л	0,5–1,9	8,0–17,0	1,4–3,2	0,03–0,2	0,002–0,004
Период полураспада, сут	5	25	6	3	2
Связывание комплемента	+++	++	–	–	–
Цитотоксическая активность	+++	++	–	–	–
Опсонизация	+++	+	+	–	–
Преципитация	+		+	–	+
Агглютинация	+++	+	+	–	+
Участие в аллергических реакциях	+	+	+	–	+++
Наличие рецепторов на лимфоцитах	+	+	+	+	+
Прохождение через плаценту	–	+	–	–	–
Наличие в секретах в секреторной форме	–	–	+	–	–

кости. Среднее содержание IgG в сыворотке крови здорового взрослого человека — 12 г/л, что достигается к 7–10-летнему возрасту. Период полураспада IgG — 21 день.

IgG — мономер, имеет два антигенсвязывающих центра, может одновременно связать два эпитопа. Молекулярная масса около 160 кД, константа седиментации 7S. Синтезируется зрелыми В-лимфоцитами (B_{γ}) и плазматическими клетками. Хорошо определяется в сыворотке крови на пике первичного и при вторичном иммунном ответе. Обладает высокой *аффинностью* (см. раздел 11.1.5).

Различают подтипы G1–G4. Иммунные комплексы, образованные IgG1 и G3 способны активировать комплемент по классическому пути, причем G3 активнее. IgG4 подобно IgE обладает цитотрофностью (тропностью, или сродством, к тучным клеткам и базофилам) и участвует в развитии аллергической реакции I типа (см. раздел 11.4).

Легко проходит через плацентарный барьер и обеспечивает гуморальный иммунитет новорожденного в первые 3–4 мес после рождения, в том числе обнаруживается в молоке. IgG обеспечивает нейтрализацию и маркирование антигена, осуществляет запуск комплементопосредованного цитолиза и АЗКЦТ.

Иммуноглобулин класса М — наиболее крупная молекула из всех иммуноглобулинов. Это пентамер, который имеет 10 антигенсвязывающих центров. Его молекулярная масса около 900 кД, константа седиментации 19S. Различают подтипы М1 и М2. Тяжелые цепи молекулы IgM, в отличие от других изотипов, построены из 5 доменов. Являясь полимерной молекулой, содержит J-цепь. Период полураспада — 5 дней.

На его долю приходится 5–10% всех циркулирующих иммуноглобулинов. Среднее содержание IgM в сыворотке крови здорового взрослого человека около 1 г/л. Этого уровня человек достигает уже к 2–4-летнему возрасту. IgM филогенетически наиболее древний иммуноглобулин. Образуется в начале первичного иммунного ответа B_{μ} -клетками.

Иммуноглобулин класса М обладает высокой авидностью, наиболее эффективный активатор комплемента по классическому пути. Большая часть нормальных антител и изоагглютининов относится к IgM. Не проходит через плаценту. Обнаружение высоких титров специфических антител изотипа М в сыворотке крови новорожденного указывает на бывшую внутриутробную инфекцию или дефект плаценты. IgM обеспечивает нейтрализацию и маркирование антигена, осуществляет запуск комплементопосредованного цитолиза и АЗКЦТ. Является маркером острого инфекционного процесса.

Иммуноглобулин класса А существует в сывороточной и секреторной формах. Около 60% всех IgA содержится в секретах слизистых оболочек.

Сывороточный IgA. На его долю приходится около 10–15% всех циркулирующих иммуноглобулинов. В сыворотке крови здорового взрослого человека содержится около 2,5 г/л IgA, максимум достигается к 10-летнему возрасту. Период полураспада 6 дней.

IgA — мономер, имеет 2 антигенсвязывающих центра, молекулярную массу около 170 кД и константу седиментации 7S. Различают подтипы А1 и А2. Синтезируется зрелыми иммунными В-лимфоцитами (В_д) и плазматическими клетками. Хорошо определяется в сыворотке крови на пике первичного и при вторичном иммунном ответе. Обладает высокой аффинностью. Не связывает комплемент. Не проходит через плацентарный барьер. IgA обеспечивает нейтрализацию и маркирование антигена, осуществляет запуск АЗКЦТ.

Секреторный IgA существует в полимерной форме в виде ди- или тримера (4- или 6-валентный), несет 4 или 6 паратопов и содержит J- и S-пептиды. Молекулярная масса 350 кД и выше, константа седиментации 13S и выше.

Синтезируется В_д-лимфоцитами, плазматическими клетками и, возможно, В1-лимфоцитами в пределах слизистых оболочек и выделяется в их секреты. Объем продукции может достигать 5 г/сут. Пул секреторный IgA считается самым многочисленным в организме — его количество превышает суммарное содержание IgM и IgG. В сыворотке крови секреторный IgA не обнаруживается.

Формирование четвертичной структуры молекулы секреторного IgA происходит при ее транслокации через эпителиальную клетку. На базальной и латеральной поверхности эпителиальная клетка несет рецептор к J-цепи полимерной молекулы иммуноглобулина (JR). Присоединяясь к рецептору, IgA эндоцитируется клеткой в виде везикулы и переносится к апикальной поверхности эпителиоцита, где JR подвергается ферментативному расщеплению. В результате IgA высвобождается в слизистый секрет просвета органа уже в секреторной форме, так как оставшийся прикрепленным к молекуле иммуноглобулина фрагмент JR становится S-цепью.

Секреторная форма IgA — основной фактор специфического гуморального местного иммунитета слизистых оболочек желудочно-кишечного и респираторного тракта, мочеполовой системы. Благодаря S-цепи он устойчив к действию протеаз. Секреторный IgA не

активирует комплемент, но эффективно связывается с антигенами, нейтрализует их и препятствует адгезии микробов на эпителиальных клетках.

Иммуноглобулин класса Е называют также «реагин». Содержание его в сыворотке крови крайне мало — примерно 0,00025 г/л. Молекулярная масса около 190 кД, константа седиментации примерно 8S, мономер. На его долю приходится около 0,002% всех циркулирующих иммуноглобулинов. Этот уровень достигается к 10–15 годам жизни.

Синтезируется зрелыми В-лимфоцитами (B_r) и плазматическими клетками преимущественно в лимфоидной ткани бронхолегочного дерева и желудочно-кишечного тракта. Не связывает комплемент. Не проходит через плацентарный барьер. Обладает выраженной цитотропностью — тропностью к тучным клеткам и базофилам. Участвует в развитии ГНТ — реакция I типа (см. раздел 11.4).

Иммуноглобулин класса D практически полностью содержится в сыворотке крови в концентрации около 0,03 г/л (около 0,2% общего количества циркулирующих Ig). IgD имеет молекулярную массу 160 кД и константу седиментации 7S, мономер. Не связывает комплемент. Не проходит через плацентарный барьер. Экспрессируется на предшественниках В-лимфоцитов.

Рецепторные иммуноглобулины, или мембранные, локализуются на цитоплазматической мембране В-лимфоцитов и выполняют функции их антигенспецифических рецепторов (BCR). Имеют те же изотип и специфичность, что и синтезируемые в межклеточную среду антитела. Содержат особый дополнительный М-пептид, благодаря которому молекула рецепторного иммуноглобулина фиксируется в цитоплазматической мембране В-лимфоцита.

Нормальные антитела, или естественные, — совокупность иммуноглобулина сыворотки крови человека различной специфичности, формирующих их базальный уровень. К ним относят изогемагглютинины — антитела к эритроцитарным антигенам групп крови (например, система АВ0), антигенам бактерий кишечной группы, кокков и некоторых вирусов. Эти антитела постоянно образуются в организме без видимой антигенной стимуляции и отражают готовность макроорганизма к иммунному реагированию, а также свидетельствуют об отдаленном контакте с антигеном.

Моноклональные антитела. Каждый В-лимфоцит и его потомки, образовавшиеся в результате клеточного деления (то есть клон), способны синтезировать антитела с паратопом строго определенной спе-

цифичности. Такие антитела получили название «моноклональные». В естественных условиях макроорганизма получить моноклональные антитела практически невозможно, так как на одну и ту же антигенную детерминанту одновременно реагируют до 100 различных клонов В-лимфоцитов, незначительно различаемых антигенной специфичностью. Поэтому в результате иммунизации даже моноклеточным антигеном мы всегда получаем *поликлональные* антитела.

Принципиально получение моноклональных антител выполнимо, если провести предварительную селекцию антителопродуцирующих клеток и их клонирование, то есть получение необходимых клонов. Однако задача осложняется тем, что число генераций В-лимфоцитов, как и других эукариотических клеток, ограничено. Тем не менее проблема была успешно решена Д. Келлером и Ц. Мильштайном (1975). Исследователи получили гибриды иммунных В-лимфоцитов и миеломных (опухолевых) клеток, которые обладали свойствами антителопродукта и «бессмертием» раково-трансформированной клетки. Такой вид клеток получил название «гибридом». В ходе дальнейшей селекции были отобраны клоны с наивысшей продуктивностью и аффинностью специфических антител. Гибридомные моноклональные антитела нашли широкое применение при создании диагностических и лечебных иммунобиологических препаратов.

Полные и неполные антитела. Такое подразделение основано на способности образовывать в реакции агглютинации или преципитации (*in vitro*) хорошо различимый глазом результат. Таким свойством обладают *полные антитела*. К ним относятся IgM, а также некоторые IgA и G.

Неполные антитела лишены такой способности, несмотря на то, что они специфически связываются с антигеном — их еще называют *неагглютинирующими, непреципитирующими или блокирующими антителами* (см. гл. 12).

10.1.4. Антигенность антител

Имуноглобулин, как и всякий белок, обладает антигенностью и выраженной иммуногенностью. В молекуле иммуноглобулина различают 4 типа антигенных детерминант.

1. *Видовые антигенные детерминанты* характерны для иммуноглобулинов всех особей данного вида (например, кролика, собаки, человека). Они определяются строением легкой и тяжелой цепей.

По этим детерминантам можно идентифицировать видовую принадлежность антител.

2. *Изотипические антигенные детерминанты* являются групповыми. Они локализуются в тяжелой цепи и служат для дифференцировки иммуноглобулинов на 5 изотипов (классов) и множество подклассов (см. раздел 11.1.3).
3. *Аллотипические антигенные детерминанты* являются индивидуальными, то есть присущими конкретному организму. Они располагаются в легкой и тяжелой полипептидных цепях. На основании строения аллотипических детерминант можно различать особи внутри одного вида.
4. *Идиотипические антигенные детерминанты* отражают особенности строения антигенсвязывающего центра самой молекулы иммуноглобулина. Они образованы V-доменами легкой и тяжелой цепей молекулы иммуноглобулина. Обнаружение идиотипических антигенных детерминант послужило основанием для создания теории идиотип-антиидиотипической регуляции биосинтеза антител.

10.1.5. Механизм взаимодействия антитела с антигеном

В процессе взаимодействия с антигеном принимает участие *антигенсвязывающий центр* молекулы иммуноглобулина, или *паратоп*. Эта связь осуществляется за счет слабых взаимодействий (ван-дер-ваальсовы силы, водородные связи, электростатические взаимодействия) и отличается неустойчивостью — образовавшийся иммунный комплекс (ИК) может легко диссоциировать:



Продолжительность существования иммунного комплекса определяется целым рядом факторов. При этом большое значение имеют особенности антитела, антигена и условия, в которых происходит их взаимодействие. К особенностям антитела следует отнести его аффинность и авидность, совокупный эффект которых определяет степень его специфичности.

Аффинность — сила специфического взаимодействия антитела с антигеном (или энергия их связи). Аффинность определяется степенью стерического (пространственного) соответствия эпитопа и паратопа. Чем больше образуется связей между эпитопом и паратопом, тем выше будут устойчивость и продолжительность жизни образовавшегося иммунного комплекса. Иммунный комплекс, образованный низкоаф-

финными антителами, чрезвычайно неустойчив и имеет малую продолжительность существования.

Установлено, что в условиях макроорганизма с одной и той же антигенной детерминантой способны одновременно прореагировать и образовать иммунный комплекс около 100 различных клонов антител. Все они будут отличаться структурой антигенсвязывающего центра, специфичностью и аффинностью. Аффинность антител существенно меняется в процессе иммунного ответа в связи с селекцией наиболее специфичных клонов В-лимфоцитов. Наименее аффинными считаются нормальные антитела. По расчетам, общее количество различных антигенспецифических клонов В-лимфоцитов достигает 10^6 – 10^7 .

Другой характеристикой иммуноглобулинов является *авидность*. Под этим термином понимают прочность связывания антитела и антигена. Эта характеристика определяется аффинностью иммуноглобулина и числом антигенсвязывающих центров. Наибольшей авидностью обладают антитела класса М, так как они имеют 10 антигенсвязывающих центров.

Эффективность взаимодействия антитела с антигеном существенно зависит от условий, в которых происходит реакция, прежде всего от *pH* среды, осмотической плотности, солевого состава и температуры среды. Оптимальными для реакции антиген–антитело являются физиологические условия внутренней среды макроорганизма: близкая к нейтральной реакция среды, присутствие фосфат-, карбонат-, хлорид- и ацетат-ионов, осмолярность физиологического раствора (концентрация раствора 0,15 М), а также температура 36–37 °С.

10.1.6. Свойства антител

Благодаря уникальной способности специфически связываться с антигенными детерминантами антитела выполняют в организме ряд важнейших функций.

К прямым эффектам антител относится *нейтрализация* — связывание и блокирование паратопом иммуноглобулина активного центра биологически активной молекулы, например токсина, рецептора, лекарственного препарата и пр. Эффект имеет обратимый характер в случае распада иммунного комплекса. На этом принципе основан механизм действия антитоксических, противовирусных и многих других лечебных иммунных сывороток.

Другим прямым эффектом является энзиматическое действие антител. Благодаря реликтовой протеазной или нуклеазной активности (см. раздел 10.1.3) иммуноглобулины способны вызывать деструкцию молекулы антигена (например, расщепление отдельных пептидов или ДНК). Запуск системы комплемента по классическому пути также представляет собой результат ферментолиза.

В большинстве случаев взаимодействие антител с антигеном в организме не влечет за собой его структурную или функциональную модификацию. Прочно связываясь с эпитопом, антитела маркируют молекулу антигена — обозначают его как мишень для других факторов иммунитета (фагоциты, комплемент и др.).

К непрямым эффектам относятся:

- индукция комплементопосредованного лизиса чужеродных клеток (см. раздел 8.2.3.3), наибольшей эффективностью обладает IgM (IgM > IgG3 > IgG1);
- запуск антителозависимой АЗКЦТ (см. раздел 10.3);
- индукция ГНТ (см. раздел 10.4);
- опосредование иммунного фагоцитоза (см. раздел 10.2).

Клеточно-опосредованные эффекты иммуноглобулинов реализуются благодаря экспрессии на мембране иммунокомпетентных клеток рецепторов к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина (FcR). Эти рецепторы являются трансмембранными пептидами и различаются по специфичности к определенному изотипу тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Различают также высокоаффинные и низкоаффинные FcR. Первые могут взаимодействовать с интактной молекулой иммуноглобулина. В некоторых случаях она используется как корцепторный фактор (базофилы, тучные клетки). Низкоаффинные FcR связываются уже с иммунным комплексом, их называют непрямыми иммунорецепторами.

Помимо эффекторных свойств, антитела являются активными регуляторами иммунореактивности. Так, иммуноглобулины являются антигенспецифическими рецепторами В-лимфоцитов.

Специфическое связывание эпитопов специфическими антителами может блокировать развитие как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Этот эффект используется в клинической практике, например, для профилактики гемолитической болезни новорожденных в результате резус-конфликта. Антитела, специфичные к идиотипическим антигенным детерминантам иммуноглобулина, могут управлять силой антительного иммунного реагирования.

10.1.7. Генетика иммуноглобулинов

Для структуры молекул иммуноглобулина характерно уникальное генетическое кодирование. Методами молекулярной генетики было доказано, что структура молекулы иммуноглобулинов контролируется большим числом генов, которые имеют фрагментарную организацию, образуют три группы, располагаются в трех различных хромосомах и наследуются независимо.

Первая группа генов кодирует первичную структуру легкой цепи λ -типа, вторая — легкой цепи κ -типа, а третья — всех типов тяжелых цепей (α , δ , ϵ , γ и μ). Гены, относящиеся к каждой группе, находятся на соответствующей хромосоме в непосредственной близости друг от друга, располагаются последовательно (рис. 10.3) и разделены *интронами*.

Участок ДНК, кодирующий строение легкой цепи λ -типа, содержит два *V-сегмента* (контролируют структуру V-доменов) и четыре *C-сегмента* (контролируют структуру C-доменов). Между C- и V-сегментами располагается *J-сегмент* (от англ. *join* — соединяющий). Легкая цепь κ -типа кодируется несколькими сотнями V-сегментов ДНК, четырьмя J-сегментами и одним C-сегментом. Группа генов, контролирующая структуру тяжелых цепей, имеет еще более сложное строение. Наряду с V-, C- и J-сегментами ДНК в их состав входят 20 *D-сегментов* (от англ. *diversity* — разнообразие). Кроме того, имеется *M-сегмент*, который кодирует биосинтез мембраноассоциированного участка молекулы рецепторного иммуноглобулина.

Созревание пре-B-лимфоцитов сопровождается перестройками в их генетическом аппарате. Происходит произвольное сближение

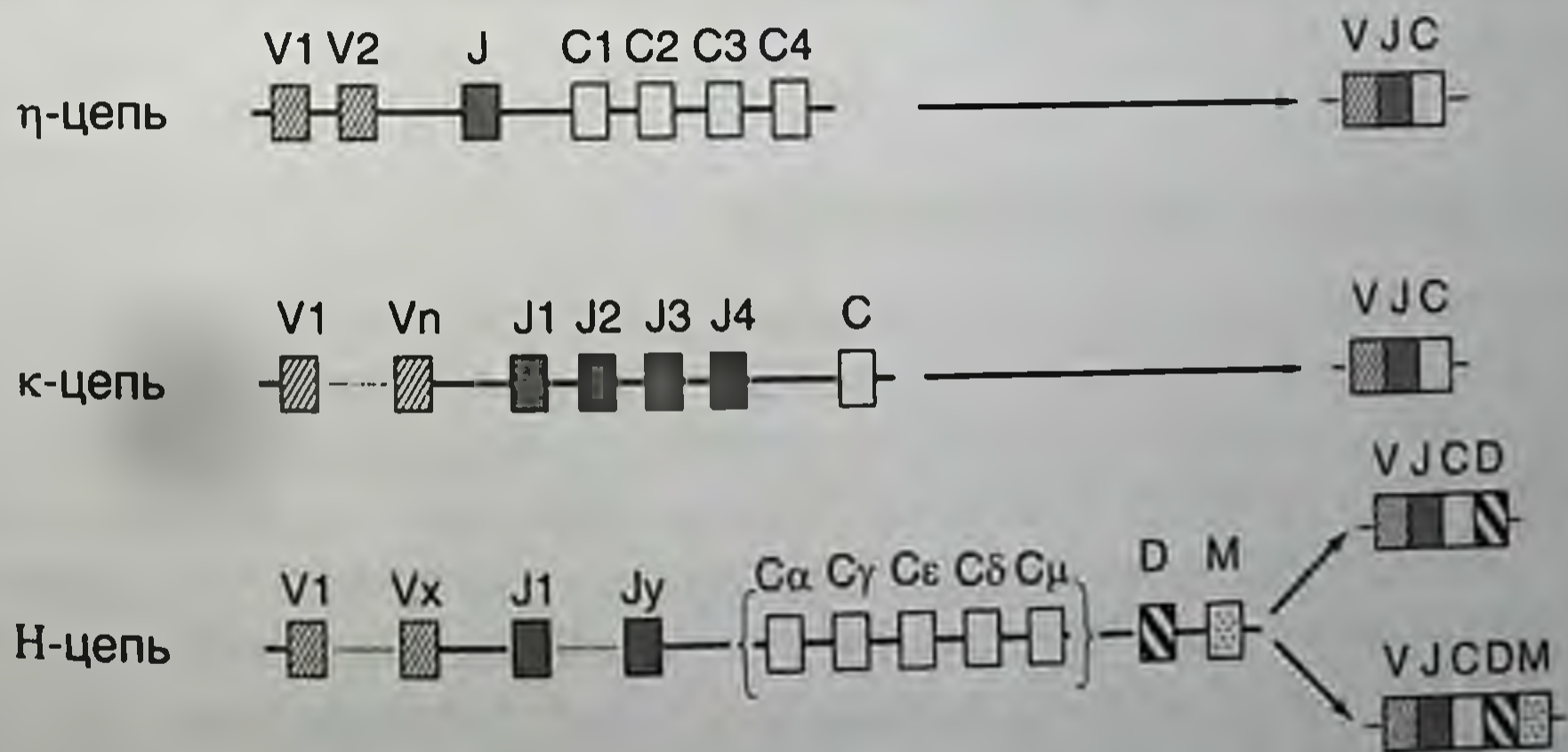


Рис. 10.3. Схема строения генов иммуноглобулинов (см. пояснение в тексте)

отдельных фрагментов ДНК и сборка в пределах соответствующих хромосом единых функциональных генов. Этот процесс называется *сплайсинг* (от англ. *splicing* — сращивание, состыковывание). Пропущенные участки ДНК исключаются из дальнейшего считывания. С функциональных генов в дальнейшем транскрибируется про-мРНК, а затем окончательная мРНК, кодирующая первичную аминокислотную последовательность L- и H-цепей молекулы иммуноглобулина. Параллельно со сплайсингом в отдельных участках V-сегментов генов иммуноглобулинов могут происходить точечные мутации и нематричная достройка олигонуклеотидов. Эти участки ДНК получили название *гипермутабельных областей*.

Сплайсинг и мутационный процесс в генах иммуноглобулина носят случайный характер. Они происходят в каждом лимфоците независимо друг от друга и уникальны, что в бесконечное количество раз повышает разнообразие V-доменов и в конечном счете структуры паратопов и идиотипических антигенных детерминант молекулы иммуноглобулина. Поэтому в организме всегда существуют или в любой момент могут появиться В-лимфоциты, специфичные практически к любому антигену. Этот тезис составляет основу молекулярно-генетической теории происхождения многообразия специфичностей антител, разработанной С. Тонегавой (1983).

Развитие первичного иммунного ответа также сопровождается рекомбинационными перестройками в пределах генов иммуноглобулинов, которая затрагивает С-сегменты. Это проявляется последовательной сменой класса Ig: на ранних этапах дифференцировки В-лимфоциты синтезируют IgM и D, на более поздних — IgG, A или E (редко).

10.1.8. Динамика антителопродукции

Иммунная система реагирует на появление во внутренней среде макроорганизма антигена усилением биосинтеза специфических антител. Это достигается размножением клонов антигенспецифических клеток-антителопродуцентов. При этом антиген выступает в роли как пускового, так и селектирующего фактора: преимущественно активируются клоны с наивысшей специфичностью, то есть наибольшей аффинностью рецепторных молекул иммуноглобулина. Параллельно с размножением идет процесс дифференцировки В-лимфоцитов. Наблюдаются перестройка в геноме клеток и переключение их биосинтеза с крупной

высокоаффинной молекулы IgM на более легкие и экономичные высокоаффинные IgG или IgA.

Антителопродукция в ответ на антигенный стимул имеет характерную динамику. Ее можно проследить на примере сывороточных иммуноглобулинов (рис. 10.4). Выделяют латентную (индуктивную), логарифмическую, стационарную фазы и фазу снижения. В *латентную фазу* антителопродукция практически не изменяется и остается на базальном уровне. В этот период происходят переработка и представление антигена иммунокомпетентным клеткам и запуск пролиферации антигенспецифических клонов клеток-антителопродуцентов. Ввиду того что клетки делятся дихотомически (то есть надвое), прирост их количества происходит в логарифмической зависимости, и поэтому после первых циклов деления оно изменяется незначительно. Параллельно осуществляются дифференцировка пре-В-лимфоцитов в зрелые формы и плазматические клетки и переключение синтезируемых изотипов иммуноглобулина. Во время *логарифмической фазы* наблюдается интенсивный прирост количества антигенспецифических В-лимфоцитов, что находит отражение в существенном нарастании титров специфических антител. В *стационарной фазе* количество специфических антител и синтезирующих их клеток достигает максимума и стабилизируется. Освобождение макроорганизма от антигена устраняет антигенный стимул, поэтому в *фазе снижения* наблюдается постепенное уменьшение титров соответствующих антител.

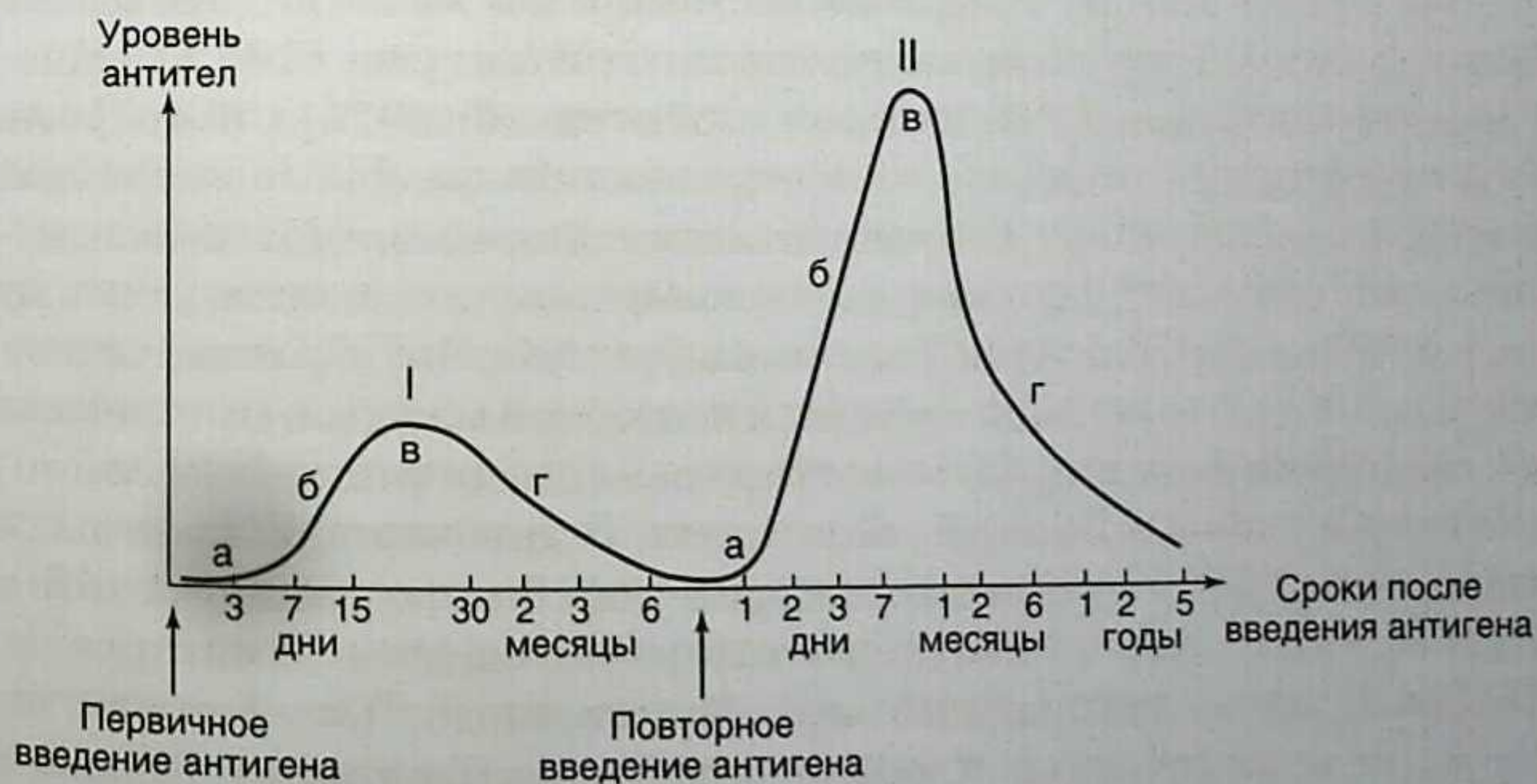


Рис. 10.4. Динамика антителообразования при первичном (I) и вторичном (II) иммунном ответах. Фазы антителообразования: а — латентная; б — логарифмического роста; в — стационарная; г — снижения

Динамика антителообразования существенно зависит от первичности или вторичности контакта с антигеном. При первичном контакте с антигеном развивается *первичный иммунный ответ*. Для него характерны длительные латентная и логарифмическая (7–15 сут) фазы. Первые диагностически значимые титры специфических антител регистрируются на 10–14-е сутки от момента иммунизации. Стационарная фаза продолжается 15–30 сут, а фаза снижения — 1–6 мес.

В течение первичного иммунного ответа происходят созревание, размножение клонов и дифференцировка антигенспецифических В-лимфоцитов, а также переключение биосинтеза иммуноглобулина с изотипа М на изотопы G, A или E. В итоге первичного иммунного реагирования формируются многочисленные клоны антигенспецифических антителопродуцирующих клеток и клеток иммунологической памяти, а во внутренней среде макроорганизма в высоком титре накапливаются специфические IgG и/или IgA. Таким образом обеспечиваются активное противодействие иммунной системы внедрению в макроорганизм антигена и высокая готовность к повторной с ним встрече.

Со временем антительный ответ угасает. Элиминация антигена исключает новое стимулирование к клонообразованию, а появившиеся ранее плазматические клетки имеют короткую продолжительность жизни. Вместе с тем В-лимфоциты иммунологической памяти надолго остаются циркулировать в организме.

Повторный контакт иммунной системы с тем же антигеном ведет к формированию *вторичного иммунного ответа* (см. рис. 10.4). Его логарифмическая фаза отличается более интенсивной динамикой прироста и более высокими титрами специфических антител. Для стационарной фазы и фазы снижения свойственна затяжная динамика (несколько месяцев или даже лет). При вторичном иммунном ответе организм сразу же в подавляющем большинстве синтезирует IgG. Это обусловлено подготовленностью иммунной системы к повторной встрече с антигеном за счет формирования иммунологической памяти (см. раздел 10.5): многочисленные клоны антигенспецифических В-лимфоцитов, оставшиеся после первичного иммунного реагирования, быстро размножаются и обеспечивают интенсивный прирост титра специфических антител.

Для развития гуморального иммунитета слизистых оболочек характерны те же процессы и динамика антителообразования. Однако в данном случае в слизистых оболочках в подавляющем большинстве созревают и размножаются В-лимфоциты, продуцирующие полимерные молекулы IgA.

Явление интенсивного антителообразования при повторном контакте с антигеном широко используется в практических целях, например, в *вакцинопрофилактике*. Для создания и поддержания иммунитета на высоком защитном уровне схемы вакцинации предусматривают многократное введение антигена для формирования и поддержания иммунологической памяти (см. гл. 13).

Этот же феномен используют при получении высокоактивных лечебных и диагностических иммунных сывороток (*гипериммунных*). Для этого животным или донорам производят многократные введения препаратов антигена по специальной схеме.

Динамика и интенсивность антителообразования в значительной степени зависят от иммуногенности антигена: дозы, способа и кратности его введения, а также от состояния макроорганизма. Попытка повторного введения антигена в латентной фазе может привести к иммунологическому параличу — иммунологической неотвечаемости на антиген в течение определенного периода времени.

10.1.9. Теории разнообразия антител

Для объяснения механизмов антителопродукции и разнообразия специфичности антител было предложено множество гипотез и теорий. Только немногие из них получили практическое подтверждение, большинство представляет исторический интерес.

Первую принципиально важную концепцию *боковых цепей* выдвинул П. Эрлих (1898). Согласно этой концепции, клетки органов и тканей имеют на своей поверхности рецепторы, способные в силу химического сродства связывать антиген и инактивировать его. Затем они отделяются с поверхности клетки и замещаются вновь синтезированными. Эта теория заложила основные представления о гуморальном иммунитете и рецепторах иммунокомпетентных клеток.

Заслуживают внимания *инструктивные* или *матричные* теории. Согласно концепциям, предложенным Ф. Брейнлем и Ф. Гауровитцем (1930), Л. Полингом (1940), антиген является матрицей, с которой штампуется молекула антител. Эти теории оказались тупиковыми в связи с открытием Д. Уотсоном и Ф. Криком (1953) механизма кодирования в ДНК генетической информации.

Ряд теорий исходил из предположения о предсуществовании в организме антител практически ко всем возможным антигенам (Ерне Н., 1955; Бернет Ф., 1959). В настоящее время наиболее обоснованной

считается теория Ф. Бернета, которая получила название *клонально-селекционной*. Согласно данной теории, лимфоидная ткань состоит из огромного числа клонов антигенореактивных лимфоцитов, которые специализируются на выработке антител к определенным антигенам. Клоны уже предсуществуют в новорожденном организме. Попавший в организм антиген селективно (избирательно) активизирует специфичный к нему клон лимфоцитов, который размножается и начинает вырабатывать специфичные к данному антигену антитела. Если доза антигена слишком велика, то клон реагирующих на него лимфоцитов устраняется (элиминируется) из организма — так в эмбриональном периоде формируется иммунологическая толерантность (нечувствительность) к собственным антигенам.

Теория Бернета объясняет многие иммунологические реакции (антителообразование, гетерогенность антител, иммунологическую память, толерантность), однако она не способна объяснить происхождение всего многообразия специфичности антител. Бернет предположил, что в организме существует около 10 тыс. клонов специфических антителопродуцирующих клеток. Однако мир антигенов оказался на 2–3 порядка обширнее, и организм отвечает на практически любой из них, в том числе и на искусственно полученный, несуществующий в природе.

Значительную ясность в представление о разнообразии специфичности антител внес С. Тонегава (1983), который дал этому явлению генетическое обоснование. Молекулярно-генетическая теория С. Тонегавы исходит из того, что в генах иммуноглобулинов постоянно происходят мощные рекомбинационные и мутационные процессы. В результате возникает огромное количество вариантов и комбинаций генов, которые кодируют разнообразные специфичности иммуноглобулинов. Каждый клон антителопродуцирующих лимфоцитов обладает своим уникальным вариантом гена иммуноглобулина (см. раздел 10.1.7).

Следует также упомянуть теорию сетевой регуляции иммунной системы. Ее основой является выдвинутая Н. Ерне (1974) идея идиотип-антиидиотипического взаимодействия. Согласно этой теории, иммунная система представляет собой бесконечную цепь взаимодействующих антигенных идиотипов иммуноглобулинов и направленных к ним антиидиотипических антител. Введение антигена вызывает каскадную реакцию образования антител 1-го порядка. Это антитело, действуя как антиген, вызывает образование к своему идиотипу антител 2-го порядка. К идиотипу антител 2-го порядка синтезируются антитела 3-го порядка и т.д. При этом антитело каждого порядка как бы несет внутрен-

ний образ антигена, который передается эстафетно в цепи образования антиидиотипических антител. Доказательством этой теории являются обнаружение антиидиотипических антител, способных вызвать в организме иммунитет к соответствующему антигену, а также существование лимфоцитов, сенсibilизированных к антиидиотипическим антителам. С помощью теории Ерне можно понять формирование иммунологической памяти и возникновение аутоиммунных реакций. Однако она не способна объяснить много других явлений иммунитета: механизм иммунологического распознавания «свой—чужой», управления каскадом идиотип-антиидиотипических реакций и т.д. Данная теория не получила дальнейшего развития.

Выдающийся отечественный иммунолог П.Ф. Здродовский в 1960-е годы сформулировал физиологическую концепцию иммуногенеза — гипоталамо-адреналовую теорию регуляции иммунитета. Основная идея его теории сводилась к тому, что продукция антител подчиняется общим физиологическим законам. Ведущая роль в этом процессе принадлежит гормонам и нервной системе.

10.2. ИММУННЫЙ ФАГОЦИТОЗ

Феномен иммунного фагоцитоза основан на поглощении фагоцитами (см. раздел 8.2.2) иммунных комплексов или опсонизированных объектов. При этом антигенами могут быть как отдельные молекулы или их агрегаты, так и цельные клетки или их фрагменты. Для осуществления иммунного фагоцитоза необходима экспрессия рецепторов к Fc-участку молекулы иммуноглобулина и компонентам комплемента на клеточной мембране фагоцитирующей клетки. Эти рецепторы обеспечивают узнавание фагоцитируемых объектов, которые потом эндоцитируются. Таким образом фагоциты участвуют в элиминации (удалении) антигенов из организма и восстановлении его гомеостаза.

10.3. ОПОСРЕДОВАННЫЙ КЛЕТКАМИ КИЛЛИНГ

Иммунная система располагает независимым от системы комплемента способом уничтожения чужеродных клеток. Эта форма иммунного реагирования осуществляется непосредственно клетками-киллерами и получила название «опосредованный клетками киллинг». Киллинг способны осуществлять активированные фагоциты, Т-киллеры, естественные киллеры и некоторые другие клетки.

Механизм клеточно-опосредованного киллинга достаточно универсален. Киллеры вырабатывают ряд веществ, которые вызывают нарушение целостности клеточной мембраны (или стенки) или индуцируют апоптоз. Они осуществляют свою функцию дистантно (на расстоянии) или при непосредственном контакте. Мишенью для них являются раково-трансформированные, мутантные или зараженные вирусами клетки, грибы, простейшие, гельминты, некоторые бактерии и другие чужеродные клетки.

Способ распознавания киллерами генетической чужеродности клеток-мишеней определяется типом антигенраспознающего рецептора. Различают антителозависимую и антителонезависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность.

10.3.1. Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

АЗКЦТ реализуется благодаря экспрессии на мембране иммунокомпетентных клеток рецепторов к Fc-фрагменту молекулы иммуноглобулина (FcR). Эти рецепторы являются трансмембранными белковыми молекулами и специфичны к определенному изотипу тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, связанной в иммунный комплекс. Распознаются клетки, «меченные» антителами. АЗКЦТ могут осуществлять активированные макрофаги, естественные киллеры и эозинофилы.

Активированные макрофаги (см. раздел 8.2.2) продуцируют перекисные и NO ион-радикалы и ферменты, которые могут поражать мембрану (или стенку) клетки после ее фагоцитирования.

Естественные киллеры с фенотипом CD16⁺CD56^{мало} (кровяные ЕК) ориентируются на клетки, инфицированные различными паразитами (вирусами, бактериями, простейшими) и «помеченные» иммуноглобулинами. При контакте с зараженной клеткой естественный киллер индуцирует разрушение клеток-мишеней осмотическим лизисом (перфорин) или индукцией в них апоптоза (гранзимы, гранулизин).

АЗКЦТ эозинофилов имеет узкую антигельминтную специфичность. Они распознают паразитов, уже помеченных IgA или IgE, и выделяют путем дегрануляции антигельминтные токсичные факторы (ферменты и белковые токсины) и синтезируют цитокины, стимулирующие клеточное звено иммунитета, и липидные медиаторы воспаления.

10.3.2. Антителонезависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

Антителонезависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность осуществляется без участия молекулы иммуноглобулина клетками лимфоидного ряда, несущими иммунорецепторы прямого распознавания. К этой группе клеток относятся Т-киллеры, естественные киллеры с фенотипом CD16–CD56^{много} и Т-хелперы.

Основной клеткой, использующей этот тип механизма, является Т-киллер ($\alpha\beta$ -тип), который с помощью TCR анализирует структуру МНС I класса на мембране клеток собственного организма и определяет его аллогенность. Контакт зрелого активированного Т-киллера с чужеродной клеткой-мишенью запускает их цитотоксические механизмы: осмотический лизис (перфорин) и индукцию апоптоза (гранзимы).

Киллинг клетки-мишени осуществляется в несколько этапов.

- *Установление плотного контакта.* Т-киллер прикрепляется к поверхности клетки-мишени, между клетками образуется тесный контакт, или *интерфейс*, с узким синаптическим пространством.
- *Активация Т-киллера.* TCR эффектора анализирует комплекс МНС I класса. В случае установления его чужеродности Т-киллер активируется и начинает синтезировать токсичные субстанции, которые накапливаются в гранулах. Для обеспечения строго направленного действия происходит полярное перераспределение внутриклеточных органелл киллера: гранулы, содержащие токсичные субстанции, и аппарат Гольджи перемещаются в сторону контакта.
- *Экзоцитоз токсических субстанций.* Содержимое гранул выделяется в узкое синаптическое пространство между клетками путем экзоцитоза.
- *Токсическое воздействие.* В результате воздействия перфорина в мембране клетки-мишени образуются поры, способные вызвать осмотический лизис. Через поры внутрь клетки проникают гранзимы и гранулизин, которые запускают апоптоз.

Точный механизм специфического распознавания Т-киллером мембранных антигенов клетки-мишени и направленный токсический удар предотвращают ошибочный лизис собственных нормальных клеток.

Естественные киллеры, имеющие фенотип CD16–CD56^{много}, получили название «тканевые», так как они не циркулируют в организме,

а накапливаются в определенных зонах: портальных воротах печени, децидуальной оболочке беременной матки и других органах, содержащих забарьерные антигены. Мишенью для этих киллеров служат активированные лимфоциты, обнаруживаемые в пограничной зоне, для которых характерен синтез в большом количестве Fas-рецептора. Экспрессируемый на клеточной мембране тканевых естественных киллеров Fas-лиганд связывается с Fas-рецептором и индуцирует в активированном лимфоците апоптоз. Описанный механизм цитотоксичности позволяет элиминировать из организма лимфоциты, позитивно прореагировавшие на пищевые, эмбриональные и забарьерные аллоантигены. Это позволяет избежать развития пищевой аллергии, невынашивания беременности или аутоиммунного поражения тканей.

Подобный эффект также свойствен Т-киллерам и T_H -хелперам. Элиминация активированных лимфоцитов путем индукции в них апоптоза — один из эффективных путей иммунорегуляции в периферических тканях.

10.4. РЕАКЦИИ ГИПЕРЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

В ряде случаев введение антигена в организм может индуцировать аномальную реакцию, которая имеет черты патологического процесса. Эта форма реагирования, основу которой составляют естественные физиологические механизмы, получила название «аллергия» (от греч. *allos* — иной и *ergon* — действие). Антигены, вызывающие аллергические реакции, получили название «аллергены», а наука, которая изучает аллергию, — «аллергология».

Понятие «аллергия» было предложено французским ученым К. Пирке (1906). Он понимал аллергию как измененную реакцию макроорганизма на повторное введение антигена и относил к ней как гипер-, так и гипореактивность. По современному определению, аллергия — это повышенная извращенная специфическая реакция макроорганизма на повторный контакт организма с аллергеном.

Для формирования аллергии необходима предварительная сенсibilизация макроорганизма к аллергену, или алергизация. Ее можно вызвать очень малыми, субиммунизирующими дозами антигена (например, введением морской свинке 0,000001 мл лошадиной сыворотки), которые получили название «сенсibilизирующие». Повторное введение того же антигена через определенный промежуток времени вызы-

вает аллергическую реакцию. Дозу антигена, вызывающую собственно аллергическую реакцию, называют «разрешающей».

В развитии аллергической реакции выделяют три стадии: иммунологическую, патохимическую и патофизиологическую. В течение *иммунологической стадии* в ответ на аллерген образуются антигенчувствительные клетки, специфические антитела и иммунные комплексы. *Патохимическая стадия* характеризуется образованием медиаторов воспаления и биологически активных аминов, которые играют основную роль в механизме аллергических реакций. В течение *патофизиологической стадии* проявляется клиническая картина аллергической реакции. Как правило, клинические проявления аллергии полиморфны.

Первая классификация аллергий была предложена Р. Куком в 1947 г. В ее основу было положено время развития аллергической реакции. Была выделена *гиперчувствительность немедленного типа* (ГНТ) и *гиперчувствительность замедленного типа* (ГЗТ). Сравнение свойств ГНТ и ГЗТ представлено в табл. 10.2.

К ГНТ были отнесены аллергические реакции, проявляемые уже через 20–30 мин после повторной встречи с аллергеном, тогда как реакции ГЗТ возникают через 6–8 ч и позже. Механизмы ГНТ связаны с выработкой специфических антител (опосредованы В-звеном иммунитета). ГНТ можно перенести от больного здоровому введением специфических антител или клона антигенореактивных В-лимфоцитов. Возможна специфическая десенсибилизация пациента. ГЗТ опосредована клеточным звеном иммунитета. Перенос алергизации от больного здоровому возможен только с лейкоцитарным пулом. Специфическая терапия, как правило, оказывается неэффективной.

Таблица 10.2. Свойства гиперчувствительности немедленного и замедленного типов (по Куку, 1947)

Показатель	ГНТ	ГЗТ
Время развития реакции	Менее 20–30 мин	Более 6–8 ч
Фактор индукции	Антитела	Т-лимфоциты
Фактор переноса в интактный организм	Пассивный (антителами) и адаптивный (иммунокомпетентными клетками)	Адаптивный (иммунокомпетентными клетками)
Десенсибилизация	Возможна	Невозможна

ГНТ была впервые описана в 1902–1905 гг. французскими учеными Ш. Рише и Ж. Портье и русским ученым Г.П. Сахаровым. Они показали, что ГНТ имеет стереотипное течение, которое может заканчиваться смертью. Она может проявляться в виде анафилаксии, атопических болезней, сывороточной болезни, феномена Артюса (см. раздел 11.4.3). Явление ГЗТ было установлено Р. Кохом (1890). Этот тип аллергии может протекать в виде контактной аллергии, реакции на кожно-аллергическую пробу, замедленной аллергии к белкам.

Изучение молекулярных механизмов аллергии привело к созданию Джеллом и Кумбсом в 1968 г. новой классификации. В соответствии с ней различают 4 основных типа аллергии:

- I тип — анафилактический;
- II тип — цитотоксический;
- III тип — иммунокомплексный;
- IV тип — опосредованный клетками.

Первые три типа относятся к ГНТ, четвертый — к ГЗТ. Сравнительная характеристика механизмов указанных типов аллергии приведена в табл. 10.3.

Ведущую роль в запуске ГНТ играют антитела (IgE, G и M), а ГЗТ — лимфоидно-макрофагальная реакция.

Аллергическая реакция I типа связана с IgE и IgG4, названных «реагинами». Они обладают цитофильностью — сродством к тучным клеткам и базофилам: соединение IgE или G4 с высокоаффинным FcR на поверхности этих клеток формирует специфический рецепторный комплекс, связывание с которым аллергена вызывает дегрануляцию базофила и тучной клетки — залповый выброс биологически активных соединений (гистамин, гепарин и др.), содержащихся в гранулах, в межклеточное пространство. Действие этих веществ практически мгновенно, но кратковременно, включает ряд органотканевых патофизиологических реакций, связанных с сокращением гладкой мускулатуры кишечника, бронхов, мочевого пузыря и активацией секреторных, эндотелиальных и некоторых других клеток. В результате развиваются бронхоспазм, вазодилатация, отек и прочие симптомы, характерные для анафилаксии. Вырабатываемые цитокины стимулируют клеточное звено иммунитета к образованию T₂-хелперов и эозинофилогенез.

Наиболее ярко аллергическая реакция I типа проявляется клинической картиной анафилактического шока. Инъекция сыворотки крови больного аллергией I типа здоровому лицу переносит ему специфиче-

Таблица 10.3. Классификация аллергических реакций по патогенезу (по Джеллу и Кумбсу, 1968)

Тип реакции	Фактор патогенеза	Механизм патогенеза	Клинический пример
I. Анафилактический (ГНТ)	IgE, IgG4	Образование рецепторного комплекса IgE (G4)–FcR тучных клеток и базофилов. Взаимодействие эпитопа аллергена с рецепторным комплексом. Активация тучных клеток и базофилов. Высвобождение медиаторов воспаления и других биологически активных веществ	Анафилаксия. Анафилактический шок. Поллинозы. Крапивница
II. Цитотоксический (ГНТ)	IgM, IgG	Выработка цитотоксических антител. Активация антителозависимого цитолиза	Лекарственная волчанка. Аутоиммунная гемолитическая болезнь. Аутоиммунная тромбоцитопения
III. Иммунокомплексный (ГНТ)	IgM, IgG	Образование избытка иммунных комплексов. Отложение иммунных комплексов на базальных мембранах, эндотелии и в соединительнотканной строме. Активация АЗКЦТ. Запуск иммунного воспаления	Сывороточная болезнь. Системные заболевания соединительной ткани. Феномен Артюса. «Легкое фермера»
IV. Клеточно-опосредованный (ГЗТ)	T-лимфоциты	Сенсибилизация T-лимфоцитов. Активация макрофага. Запуск иммунного воспаления	Кожно-аллергическая проба. Контактная аллергия. Белковая аллергия замедленного типа

Примечание. Описание аллергических болезней см. в разделе 11.4.3.

ский реагин и делает на определенное время сенсибилизированным. На этом феномене основан механизм пробы Прауснитца–Кюстнера, ранее использовавшейся для диагностики аллергии: контакт тест-пациента с аллергеном после введения ему реагинов вызывал у него анафилаксию.

Аллергическая реакция II типа предполагает наличие цитотоксических антител (IgG, IgM), направленных к поверхностным структурам (антигенам) клеток макроорганизма. Эти антитела связываются с клеточными мембранами клеток-мишеней и запускают различные механизмы антителозависимой цитотоксичности, которая сопровождается соответствующими клиническими проявлениями. Классическим примером служит гемолитическая болезнь в результате резус-конфликта или переливания иногруппной крови.

Аллергическая реакция III типа обусловлена цитотоксическим действием избыточного количества иммунных комплексов, образующихся в организме пациента после введения массивной дозы антигена. Чрезмерное количество циркулирующих иммунных комплексов не может быть быстро утилизировано стандартными механизмами фагоцитирующих клеток. Фиксируясь на эндотелии сосудов и клубочков почек, в других тканях, иммунные комплексы инициируют АЗКЦТ, сопровождаемую воспалительной реакцией. Клинические проявления аллергической реакции III типа, как правило, имеют отсроченную манифестацию, иногда на срок более 7 сут. Тем не менее этот тип реакции относят к ГНТ. Реакция может проявляться как одно из осложнений применения иммунных гетерологичных сывороток с лечебно-профилактической целью (*сывороточная болезнь*), а также при вдыхании белковой пыли (*«легкое фермера»*).

ГЗТ представляет собой лимфоидно-макрофагальную реакцию, которая развивается в результате активации макрофагов под влиянием лимфоцитов, сенсibilизированных к аллергену. Основу ГЗТ составляют нормальные механизмы иммунного воспаления. Активация макрофага возможна в результате контактного или цитокинового воздействия. Контактная стимуляция — результат рецептор-лигандного взаимодействия макрофага, несущего рецепторную молекулу CD40, и T_1 -хелпера, экспрессирующего CD40-лиганд. В исключительных случаях эту функцию может выполнять T_2 -хелпер. Цитокиновая активация макрофага осуществляется ИФН- γ , который продуцируют T_1 -хелперы, Т-киллеры или естественные киллеры. Кроме того, макрофаг может быть стимулирован ЛПС (через CD14-рецепторную молекулу). Активация макрофага резко повышает его эффективность в осуществлении АЗКЦТ и иммунного фагоцитоза, то есть деструкции и элиминации антигена (см. также раздел 11.4.3).

Лабораторная диагностика аллергии при аллергических реакциях I типа основана на выявлении суммарных и специфических реагинов

(IgE, IgG4) в сыворотке крови пациента. При аллергических реакциях II типа в сыворотке крови определяют цитотоксические антитела (антиэритроцитарные, антилейкоцитарные, антитромбоцитарные и др.). При аллергических реакциях III типа в сыворотке крови выявляют иммунные комплексы. Для обнаружения аллергических реакций IV типа применяют кожно-аллергические пробы, которые широко используют в диагностике некоторых инфекционных заболеваний, паразитозов и микозов (туберкулез, лепра, бруцеллез, туляремия и др.).

Лечение аллергии основано на десенсибилизации макроорганизма путем индукции низкодозовой иммунологической толерантности (см. раздел 10.6), а также устранения аллергена из организма плазмаферезом, гемосорбцией, введением иммунных сывороток. В тяжелых случаях применяют глюкокортикоидную терапию.

Реакции гиперчувствительности имеют также большое значение и в норме. Их механизмы лежат в основе доиммунного воспаления, которое способствует локализации инфекционного агента или иного антигена в пределах определенных тканей и формированию полноценной иммунной реакции защитного характера, а также иммунного воспаления, обеспечивающего в итоге репаративные процессы.

Гиперчувствительность следует отличать от гиперергической реакции, которая может быть обусловлена как вариациями нейрогуморальной регуляции, так и некоторыми врожденными особенностями. Например, новозеландскую черную линию мышей от рождения отличает гипериммуноглобулинемия, а среди рыжеволосых людей часто наблюдается эозинофилия.

10.5. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ

При повторной встрече с антигеном организм в норме формирует вторичный иммунный ответ — более активную и быструю иммунную реакцию. Этот феномен получил название «иммунологическая память». Иммунологическая память имеет высокую специфичность в отношении конкретного антигена, распространяется на гуморальное звено иммунитета, обусловлена В-лимфоцитами и длительно сохраняется. Иммунологическая память — гарантия защиты организма от повторных антигенных интервенций.

Существует два механизма формирования иммунологической памяти. Один из них предполагает длительное сохранение антигена в организме, что поддерживает в напряжении иммунную систему: за счет

персистирующих вирусов кори, полиомиелита, ветряной оспы и некоторых других патогенов либо долгоживущих дендритных АЗКЦТ, способных длительно сохранять и презентировать антиген.

Другой механизм предусматривает образование специальных *В-лимфоцитов иммунологической памяти* в процессе развития в организме продуктивного иммунного ответа. Эти клетки отличаются высокой специфичностью к конкретной антигенной детерминанте и большой продолжительностью жизни (до 10 лет). Они активно рециркулируют в организме, распределяясь в тканях и органах, что обеспечивает постоянную готовность к вторичному иммунному ответу.

Феномен иммунологической памяти широко используется в практике вакцинации людей для создания напряженного и продолжительного иммунитета. Осуществляют это 2–3-кратными прививками при первичной вакцинации и периодическими повторными введениями вакцинного препарата — *ревакцинациями* (см. гл. 13).

Однако феномен иммунологической памяти имеет и отрицательные стороны. Например, повторная попытка трансплантировать уже однажды отторгнутую ткань вызывает быструю и бурную реакцию — *криз отторжения*.

10.6. ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ТОЛЕРАНТНОСТЬ

Иммунологическая толерантность — отсутствие специфического продуктивного иммунного ответа организма на антиген в связи с неспособностью его распознавания. В отличие от иммуносупрессии иммунологическая толерантность предполагает изначальную ареактивность к определенному антигену.

Собственно феномен иммунологической толерантности был открыт в 1953 г. независимо чешским ученым М. Гашеком и группой английских исследователей во главе с П. Медавара. М. Гашек в опытах на куриных эмбрионах, а Медавар на новорожденных мышах показали, что организм становится нечувствительным к антигену при его введении в эмбриональном или раннем постнатальном периоде.

Иммунологическую толерантность вызывают антигены, которые получили название «*толорогены*». Ими могут быть практически все вещества, однако наибольшей толорогенностью обладают полисахариды.

Иммунологическая толерантность бывает врожденной и приобретенной. Примером *врожденной толерантности* является отсутствие реакции иммунной системы на свои собственные антигены. *Приобре-*

тенную толерантность можно создать путем введения антигена в эмбриональном периоде или в первые дни после рождения индивидуума.

Иммунологическая толерантность отличается специфичностью — она направлена к строго определенным антигенам. По степени распространенности различают поливалентную и расщепленную толерантность. *Поливалентная иммунологическая толерантность* возникает одновременно на все антигенные детерминанты, входящие в состав конкретного антигена. Для *расщепленной*, или *моновалентной*, толерантности характерна избирательная невосприимчивость каких-то отдельных антигенных детерминант.

Степень проявления иммунологической толерантности существенно зависит от ряда свойств макроорганизма и толерогена. Так, на проявление толерантности влияют возраст и состояние иммунореактивности организма. Иммунологическую толерантность легче индуцировать в эмбриональном периоде и в первые дни после рождения, лучше всего она проявляется у животных со сниженной иммунореактивностью и с определенным генотипом.

Успешность индукции иммунологической толерантности зависит от степени чужеродности, природы, дозы и продолжительности воздействия антигена на организм. Наибольшей толерогенностью обладают наименее чужеродные по отношению к организму антигены, имеющие малую молекулярную массу и высокую гомогенность. Легче всего формируется толерантность на тимуснезависимые антигены, например бактериальные полисахариды.

Различают высокодозовую и низкодозовую толерантность. *Высокодозовую толерантность* вызывают введением большого количества высококонцентрированного антигена. При этом наблюдается прямая зависимость между дозой вещества и производимым им эффектом. *Низкодозовая толерантность*, наоборот, вызывается очень малым количеством высокогомогенного молекулярного антигена. Соотношение доза/эффект в этом случае имеет обратную зависимость.

В эксперименте толерантность возникает через несколько дней, а иногда часов после введения толерогена и, как правило, проявляется в течение всего времени, пока он циркулирует в организме. Эффект ослабевает или прекращается с удалением из организма толерогена. Обычно иммунологическая толерантность наблюдается непродолжительное время — всего несколько дней. Для ее пролонгирования необходимы повторные инъекции препарата.

Механизмы толерантности многообразны и до конца не расшифрованы. Известно, что ее основу составляют нормальные процессы регуляции иммунной системы. Выделяют три наиболее вероятные причины развития иммунологической толерантности:

- элиминация из организма антигенспецифических клонов лимфоцитов;
- блокада биологической активности иммунокомпетентных клеток;
- быстрая нейтрализация антигена антителами.

Элиминации, или делеции, подвергаются, как правило, клоны аутореактивных Т-лимфоцитов на ранних стадиях их онтогенеза. Активация антигенспецифического рецептора незрелого Т-лимфоцита индуцирует в нем апоптоз. Этот феномен, обеспечивающий в организме ареактивность к аутоантигенам, получил название «центральная толерантность». *Локальную толерантность* к забарьерным антигенам обеспечивают тканевые естественные киллеры, устраняющие сенсibilизированные к этим антигенам Т-лимфоциты в пограничных зонах.

Основная роль в блокаде биологической активности иммунокомпетентных клеток принадлежит иммуноцитокинам. Воздействуя на соответствующие рецепторы, они способны вызвать ряд негативных эффектов. Например, пролиферацию Т- и В-лимфоцитов активно тормозит ТФР-β. Дифференцировку T₀-хелпера в T₁ можно заблокировать с помощью ИЛ-4, -13, а в T₂-хелпер — ИФН-γ. Биологическая активность макрофагов ингибируется ИЛ-4, -10, -13, ТФР-β и др.

Биосинтез в В-лимфоците и его превращение в плазмоцит подавляются свободно циркулирующими IgG. Быстрая инактивация молекул антигена антителами предотвращает их связывание с рецепторами иммунокомпетентных клеток — элиминируется специфический активирующий фактор.

Феномен иммунологической толерантности имеет большое практическое значение. Он используется для решения многих важных проблем медицины, таких как пересадка органов и тканей, подавление аутоиммунных реакций, лечение аллергий и других патологических состояний, связанных с агрессивным поведением иммунной системы.

Толерантность можно искусственно отменить. Для этого необходимо активировать иммунную систему адьювантами, интерлейкинами или переключить направленность ее реакции иммунизацией модифицированными антигенами. Другой путь — удалить из организма толероген, сделав инъекцию специфических антител или путем иммуносорбции.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Назовите класс иммуноглобулина, который проходит через плаценту:

1. IgA.
2. IgG.
3. IgM.
4. IgE.

Б. Назовите класс иммуноглобулина, который служит показателем острой инфекции:

1. IgA.
2. IgG.
3. IgM.
4. IgE.

В. Назовите класс иммуноглобулина, который обеспечивает местный иммунитет:

1. IgA.
2. IgG.
3. IgM.
4. IgE.

Г. Отметьте свойства, характерные для IgE:

1. Связывает комплемент.
2. Обладает цитотоксичностью к тучным клеткам и базофилам.
3. Участвует в развитии гиперчувствительности I типа.
4. Проходит через плаценту.

Д. Назовите класс иммуноглобулина, обладающий наибольшей авидностью:

1. IgA.
2. IgG.
3. IgM.
4. IgE.

Е. Назовите клетки, обеспечивающие АЗКЦТ:

1. Кровяные естественные киллеры.
2. Т-киллеры.
3. Эозинофилы.
4. Активированные макрофаги.

Ж. Отметьте типы гиперчувствительности, классифицированные по Джеллу и Кумбсу, в которых принимает участие комплемент:

1. I тип (анафилактический).
2. II тип (цитотоксический).

3. III тип (иммунокомплексный).

4. IV тип (ГЗТ).

3. Назовите процесс, защищающий организм от повторных антигенных интервенций:

1. Иммунологическая толерантность.

2. Иммунологическая память.

3. Гиперчувствительность.

4. Иммунологический паралич.

И. К аллергологу обратилась пациентка, у которой через 48 ч после употребления косметического крема кожа лица воспалилась и на ней появились везикулы. Этим кремом пациентка пользовалась и ранее. Врач диагностировал развитие контактной гиперчувствительности. Объясните механизм развития контактной гиперчувствительности. Назовите тип, к которому она относится.

К. Резус-отрицательной матери, беременной первой беременностью резус-положительным плодом, сразу после родов была введена антирезус-сыворотка. Объясните необходимость проведения этой врачебной манипуляции.

Л. Иммунная толерантность проявляется отсутствием специфического продуктивного иммунного ответа на антиген в связи с неспособностью его распознавания. Назовите антигены, к которым легче всего формируется толерантность.

Глава 11

ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЛОКАЛИЗАЦИЯХ И СОСТОЯНИЯХ

11.1. ОСОБЕННОСТИ МЕСТНОГО ИММУНИТЕТА

Местный иммунитет формируется в пределах кожных покровов и слизистых оболочек, непосредственно контактирующих с окружающей средой и являющихся наиболее вероятными входными воротами экзогенных антигенов, и защищает их. Факторы местного иммунитета могут действовать экстракорпорально — выходить за пределы макроорганизма на поверхность кожных покровов и выделяться или мигрировать в секрет слизистых оболочек. Концепцию местного иммунитета впервые высказал А.М. Безредка (1919).

Система местного иммунитета функционирует достаточно обособленно и имеет ряд особенностей. Между общим и местным иммунитетом существует тесная связь. Во-первых, система общего иммунитета служит резервным источником факторов защиты. Во-вторых, при развитии инфекционного процесса отчетливо прослеживается переход местной иммунной реактивности в общую. В-третьих, между этими двумя системами постоянно осуществляется обмен факторами иммунитета (антитела, клоны антигенореактивных лимфоцитов и др.), что важно для распространения по всему организму иммунологической памяти (см. раздел 10.5).

11.1.1. Иммунитет кожи

Кожа выполняет функцию механической защиты. Она предохраняет макроорганизм от внешних воздействий и в случае повреждения способна самостоятельно восстановить свою целостность. Она также

служит фактором физико-химической защиты — продукты потовых и сальных желез обладают бактерицидностью. Кроме того, в коже эффективно действует система местного иммунитета.

Внешний слой кожи, *эпидермис*, формируется эпителиальными клетками — *кератиноцитами*. В его толще встречаются дендритные клетки двух типов: *клетки Лангерганса* и *Гринштейна*. В дерме и эпидермисе локализуются лимфоциты и тучные клетки. Лимфоидная популяция представлена в основном Т-хелперами и Т-киллерами. В дерме и эпидермисе происходит дифференцировка незрелых Т-лимфоцитов в зрелые клетки.

Кератиноциты — немигрирующие эпителиальные клетки, выполняющие в коже барьерную и иммунорегуляторную функции. Они экспрессируют МНС II класса, костимулирующие молекулы CD40, 80, 86 и Fas-лиганд. Клетки синтезируют широкий спектр цитокинов: ИЛ-1, -6, -7, -8, ФНО, ТФР- β , ГМ-КСФ, ИФН- α , - β и др.

Неактивированные кератиноциты обеспечивают только барьерную функцию. Повреждающие воздействия (травма, ожог, воспаление и пр.) или иммуноцитокиновая стимуляция активируют кератиноциты, и они становятся способными презентировать антиген Т-хелперам, запускать антительный иммунный ответ и подавлять местную клеточную пролиферацию иммунных лимфоцитов.

Клетки Лангерганса, или белые отростчатые эпидермоциты, — мигрирующие дендритные клетки миелоидной природы. Происходят из клеток костного мозга или циркулирующих моноцитов. Продолжительность жизни около 20 сут, чувствительны к ультрафиолетовому излучению. Экспрессируют на клеточной мембране МНС II класса, CD4, 40, синтезируют ИЛ-1, -12, ИФН- α , - β , ГМ-КСФ, хемокины.

В дерме клетки Лангерганса способны захватывать и процессировать антиген, но не могут выполнять функции АЗКЦТ, так как не экспрессируют костимулирующие факторы — молекулы CD80, 86. После активации продуктами воспаления или цитокинами захватившая антиген клетка Лангерганса мигрирует с током лимфы в регионарные лимфатические узлы. Там она дифференцируется в зрелую дендритную клетку — интердигитальную клетку лимфатических узлов и экспрессирует недостающие молекулы CD80, 86, а также начинает синтезировать цитокины. Интердигитальная клетка теряет способность захватывать и процессировать антиген, но при этом превращается в эффективную АЗКЦТ. Она активирует Т-хелперы и запускает специфический антительный иммунный ответ и формирование иммунологической памяти.

Разобшение в пространстве и времени индукции в коже специфического иммунного ответа сопрягает систему местного и общего иммунитета, обеспечивает генерализацию защитного реагирования и формирование иммунологической памяти. В случае инактивации клеток Лангерганса (например, ультрафиолетовым облучением) функции АЗКЦТ в коже начинают выполнять кератиноциты и клетки Гринштейна, однако они потенцируют иммуносупрессию — угнетение кожной иммунореактивности.

Антитела в коже не имеют большого значения, развивается преимущественно клеточный иммунный ответ. Напряженность местного иммунитета в коже, так же как и интегральное состояние клеточного звена иммунитета в целом, характеризуется кожноаллергическими пробами.

11.1.2. Иммунитет слизистых оболочек

Сами эпителиальные клетки представляют собой хороший механический барьер, препятствующий инвазии патогенов. Секрет слизистых оболочек также выполняет функции физико-химического барьера (см. раздел 8.2.1.1), а нормальная микрофлора, населяющая слизистые оболочки, — биологического, так как обеспечивают колонизационную резистентность (см. раздел 8.2.1.2). Система местного иммунитета слизистых оболочек отличается развитой лимфоидной тканью и высокой насыщенностью иммунокомпетентными клетками.

Лимфоидный состав слизистых оболочек имеет характерные особенности, обусловленные его формированием. Различают раннюю (реликтовую) и позднюю (современную) компоненты.

Ранняя компонента представлена $\gamma\delta$ T- и V δ 1-лимфоцитами, которые рано отселяются в периферические лимфоидные образования прямо из костного мозга и в дальнейшем развиваются автономно от центральных органов иммунной системы. Антигенные рецепторы этих клеток отличаются относительно низкой аффинностью, но обладают достаточно широким спектром чувствительности. Это позволяет им обеспечить первую линию защиты от микробной агрессии и необходимую отсрочку для активации поздней компоненты.

Клетки *поздней компоненты* развиваются под контролем центральных органов иммунной системы. К их числу относятся традиционные α , β T- и CD5⁻ В-лимфоциты, обладающие высокой специфичностью и аффинностью рецепторного аппарата. Эти клетки обеспечивают высокоэффективный специфический иммунный ответ и формируют вторую линию иммунной защиты в слизистых оболочках.

Наиболее яркий пример организации иммунной защиты слизистых оболочек — высокоразвитая лимфоидная система желудочно-кишечного тракта, в которой различают две функциональные зоны — индуктивную и эффекторную. Индуктивная зона сформирована лимфоидными фолликулами (в том числе аппендикса, пейеровых бляшек), в которых идентифицируются области преимущественного расселения Т- и В-лимфоцитов. В В-области располагается герминативный (зародышевый) центр, где размножаются и созревают В-лимфоциты, в основном IgA-продуценты. Т-область на 2/3 представлена Т-киллерами и на 1/3 — Т-хелперами. Обнаруживаются также макрофаги и дендритные клетки. В индуктивной зоне осуществляются презентация и распознавание антигена, запуск иммунного реагирования, формирование клонов антигенспецифических В-лимфоцитов, дифференцировка В-лимфоцитов в IgA-продуценты.

Помощь в презентации антигена оказывают М-клетки эпителия. Они захватывают молекулы антигена в просвете органа и путем транзитоза переносят его к АЗКЦТ.

Эфферентная зона охватывает околоэпителиальную область и *lamina propria*. Лимфоидная популяция околоэпителиальной области на 3/4 состоит из Т-киллеров и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Они обеспечивают функцию иммунологического надзора за быстроразмножающимся эпителием. Антиген могут презентировать энтероциты, которые в активированном состоянии экспрессируют МНС II класса, синтезируют цитокины и хемокины (ИЛ-8). Однако энтероциты являются неклассическими АЗКЦТ.

В *lamina propria* обнаруживается много Т- и В-лимфоцитов, макрофагов и естественных киллеров. На долю Т-лимфоцитов приходится до 60% лимфоидной популяции. На 2/3 это Т-хелперы, остальные клетки — Т-киллеры, в том числе $\gamma\delta$ Т-лимфоциты. Доля В-лимфоцитов составляет 40%, половина из них — это В1-клетки. Подавляющее большинство антителопродуцентов (80%) синтезирует полимерные молекулы IgA. В этой области развивается антительный ответ. Идет интенсивный биосинтез иммуноглобулинов, в основном класса А, которые действуют как в пределах самих тканей, так и в составе секрета слизистых оболочек, куда поступают в результате направленного транспорта (секреторный иммуноглобулин) или диффузии.

Фагоцитирующие клетки, содержащиеся в собственной пластинке, способны совершать маятникообразные перемещения. Привлеченные хемоаттрактантами, они могут выходить через эпителий в просвет по-

лого органа (кишки, бронха, ротовой полости и т.д.) и возвращаться обратно.

В пределах слизистых оболочек обнаруживается много тучных клеток и эозинофилов. Синтезируя вазоактивные амины (тучные клетки), токсины (эозинофилы), ферменты, иммуноцитокнины, липидные медиаторы и другие биологически активные вещества, они участвуют в регуляции иммунной и воспалительной реакций в пределах ткани. В случае гиперпродукции IgE и особой генетической предрасположенности тучные клетки потенцируют развитие аллергической реакции I типа (анафилаксии).

Особенности иммунитета ротовой полости

Система иммунной защиты ротовой полости удачно сочетает разнообразные неспецифические и специфические факторы, обеспечивающие эффективную защиту от кариезогенных и иных болезнетворных микробов.

Клетки слизистой оболочки выполняют функции механического барьера. Особое значение имеет антимикробная активность слюны. В течение суток в организме взрослого человека вырабатывается до 2 л слюны — секрета с выраженной ферментативной активностью. Это не только мощный физико-химический, но и биологический барьер. Слюна содержит широкий набор веществ, обладающих выраженными бактерицидными свойствами: лизоцим, лактоферрин, лактопероксидазу, отдельные компоненты комплемента и пр. В слюне также постоянно присутствует до 200 тыс. фагоцитирующих клеток. В соединительно-тканной строме ротовой полости также обнаруживаются клеточные элементы врожденной резистентности: активно мигрирующие тканевые макрофаги, фибробласты, гранулоциты и тучные клетки.

Система специфической иммунной защиты ротовой полости представлена мощными миндалинами глоточного кольца, хорошо развитой системой лимфоидного дренирования в подчелюстных, подъязычных, околоушных и шейных лимфатических узлах. В тканях обнаруживаются лимфоидные скопления, а в слюне — лимфоциты и широкий спектр иммуноглобулинов. Количественно доминирует IgA. Здесь его содержится заметно больше, чем в сыворотке крови. Наибольшую функциональную нагрузку несет секреторная форма IgA. Содержание IgM, G и E в слюне несколько меньше, чем в сыворотке крови. Снижение содержания в слюне иммуноглобулинов, особенно IgA, чревато гнойно-воспалительными или аллергическими заболеваниями слизистой оболочки ротовой полости.

11.2. ОСОБЕННОСТИ ИММУНИТЕТА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ СОСТОЯНИЯХ

Макроорганизм имеет широкий спектр средств защиты своей целостности и поддержания гомеостаза. Однако для минимизации энергетических и пластических затрат макроорганизм для устранения конкретного антигена использует лишь наиболее эффективные механизмы и факторы защиты. Поэтому при воздействии различных по природе и свойствам антигенов иммунное реагирование макроорганизма имеет свои особенности.

11.2.1. Особенности иммунитета при бактериальных инфекциях

Иммунная реакция макроорганизма в ответ на бактериальную инфекцию в значительной степени определяется факторами патогенности микроба и в первую очередь его способностью к токсинообразованию. Различают иммунитет *антибактериальный* — против структурных компонентов бактериальной клетки, и *антитоксический* — против белковых токсинов.

Основными факторами антибактериальной защиты служат антитела и фагоциты. Антитела эффективно инактивируют биологически активные молекулы бактериальной клетки (токсины, ферменты агрессии и др.), маркируют их, запускают антителозависимый бактериолиз и иммунный фагоцитоз. Фагоциты непосредственно осуществляют фагоцитоз, в том числе иммунный, антителозависимый бактериолиз и внеклеточный киллинг патогена с помощью ион-радикалов и ферментов. Важная роль в борьбе с грамположительными микробами принадлежит лизоциму, а с грамотрицательными — комплементу (альтернативный путь активации), кроме того, существенное значение имеют белки острой фазы (С-реактивный и маннозосвязывающий протеин).

Ряд бактерий, относящихся к факультативным внутриклеточным паразитам, отличается повышенной устойчивостью к действию комплемента, лизоцима и фагоцитов (незавершенный фагоцитоз). К их числу относятся микобактерии, иерсинии, бруцеллы, сальмонеллы и некоторые другие. В такой ситуации макроорганизм вынужден переключать нагрузку на клеточное звено иммунитета, что ведет к алергизации организма по механизму ГЗТ. Особое значение приобретают активированные макрофаги и естественные киллеры, осуществляющие АЗКЦТ, а также $\gamma\delta$ Т-лимфоциты.

Напряженность специфического антибактериального иммунитета оценивают в серологических тестах по титру или динамике титра специфических антител, а также по состоянию клеточной иммунореактивности (например, по результатам кожно-аллергической пробы).

11.2.2. Особенности противовирусного иммунитета

Особенности иммунной защиты макроорганизма при вирусных инфекциях обусловлены двумя формами существования вируса: внеклеточной и внутриклеточной. Основными факторами, обеспечивающими противовирусный иммунитет, являются специфические антитела, Т-киллеры, естественные киллеры, ИФН и сывороточные ингибиторы вирусных частиц.

Специфические противовирусные антитела способны взаимодействовать только с внеклеточным вирусом, так как у них нет доступа внутрь живой клетки. Антитела нейтрализуют вирусные адгезины и нейраминидазы, препятствуя адсорбции вирусов на клетках-мишенях и их инфицированию. Они также связывают вирусные белки и нуклеиновые кислоты, образовавшиеся после разрушения зараженных вирусами клеток. Сформированные иммунные комплексы элиминируются путем иммунного фагоцитоза. Специфическое связывание антител с вирусными белками, экспрессированными на цитоплазматической мембране инфицированных клеток, индуцирует естественные киллеры к АЗКЦТ (см. раздел 10.3.1).

Клетки, инфицированные вирусом и приступившие к его репликации, экспрессируют вирусные белки на цитоплазматической мембране в составе молекул антигенов гистосовместимости — МНС I класса (см. раздел 8.1.4.2). Измененная структура МНС I класса этих антигенов гистосовместимости является маркером для Т-киллеров, которые распознают зараженные вирусом клетки и уничтожают их (см. раздел 10.3.2).

Мощным противовирусным свойством обладают ИФН- α и - β (см. раздел 8.2.3.4). Он не действует непосредственно на внутриклеточный вирус, а связывается с рецептором на мембране клетки и подавляет в ней все биосинтетические процессы.

Сывороточные ингибиторы неспецифически связываются с вирусной частицей и нейтрализуют ее, препятствуя тем самым адсорбции вируса на клетках-мишенях.

Напряженность противовирусного иммунитета оценивают преимущественно в серологических тестах по нарастанию титра специфических антител в парных сыворотках в процессе болезни. Определяют также концентрацию ИФН в сыворотке крови.

11.2.3. Особенности противогрибкового иммунитета

Антигены грибов имеют относительно низкую иммуногенность: они практически не индуцируют антителообразование (титры специфических антител остаются низкими), но стимулируют клеточное звено иммунитета. Основными действующими факторами противогрибкового иммунитета являются активированные макрофаги, которые осуществляют АЗКЦТ грибов.

При микозах наблюдается алергизация макроорганизма. Кожные и глубокие микозы сопровождаются, как правило, ГЗТ. Грибковые поражения слизистых оболочек дыхательных и мочеполовых путей вызывают алергизацию по механизму ГНТ (реакция I типа). Напряженность противогрибкового иммунитета оценивается по результатам кожно-алергических проб с грибковыми алергенами.

11.2.4. Особенности иммунитета при протозойных инвазиях

Паразитарная инвазия сопровождается формированием в макроорганизме гуморального и клеточного иммунитета. В крови определяются специфические антитела классов М и G, которые чаще всего не обладают протективным свойством. Однако они активируют АЗКЦТ с участием макрофагов, а в случае внутриклеточного паразитирования — естественных киллеров и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Паразитарные инвазии сопровождаются алергизацией макроорганизма по механизму ГЗТ.

Характер противопаразитарного иммунитета определяется биологическими особенностями паразита. Многие из них обладают высокой антигенной изменчивостью, что позволяет им избегать действия факторов иммунитета. Например, каждой стадии развития малярийного плазмодия соответствуют свои специфические антигены.

Напряженность противопаразитарного иммунитета оценивается в серологических тестах по титру специфических антител и в кожно-алергических пробах с протозойным антигеном.

11.2.5. Особенности противоглистного иммунитета

Ведущую роль в осуществлении иммунной защиты макроорганизма от глистной инвазии играют эозинофилы, которые осуществляют АЗКЦТ. Эти клетки распознают паразитов, отмеченных специфическими IgE или IgA. Активированный эозинофил выделяет путем дегрануляции ряд токсичных субстанций (ферменты, белковые токсины), губительно действующих на гельминты.

Антигены гельминта, связываясь также с рецепторными комплексами тучных клеток слизистой оболочки, вызывают их дегрануляцию. Экскретированные биологически активные соединения вызывают интенсивную перистальтику, удаляющую паразита или его останки из просвета кишки.

Эозинофилы и тучные клетки синтезируют цитокины и липидные медиаторы, потенцирующие воспалительную реакцию в месте внедрения гельминта. Глистная инвазия сопровождается аллергизацией в основном по механизму ГЗТ.

11.2.6. Трансплантационный иммунитет

Макроорганизм формирует иммунную реакцию, направленную против пересаженной в него чужеродной ткани (трансплантата). Это является основной проблемой, препятствующей успешной пересадке органов и тканей. Иммунная реакция на чужеродные клетки и ткани обусловлена тем, что в их составе содержатся генетически чужеродные для организма антигены, которые получили название «трансплантационные» или «антигены гистосовместимости» (см. раздел 9.1.4.2). Наиболее полно они представлены на цитоплазматической мембране клеток.

Реакция отторжения не возникает в случае полной совместимости донора и реципиента по антигенам гистосовместимости — такое возможно у однояйцовых близнецов. Выраженность реакции отторжения во многом зависит от степени чужеродности, объема трансплантируемого материала и состояния иммунореактивности реципиента.

На чужеродные трансплантационные антигены организм реагирует факторами клеточного и гуморального иммунитета. Основным являются Т-киллеры и специфические антитела. Т-киллеры осуществляют антителонезависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность тканей трансплантата (реакция «реципиент против трансплантата») или реципиента (реакция «трансплантат против реципиента»). Специфические антитела, которые образуются к антигенам трансплантата, запускают комплемент- или клеточно-опосредованный цитолиз трансплантата.

Возможен адаптивный перенос трансплантационного иммунитета с помощью активированных лимфоцитов или со специфической антисывороткой от сенсibilизированной особи интактному макроорганизму.

Механизм иммунного отторжения пересаженных клеток и тканей имеет две фазы. В первой фазе вокруг трансплантата и сосудов наблю-

дается скопление иммунокомпетентных клеток (лимфоидная инфильтрация), в том числе Т-киллеров. Во второй фазе происходит деструкция клеток трансплантата Т-киллерами, активируются макрофагальное звено, естественные киллеры, специфический антителогенез. Затем возникают иммунное воспаление, тромбоз кровеносных сосудов, нарушается питание трансплантата и происходит его гибель. Разрушенные ткани утилизируются фагоцитами. Ткани трансплантата реагируют на ткани реципиента подобным же образом. Однако иммунная реакция трансплантата слабее, так как ограничена его ресурсами.

В процессе реакции отторжения формируется клон клеток иммунологической памяти. Повторная попытка пересадки тех же органов и тканей вызывает вторичный иммунный ответ, который протекает очень бурно и быстро заканчивается *кризом отторжения*.

11.2.7. Иммуитет против новообразований

Противоопухолевый иммунитет имеет свои особенности, связанные с низкой иммуногенностью раковых клеток. Эти клетки практически не отличаются от нормальных, интактных морфологических элементов собственного организма. Специфический антигенный репертуар опухолевых клеток также скуден. В число опухоль-ассоциированных антигенов (см. раздел 9.1.4.3) входят группа раково-эмбриональных антигенов, продукты онкогенов, некоторые вирусные антигены и гиперэкспрессируемые нормальные белки. Слабому иммунологическому распознаванию опухолевых клеток способствуют отсутствие воспалительной реакции в месте онкогенеза, их иммуносупрессивная активность — биосинтез ряда негативных цитокинов (ТФР- β и др.), а также экранирование раковых клеток противоопухолевыми антителами.

Механизм противоопухолевого иммунитета до сих пор слабо изучен. Считается, что основную роль в нем играют активированные макрофаги, определенное значение имеют также естественные киллеры. Защитная функция гуморального иммунитета во многом спорная — специфические антитела могут экранировать антигены опухолевых клеток, не вызывая их цитолиза.

В последнее время получила распространение иммунодиагностика рака, которая основана на определении в сыворотке крови раково-эмбриональных и опухоль-ассоциированных антигенов. Так, в настоящее время удается диагностировать некоторые формы рака печени, желудка, кишечника, простаты и др.

Между состоянием иммунной защиты и развитием новообразований существует тесная связь. Злокачественные новообразования наблюдаются чаще у индивидуумов с иммунодефицитами и престарелых. Иммуносупрессивная химиотерапия также нередко сопровождается пролиферативными процессами. Поэтому в лечении опухолей нашли применение иммуномодуляторы (ИЛ, ИФН), а также адьюванты (мурамилдипептиды, вакцина БЦЖ и др.).

11.2.8. Иммунология беременности

Беременность напрямую сопряжена с феноменом иммунологической толерантности. В организме беременной формируется целый комплекс факторов, обеспечивающих ареактивность иммунной системы матери к гетероантигенам плода. Во-первых, синцитиотрофобласт плаценты «невидим» для рецепторов иммунокомпетентных клеток. Он не экспрессирует классические молекулы гистосовместимости, а только непалиморфные, трудно распознаваемые. Во-вторых, синцитиотрофобласт синтезирует иммуносупрессорные цитокины (ИЛ-4, -10, ТФР-β). В-третьих, в децидуальной оболочке беременной матки располагаются CD16⁻ CD56^{много} естественные киллеры (см. раздел 10.3.2), которые устраняют активированные аллоантигенами плода лимфоциты путем индукции у них апоптоза.

11.3. ИММУННЫЙ СТАТУС И ЕГО ОЦЕНКА

Иммунный статус — это совокупность лабораторно-диагностических показателей, характеризующих структурно-функциональное состояние иммунной системы индивидуума. Изучение иммунного статуса — важная составная часть клинической иммунологии. Задачей клинической иммунологии являются диагностика, лечение и профилактика заболеваний иммунной системы. Оценка иммунного статуса проводится в целях иммунодиагностики, то есть идентификации нарушенного звена иммунитета, от которого зависит развитие заболевания. Диагностику проводят на основании анамнеза (частые инфекционные заболевания, опухоли, аутоиммунные процессы, аллергия и др.), клинических симптомов (оппортунистическая инфекция, аллергия, опухоли, состояние лимфатических узлов, пороки развития и др.), а также результатов лабораторных тестов и морфологических (гистохимических) исследований органов иммунной системы.

Впервые методология диагностики заболеваний иммунной системы была разработана Р.В. Петровым и соавт. (1984). В соответствии с этими методическими рекомендациями («Оценка иммунного статуса человека») все методы иммунодиагностики подразделены на тесты I и II уровня (табл. 11.1). Тесты I уровня направлены на идентификацию грубых поломок иммунной системы и могут быть выполнены в любой клинико-диагностической лаборатории. Тесты II уровня обеспечивают углубленное изучение функционального состояния ее отдельных звеньев. Они выполняются уже в специализированных иммунологических лабораториях.

В настоящее время для оценки иммунного статуса рекомендуется следующий минимальный набор тестов (Хаитов Р.М. и др., 2009):

Таблица 11.1. Тесты для оценки иммунного статуса

Тесты I уровня	Тесты II уровня
Определение лейкоформулы, количества, Т- и В-лимфоцитов в периферической крови, абс. и %	Гистохимический анализ лимфоидных органов
Определение активности лизоцима и комплемента	Анализ поверхностных маркеров моноклеарных клеток с использованием моноклональных антител
Определение уровня сывороточных IgM, G, A, D, E	Бласттрансформация В- и Т-лимфоцитов
Определение фагоцитарной активности лейкоцитов	Определение цитотоксичности
Кожные аллергические тесты	Определение активности ферментов, ассоциированных с иммунной недостаточностью
Рентгенография и рентгеноскопия лимфоидных органов, а также других внутренних органов (прежде всего легких) в зависимости от клинических показаний	Определение синтеза и секреции цитокинов
	Определение уровня гормонов тимуса
	Анализ респираторного взрыва фагоцитов
	Определение различных компонентов комплемента
	Анализ смешанных клеточных культур

- *фагоцитоз*: определение поглотительной и бактерицидной (внутриклеточной гибели поглощенных микробов) активности лейкоцитов периферической крови человека; идентификация образования лейкоцитами активных форм кислорода;
- *комплемент*: определение гемолитической активности сыворотки (плазмы) крови;
- *иммуноглобулины*: определение в сыворотке (плазме) уровня IgG, IgA, IgM и IgE;
- *субпопуляции лимфоцитов*: количественное и процентное содержание в периферической крови CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ (или CD20⁺) лимфоцитов, а также при показаниях CD16⁺- и HLA-DR⁺-лимфоцитов.

11.4. ПАТОЛОГИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Выделяют 4 группы заболеваний иммунной системы:

- 1) иммунодефициты;
- 2) аутоиммунные;
- 3) аллергические;
- 4) лимфопролиферативные.

11.4.1. Иммунодефициты

Иммунодефициты — патологические состояния, обусловленные дефектом одного или нескольких звеньев иммунитета, проявляющиеся нарушениями иммунного статуса.

Различают первичные (врожденные) и вторичные (приобретенные) иммунодефициты.

Клиническая картина различных иммунодефицитов сходная. Иммунодефициты не имеют характерных клинических симптомов и сопровождаются частыми инфекционными заболеваниями и осложнениями, гематологическими нарушениями, желудочно-кишечными расстройствами, аутоиммунными процессами, опухолями, аллергическими реакциями, а также врожденными пороками развития.

Иммунодефициты являются причиной проявления многих болезней и патологических состояний, поэтому требуют профилактики и лечения с помощью иммуностропных препаратов. Лица с недостаточностью иммунитета умирают в раннем детском возрасте от тяжелой рецидивирующей оппортунистической инфекции.

Первичные врожденные иммунодефициты

Первичные, или врожденные, иммунодефицитные синдромы и заболевания — довольно редкое явление, с частотой менее 1:100 тыс. населения. Причинами врожденных иммунодефицитов могут быть удвоение хромосом, точечные мутации и другие повреждения генома в эмбриональном периоде. Первичные иммунодефициты проявляются на ранних этапах постнатального периода и имеют различный модус наследования. Это органические нарушения, связанные с недостаточностью фагоцитоза, системы комплемента, гуморального и клеточного иммунитета, а также с комбинированной иммунной недостаточностью.

Недостаточность фагоцитоза обусловлена уменьшением числа фагоцитов или их функциональной неполноценностью. Периодическая нейтропения лежит в основе циклических нарушений гемопоэза. Этот процесс проявляется в уменьшении количества гранулоцитов и изменении количества моноцитов. Встречаются также нарушения синтеза перекисных и NO'-радикалов и процесса переваривания патогена.

Недостаточность комплемента встречается редко. Чаще наблюдается дефект синтеза компонентов комплемента, обусловленный наследственной недостаточностью ингибитора эстеразы C1, которая клинически проявляется ангионевротическим отеком. Низкая концентрация ингибитора эстеразы C1 допускает гиперактивацию C1 с последующим запуском классического пути. Дефект C3, наоборот, тормозит образование мембраноатакующего комплекса и лизис клетки-мишени.

Недостаточность гуморального иммунитета проявляется дис- и агаммаглобулинемией. Агаммаглобулинемия обусловлена нарушением синтеза иммуноглобулинов или их ускоренным распадом. При ней в крови больных отсутствуют иммуноглобулины и нарушен антитоксический и противомикробный иммунитет, где ведущая роль принадлежит антителам. Дисгаммаглобулинемия обусловлена селективным дефицитом одного или нескольких классов иммуноглобулинов. При этом общий уровень сывороточных иммуноглобулинов может оставаться в пределах нормы. Чаще всего встречаются селективный дефицит IgG или IgA при одновременно высоком уровне IgM. Наблюдаются также дефицит отдельных субклассов иммуноглобулинов и дефект легких цепей иммуноглобулинов.

Недостаточность клеточного иммунитета обусловлена нарушением функциональной активности Т-клеток. Описаны также Т-клеточные

иммунодефициты, такие как алимфоцитоз (синдром Нозелофа), синдром Ди Джорджи (врожденная аплазия тимуса и парашитовидных желез), иммунодефицит при синдроме Дауна, иммунодефицит при карликовом росте. У лиц с такой патологией нарушен противовирусный, противогрибковый, противоопухолевый, трансплантационный иммунитет. Первыми признаками Т-клеточного иммунодефицита являются микоз, рецидивирующие вирусные инфекции, осложнения после вакцинации живыми вакцинами (полиомиелитной, БЦЖ и др.).

Комбинированные иммунодефициты развиваются при сочетании нарушений Т- и В-звеньев иммунной системы. Это наиболее тяжело протекающие иммунодефициты. Комбинированные формы встречаются чаще, чем селективные, как правило, они связаны с нарушением центральных органов иммунной системы. При таких расстройствах иммунитета наблюдаются частые бактериальные и вирусные инфекции, микотические поражения. Иммунный дефект реализуется на уровне стволовой клетки и обусловлен блоком Т- и В-клеточной дифференцировки, первичным Т-клеточным иммунодефицитом, при котором снижение иммунорегуляторной функции приводит к развитию В-клеточного иммунодефицита.

Вторичные иммунодефициты

Вторичные иммунодефициты, в отличие от первичных, развиваются у лиц с нормально функционировавшей от рождения иммунной системой. Они формируются под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов на уровне фенотипа и обусловлены нарушением как структуры, так и функции иммунной системы. При вторичных иммунодефицитах могут поражаться Т- и В-система иммунитета, факторы неспецифической резистентности, возможны их сочетания. Вторичные иммунодефициты встречаются значительно чаще, чем первичные. Функциональные нарушения преходящи и поддаются иммунокоррекции, то есть восстановлению нормальной деятельности иммунной системы.

Вторичные иммунодефициты развиваются после перенесенных инфекций (особенно вирусных) и инвазий (протозойные и гельминтозы), при стрессе, ожоговой болезни, уремии, опухолях, нарушении обмена веществ и истощении, дисбиозах, тяжелых травмах и обширных хирургических операциях, особенно под общим наркозом, облучении, действии химических веществ, приеме некоторых лекарственных препаратов и пр.

11.4.2. Аутоиммунные болезни

Аутоиммунные болезни — болезни, ведущая роль в патогенезе которых принадлежит аутосенсibilизации на антигены собственного организма — ткани и клетки. В основе этих патологических состояний лежат аутоиммунные реакции с забарьерными или перекрестно реагирующими антигенами, образование «запретных» клонов иммунокомпетентных клеток, реагирующих с собственными нормальными тканями и др.

Различают органоспецифические и неорганоспецифические аутоиммунные заболевания. При *органоспецифических* болезнях аутоантитела направлены к антигенам клеток и тканей одного органа. Обычно это забарьерные антигены, врожденная толерантность к которым нарушена. При *органонеспецифических* болезнях аутоантитела реагируют со структурным элементом клеток и тканей всего организма. В настоящий момент известно много болезней, в патогенезе которых лежат аутоиммунные процессы, обусловленные рядом причин, в том числе агрессивностью иммунной системы, направленной на образование аутоантител к антигенам собственных клеток и тканей.

Часто можно обнаружить нормальные аутоантитела, не вызывающие видимых симптомов заболевания. Они встречаются у совершенно здоровых людей, например ревматоидный, антинуклеарные факторы. Обнаружение антител к аутоантигенам еще не позволяет сделать вывод об их патогенетической значимости. Для подтверждения этого необходимо выявить и спровоцировать болезнь соответствующим антигеном в эксперименте на животных. Аутоиммунные заболевания человека представлены в табл. 11.2.

Аутоиммунные реакции наблюдаются в норме у здоровых людей. Они протекают непрерывно, и их действие сводится к удалению отмирающих, стареющих, больных, разрушенных молекул, клеток и тканей. Эти реакции полезны для организма, так как выполняют функцию «мусорщиков», и не перерастают в болезнь.

11.4.3. Аллергические болезни

Реакции гиперчувствительности как одна из форм иммунного реагирования, в норме направлена на локализацию и устранение антигена. Однако при определенных условиях эти реакции могут стать ведущим звеном патогенеза аллергических реакций. Последние по механизму подразделяют на четыре типа, что важно с клинико-диагностической точки зрения.

Таблица 11.2. Аутоиммунные заболевания

Болезни с установленной иммунопатологической природой	Болезни с предполагаемой иммунопатологической природой
Гемолитическая анемия, обусловленная тепловыми аутоантителами	Первичный билиарный цирроз печени
Гемолитическая анемия с холодowymi гемагглютинаинами	Пузырчатка обыкновенная и пемфигоид
Иммунологически обусловленное бесплодие	Идиопатическая болезнь Аддисона
Тиреоидит Хашимото	Идиотипический гипопаратиреоз
Иммунотромбоцитопения	Поствакцинальный энцефалит
Холодовая гемоглобинурия	Узелковый периартериит
Симпатическая офтальмия	Дерматомиозит или полимиозит
Пернициозная анемия	Склеродермия
Аутоиммунные нарушения свертываемости крови	Неспецифический язвенный колит
Хронический активный гепатит	Гипертиреоз
Системная красная волчанка	
Ревматоидный артрит	
Хронический гломерулонефрит	

Реакции I типа (анафилактические)

Анафилаксия представляет собой иммунную реакцию, для которой необходимы специфические цитотфильные антитела и клетки-эффекторы (базофилы и тучные клетки). Она проявляется в виде местной (на коже и слизистых оболочках) или системной (анафилактический шок) реакции. Местные анафилактические реакции в зависимости от локализации проявляются сыпью, вазомоторным ринитом, бронхиальной астмой, кишечными расстройствами. Системная анафилактическая реакция может протекать в любом органе, поскольку тучные клетки и базофилы встречаются в организме повсеместно. У человека чаще поражаются артериолы и бронхи. Клинически эти реакции проявляются приступами бронхиальной астмы, сенной лихорадкой, крапивницей.

Анафилактическую реакцию могут вызывать ксеногенные лечебные сыворотки, пыльца растений, природные яды (пчел, ос, змей), некоторые

лекарственные препараты (β -лактамы антибиотики, белковые гормоны и пр.), а также некоторые вакцины.

Реакции II типа (цитотоксические)

Аллергические реакции II типа опосредованы антителами к поверхностным антигенам клетки или к вторично связанным с клеточной поверхностью антигенам. Ведущая роль принадлежит антителам, способным активировать систему комплемента (IgM, IgG1–3), или АЗКЦТ.

Наибольшее значение для клинической картины имеют те гуморальные цитотоксические реакции, которые затрагивают эритроциты. Реакция, направленная против эритроцитов другого индивида, называется изоиммунной. У каждого человека в сыворотке имеется высокий титр антител к тем антигенам системы АВ0 и резус-фактор, которые отсутствуют на собственных эритроцитах. При переливании несовместимой крови эти изогемагглютинины вызывают цитотоксическую иммунную реакцию, которая сопровождается гемолизом. При повторных беременностях резус-положительным плодом у резус-отрицательных женщин в крови образуются антирезус-IgG, способные проходить через плаценту и оказывать цитотоксическое действие на эритроциты плода. Это ведет к развитию гемолитической болезни новорожденных. При аутоиммунных гемолитических анемиях образуются аутоантитела к антигенам собственных эритроцитов, которые вызывают аутоиммунный гемолиз. Некоторые низкомолекулярные вещества, например определенные лекарственные препараты, могут сорбироваться на мембране эритроцитов и вызвать образование антител с развитием гемолитической анемии. Так действует хинин, фенацетин, салицилаты, стрептомицин, пенициллин, цефалоспорины, сульфаниламиды и др.

Объектом цитотоксического действия могут стать и другие форменные элементы крови (гранулоциты, тромбоциты). Поэтому, помимо гемолитической анемии, могут наблюдаться лейкопения, тромбоцитопения, агранулоцитоз.

Реакции III типа (иммунокомплексные)

Аллергические реакции III типа опосредованы иммунными комплексами, которые образуются в большом количестве и откладываются в тканях, на эндотелии сосудов и базальных мембранах. Биологические свойства таких комплексов обусловлены соотношением антигена и антител. Иммунные агрегаты, образовавшиеся при значительном избыт-

ке антигена, обладают токсическими свойствами. В местах отложения таких иммунных комплексов происходит высвобождение биологически активных медиаторов-анафилотоксинов (С3а, С3б, С5а), которые повышают проницаемость сосудов, привлекают полиморфноядерные лейкоциты и способствуют развитию воспаления. Погибшие гранулоциты выделяют протеолитические ферменты и разрушают ткани собственного организма.

При отложении иммунных комплексов на эндотелии сосудов возникает васкулит. Типичный пример — гломерулонефрит. Решающее значение при данном виде патологии имеют сам факт персистенции антигена и его концентрация.

Отдельный случай васкулита — сывороточная болезнь, которая развивается через 8—10 дней после однократного введения гетерологичной сыворотки и сопровождается повышением температуры тела, увеличением селезенки и лимфатических узлов, лейкоцитозом и снижением активности комплемента. Симптомы сывороточной болезни сохраняются до тех пор, пока в кровотоке находится антиген, и исчезают с его элиминацией. Подобная воспалительная реакция наблюдается в респираторном тракте при воздействии некоторых ингаляционных аллергенов («легкие фермера», «легкие птичника»).

Множественная инъекция антигена в одно и то же место макроорганизма вызывает феномен Артюса (некротические разрушения ткани в месте введения). При этом иммунная реакция первично направлена только на чужеродный антиген, но высвобождение лизосомальных ферментов в местах отложения иммунных комплексов приводит к вторичному повреждению тканей.

Реакции IV типа (опосредованные Т-лимфоцитами)

Некоторые антигены преимущественно стимулируют клеточное звено иммунитета: макрофаги, Т-лимфоциты, что протекает в форме ГЗТ.

ГЗТ может вызвать введение лекарственных препаратов или контакт с некоторыми низкомолекулярными веществами. Наиболее часто контактную аллергию вызывают синтетические моющие средства, соединения хрома, никеля, ртути, парафенилендиамин, ДНХБ, многие консерванты и медикаменты. ГЗТ сопровождает хронические инфекционные процессы, вырабатывается на низкоиммуногенные антигены (липоидные, полисахаридные) и вещества, обладающие эффектом поликлональных стимуляторов.

Морфологическая картина при ГЗТ носит воспалительный характер. Ее типичным примером может служить реакция на туберкулиновую пробу (Манту). Внутрикожное введение туберкулина сенсibilизированному индивидууму вызывает покраснение и отек на месте инъекции, достигающие максимума через 24–48 ч с момента введения аллергена. Гистологически обнаруживают скопление макрофагов и лимфоцитов.

11.4.4. Лимфопролиферативные заболевания

Лимфопролиферативные заболевания — патологические процессы, обусловленные неконтролируемым размножением лимфоцитов.

В зависимости от морфологии клеточных элементов различают В- и Т-клеточные лимфопролиферативные процессы и лимфогранулематоз или болезнь Ходжкина. Процессы, возникающие в пределах костного мозга, относят к лейкозам, за его пределами — к лимфомам. В случае распространения лимфомы на костный мозг процесс обозначают как лимфому с лейкемизацией.

Ведущим звеном патогенеза являются хромосомные aberrации в лимфоидных клетках, сопровождаемые гиперэкспрессией клеточного протоонкогена *c-myc*, что ведет к выходу клетки из состояния покоя. Пусковыми факторами могут быть разнообразные воздействия среды обитания: ионизирующая радиация, канцерогены, инфекционные агенты (чаще вирусы).

11.5. ИММУНОКОРРЕКЦИЯ

Иммунокоррекция — раздел клинической иммунологии, изучающий способы и методы профилактики и лечения болезней или состояний, связанных с нарушением функции иммунной системы.

Препараты, влияющие на иммунный статус и применяемые для иммунокоррекции, называют «иммуномодуляторы». К настоящему времени известны сотни таких препаратов (подробнее см. гл. 13).

Цель оптимальной иммунокоррекции — нормализация функции иммунной системы путем ее активации или подавления в зависимости от показателей иммунного статуса. С этой целью применяют препараты специфического и неспецифического воздействия: иммуностимуляторы, иммунодепрессанты, вакцины, препараты иммуноглобулинов, адъюванты, гормоны и пр.

Для создания активного иммунитета к возбудителям инфекционных болезней вводят вакцины, а пассивный иммунитет создают с помощью иммунных сывороток или препаратов иммуноглобулинов. При аллергических состояниях, некоторых иммунопатологических процессах и при трансплантации органов и тканей необходимо подавить иммунную систему, поэтому применяют иммунодепрессанты. Специфическим супрессорным эффектом обладают антилимфоцитарная сыворотка, толерогены и некоторые цитокины. В качестве неспецифического фактора применяют цитостатики, гормоны и антиметаболиты.

Задания для самоподготовки (самоконтроля)

А. Укажите формы иммунитета, в которых принимает участие комплемент:

1. Иммунитет слизистых оболочек.
2. Антитоксический.
3. Антибактериальный гуморальный.
4. Гуморальный противовирусный.

Б. Укажите формы иммунитета, в которых принимают участие Т-киллеры:

1. Трансплантационный.
2. Противоопухолевый.
3. Противовирусный.
4. Антибактериальный.

В. Укажите формы инфекций, сопровождаемых развитием ГЗТ:

1. Глистная инвазия.
2. Грибковая.
3. Вирусная.
4. Паразитарная.
5. Бактериальная.

Г. Отметьте компоненты противоглистного иммунитета:

1. IgE.
2. Т-киллер.
3. Комплемент.
4. Эозинофилы.

Д. Пациент страдает рецидивирующими вирусными инфекциями и микозом, который не поддается лечению. Врач предположил наличие у него иммунодефицита. Назовите пораженное звено иммунного ответа.



ИММУНОДИАГНОСТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ

12.1. РЕАКЦИИ АНТИГЕН-АНТИТЕЛО И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Одним из основных свойств иммуноглобулинов является способность их паратопа связываться с эпитопом антигена и обратимо образовывать иммунный комплекс (см. раздел 11.1.5). Иммунный комплекс формируется за счет слабых связей, что делает его неустойчивым и чувствительным к различным воздействиям, и он легко диссоциирует на исходные компоненты.

В естественной среде макроорганизма данное взаимодействие происходит в системе коллоидного раствора в физиологических условиях. Тем не менее возможно подобрать искусственные условия, при которых данное равновесие будет устойчиво смещаться вправо. Это используется при конструировании иммунодиагностических реакций.

К иммунодиагностическим относят *серологические* (от англ. *serum* — сыворотка) и *диагностические реакции* — это различные варианты взаимодействия антитела и антигена, при которых один из ингредиентов неизвестен. Они позволяют определить уровень либо антител в сыворотке крови больного с помощью известных антигенов, либо идентифицировать антиген по известной специфичности антител. Так, в частности, проводят *серологическую идентификацию* микроорганизмов, определяют группу и т.д.

Серологические реакции различаются по регистрируемому эффекту и технике постановки. Выделяют тесты, основанные на образовании визуально различимого макромолекулярного комплекса (реакция агглютинации, преципитации), с биологическим эффектом (реакция нейтрализации), реакции лизиса с участием комплемента, с использованием «меченых» антител или антигенов (иммунофлюоресцентный, иммуноферментный, радиоиммунологический методы).

Реакция между антигеном и антителом проходит две фазы — специфическую и неспецифическую. В *специфическую* фазу происходит бы-

строе специфическое связывание активного центра антитела с эпитопом соответствующего антигена. Затем наступает *неспецифическая* фаза, которая может проявляться разнообразными физическими явлениями. Реакция проводится в растворе солей и при pH , близких к физиологическим.

12.2. РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция агглютинации — простой по постановке иммунологический тест, при котором в результате связывания антител (агглютининов) с антигенами (агглютиногенами) образуется хорошо различимый глазом макромолекулярный иммунный комплекс из агрегированных частиц. Важным условием реакции является то, что один из ее компонентов — либо антитела, либо антиген — присутствуют в растворимой, молекулярной форме, а другой — в нерастворимой, корпускулярной (клетка, частица).

При соединении обоих компонентов реакции образуется равномерная суспензия. При положительном результате антитела «склеивают» корпускулы (частицы) антигена и возникает расслоение суспензии на прозрачную часть (коллоидный раствор) и густую компоненту (муть). В случае отрицательного результата суспензия сохраняется либо частицы под действием гравитации концентрируются в пологом месте.

Существуют различные варианты постановки реакции агглютинации: прямая, непрямая и пассивная (рис. 12.1).

При *прямом* варианте антитела находятся в коллоидном растворе, а антиген — в виде частицы. Пример — широко распространенная проба на группу крови — *реакция гемагглютинации*. Эта реакция основана на



Рис. 12.1. Схема реакции пассивной гемагглютинации для поиска антител: 1 — эритроциты с адсорбированными на их поверхности известными антигенами; 2 — антитела из сыворотки больного

агглютинации эритроцитов антителами иммунной сыворотки к антигенам групп крови А(II), В(III). Отрицательным контролем являются сыворотка, не содержащая антител, то есть сыворотка АВ(IV) группы крови, и антигены эритроцитов группы 0(I), поскольку они не несут необходимых антигенов. При положительном результате кровь расслаивается на плазму и сгусток форменных элементов.

Другим вариантом прямой реакции агглютинации является ориентировочный тест «на стекле», который применяют для идентификации выделенного от больного возбудителя. При постановке реакции на предметное стекло наносят диагностическую агглютинирующую сыворотку, в которой суспендируют культуру микроба. Реакция считается положительной, если в капле появляется хлопьевидный осадок. В отрицательном контроле иммунную сыворотку меняют на физиологический раствор натрия хлорида. Аналогичным образом проводят определение специфичности неизвестных антител относительно идентифицированной культуры микроба.

Применение в реакции агглютинации «неочищенных», *неадсорбированных агглютинирующих сывороток* может давать ложные результаты из-за наличия перекрестно реагирующих антител к общим антигенам. Поэтому пользуются *адсорбированными агглютинирующими сыворотками*, из которых последние удалены путем адсорбции на родственных бактериях. В таких сыворотках сохраняются антитела, специфичные только к данной бактерии.

Для определения в сыворотке крови больного количества антител к возбудителю используют *развернутую реакцию* агглютинации. При ее постановке в пробирках производят серийные разведения сыворотки крови больного и затем добавляют в пробирки равное количество взвеси убитых микробов. После инкубации определяют наибольшее разведение сыворотки, при котором произошла агглютинация, то есть титр сыворотки. Антитела, направленные к О-антигену, дают мелкозернистый осадок, а к Н-антигену — крупнохлопчатый.

Непрямой вариант, или *реакция Кумбса*, предполагает в дополнение к прямому использованию «вторых» антииммуноглобулиновых антител, которые усиливают результат реакции. Так определяют резус-фактор, содержание которого на поверхности эритроцита слишком мало, а также наличие неполных антител, которые образуются при некоторых инфекционных процессах, например при бруцеллезе.

При *пассивном* варианте применяют специальную *диагностику*: частицы-носители либо антител, либо антигенов в зависимости от постав-

ленной задачи. Так, в реакции *пассивной гемагглютинации* в качестве такого носителя применяют эритроциты — *антигенный* или *антительный эритроцитарный диагностикум*. Реакции пассивной гемагглютинации, как правило, ставят в круглодонных или конических пробирках или лунках. Под действием гравитации клетки оседают: при отрицательном результате эритроциты скапливаются в центре («*пуговка*»), а при положительном — равномерно покрывают дно («*зонтик*»).

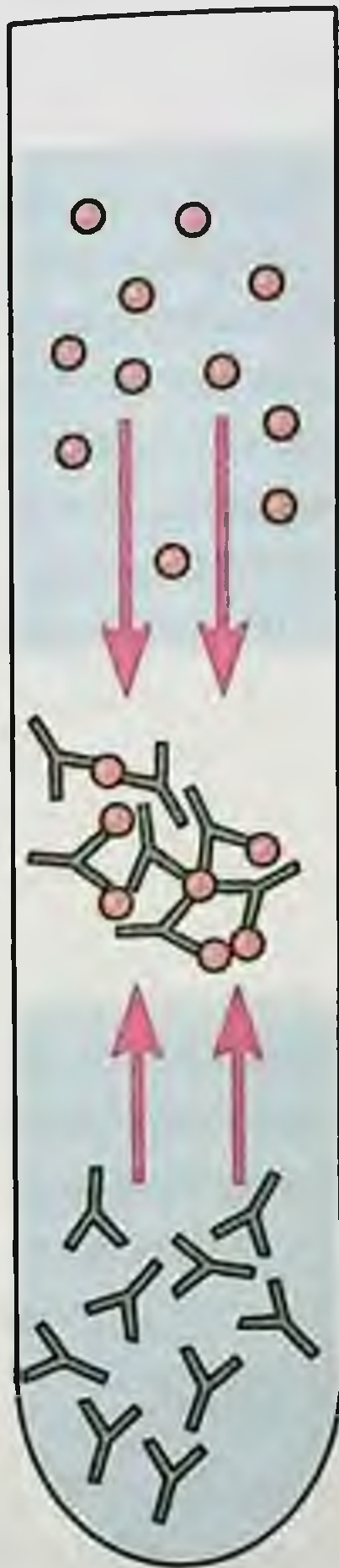
12.3. РЕАКЦИЯ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Реакция преципитации — это иммунологический тест, при котором в результате связывания антител (преципитинов) и антигенов (преципитиногенов) образуется нерастворимый иммунный комплекс в виде осадка (преципитата) или помутнения.

Важным условием реакции является то, что оба ее компонента, антитела и антиген, присутствуют в растворимой, молекулярной форме и определенном количественном соотношении. Избыток или недостаток одного из компонентов препятствует образованию нерастворимого иммунного комплекса. В случае специфичности и оптимального количественного соотношения антитела вызывают агрегацию молекул антигена, и коллоидный раствор мутнеет, переходя в непрозрачную суспензию. Это положительный результат реакции. Под действием гравитации мелкие агрегаты могут осесть с образованием тонкодисперсного осадка. В случае отрицательного результата сохраняется система коллоидного раствора.

Вариантом реакции преципитации является *реакция кольцепреципитации* (рис. 12.2). Реакцию проводят в пробирках малого диаметра, куда, аккуратно наслаивая один на другой, вносят раствор антигена и иммунную сыворотку. Через непродолжительное время на границе этих двух растворов образуется непрозрачное кольцо преципитата. Такой подход был использован при конструировании реакции термопреципитации (реакция Асколи), которую применяют в диагностике сибирской язвы. В этом тесте в качестве специфического антигена используют прокипяченные и профильтрованные водные экстракты органов или тканей подозрительного животного, например его шкуры.

Широкое распространение получили разновидности реакции преципитации в полужидком агаровом геле: двойная иммунодиффузия по Оухтерлони, радиальная иммунодиффузия по Манчини, иммуноэлек-



а



б

Рис. 12.2. Реакция кольцепреципитации

трофорез. Положительный результат в них выглядит как зона или полоска помутнения.

Реакция двойной иммунодиффузии по Оухтерлони. Эта реакция проводится в агаровом геле. В слое геля равномерной толщины на определенном расстоянии друг от друга вырезают лунки и заполняют их антигеном и иммунной сывороткой соответственно. После этого антигены и антитела диффундируют в гель, встречаются друг с другом и образуют иммунные комплексы, хорошо различимые невооруженным глазом как линии преципитации. Эту реакцию можно использовать для определения

качественного состава неизвестных антигенов или специфичности антител, а также для проверки идентичности различных антигенов.

Реакция радиальной иммунодиффузии. В расплавленный агаровый гель добавляют антитела и наносят гель равномерным слоем на стекло. В геле вырезают лунки и вносят в них стандартный объем различных по концентрации растворов антигена. Во время инкубации антигены радиально диффундируют из лунки и, встретившись с антителами, образуют кольцо преципитации. До тех пор пока в лунке сохраняется избыток антигена, происходит постепенное увеличение диаметра кольца преципитации. Этот метод используется для количественного определения антигенов или антител в исследуемом растворе (например, для определения концентрации иммуноглобулинов разных классов в сыворотке крови).

Иммуноэлектрофорез — вариант реакции иммунодиффузии, при котором производят предварительное электрофоретическое разделение смеси антигенов в геле.

Реакция флоккуляции (по Рамону) — разновидность реакции преципитации, которая используется для определения активности антитоксической сыворотки или анатоксина. Реакцию проводят в пробирках. В пробирке, где анатоксин и антитоксин находятся в эквивалентном соотношении, наблюдается помутнение.

12.4. РЕАКЦИИ С УЧАСТИЕМ КОМПЛЕМЕНТА

Реакции с участием комплемента основаны на активации комплемента комплексом «антиген—антитело» (то есть по классическому пути), которая проявляется лизисом (разрушением) клетки-мишени. К таким тестам относятся реакции лизиса, связывания комплемента и др. Важным условием реакций такого типа служит участие комплементсвязывающих антител — IgM, IgG1 и IgG3. Источником комплемента является консервированная сыворотка крови морской свинки или кролика.

Реакция лизиса — разрушение активированным комплементом бактерий, эритроцитов и других клеток, меченных антителами (лизинами). Лизины, запускающие разрушение бактерий, называют «бактериолизинами», а реакцию — «бактериолизом». По аналогии лизины, участвующие в «растворении» эритроцитов в реакции иммунного гемолиза, — «гемолизинами».

Реакция связывания комплемента основана на том, что при образовании комплекса «антиген—антитело» к нему «присоединяется» ком-

племент (рис. 12.3). Если же комплекс «антиген–антитело» не образуется, то комплемент остается свободным и может быть израсходован на лизис индикаторной «гемолитической системы» (смесь эритроцитов и гемолизинов). В реакции связывания комплемента антиген может быть как в молекулярной, растворимой форме, так и в нерастворимой, в виде клеток, фрагментов тканей или агрегатов молекул. Гемолитическую сыворотку, источник гемолизинов, получают, например, иммунизацией кроликов эритроцитами барана.

Реакцию связывания комплемента проводят в две фазы. В 1-ю фазу реакции готовят смесь «антиген + антитела + комплемент». 2-я фаза, индикаторная, проводится добавлением к первоначальной смеси гемолитической системы.

Если антиген и антитела специфичны друг другу, то образуется иммунный комплекс «антиген–антитело», на который «расходуется» комплемент. Тогда во 2-й фазе реакции не происходит лизис sensibilizированных гемолизином эритроцитов — это положительный результат реакции. Если антиген и антитела не соответствуют друг другу, то в 1-й фазе реакции комплемент остается интактным. В этом случае во 2-й фазе он расходуется на иммунный комплекс гемолитической системы («эритроцит–гемолизин»), что приводит к гемолизу и появлению «лаковой» крови. Это отрицательный результат реакции.

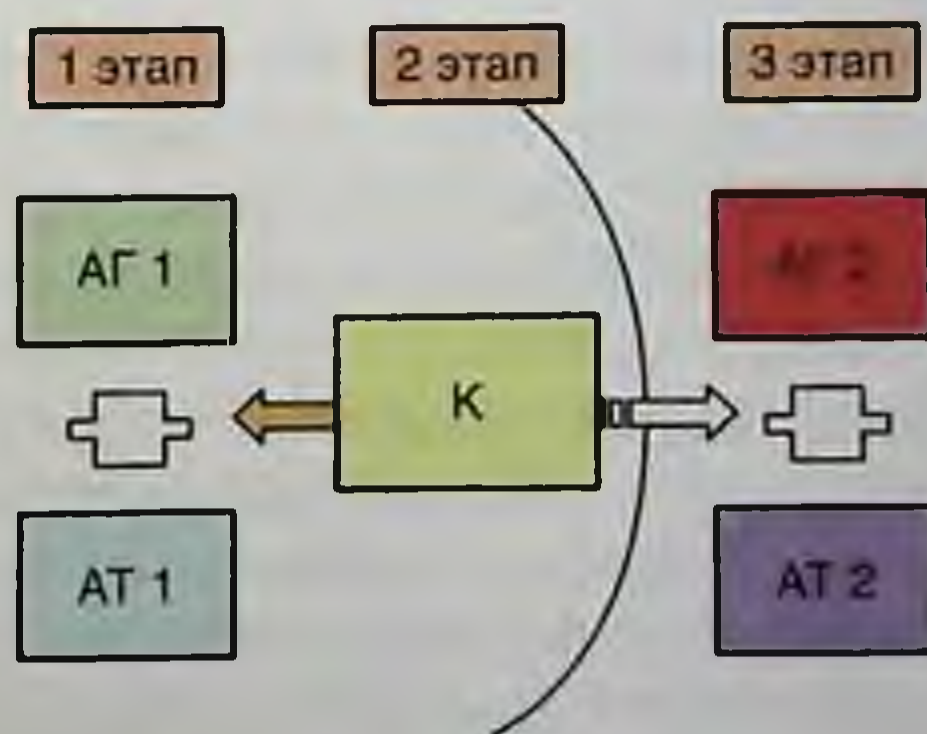


Рис. 12.3. Схема реакции связывания комплемента: АГ 1 — диагностикум; АТ 1 — искомые антитела; К — комплемент; АГ 2 — эритроциты барана; АТ 2 — антитела против эритроцитов барана (гемолитическая сыворотка); 1-й этап — антиген связывается с антителом; 2-й этап — комплемент связывается с иммунным комплексом АГ+АТ; 3-й этап — добавляют эритроциты барана и антитела против них; гемолиз отсутствует, так как комплемент связался

12.5. РЕАКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕЧЕНЫХ АНТИТЕЛ ИЛИ АНТИГЕНОВ

Эти реакции основаны на применении реагентов, несущих различные «метки» (флюорохром, фермент, радиоактивный изотоп и др.), что позволяет наблюдать результат теста с помощью специальной аппаратуры и повышает их технологичность и чувствительность. Реакции с использованием меченых реагентов широко применяются в настоящее время для *экспресс-диагностики* (в течение рабочей смены) различных инфекционных агентов, для определения токсинов, онкомаркеров, гормонов, метаболитов, лекарственных и наркотических веществ и др.

Реакция иммунофлюоресценции (метод Кунса) основана на том, что в реакции используют антитела, меченные флюорохромами — веществами, способными при попадании на них ультрафиолетового излучения испускать кванты света видимого спектра. Цвет свечения определяется видом использованного флюорохрома. При отрицательном результате свечения нет.

Различают прямой и непрямой варианты метода (рис. 12.4).

- *Прямой вариант* используют для идентификации неизвестного антигена. В мазке из исследуемого материала неизвестные бактерии, обработанные меченой флюорохромом специфической сывороткой, светятся при люминесцентной микроскопии по периферии клетки в виде каймы.
- *Непрямой вариант* метода позволяет обнаружить специфические антитела к известному антигену, уже зафиксированному в мазке. Для этого применяют «вторые» меченные флюорохромом антитела, специфичные к иммуноглобулинам. Проявление результата аналогично прямому варианту.

Проточная иммунная цитофлюориметрия — вариант прямого иммунофлюоресцентного анализа: идентификации клеток по их поверхностным антигенам или маркерам. Клеточную суспензию, предварительно обработанную специфическими антителами, мечеными флюорохромами, пропускают через тонкий капилляр и освещают лучом лазера, который возбуждает свечение флюорохрома. Интенсивность флюоресценции коррелирует с плотностью антигенов на поверхности клеток и может быть количественно измерена с помощью фотоумножителя. Полученные результаты подвергаются компьютерной обработке и анализу. Метод позволяет проводить качественный и количественный анализ клеточных популяций, оценивать экспрессию отдельных мар-

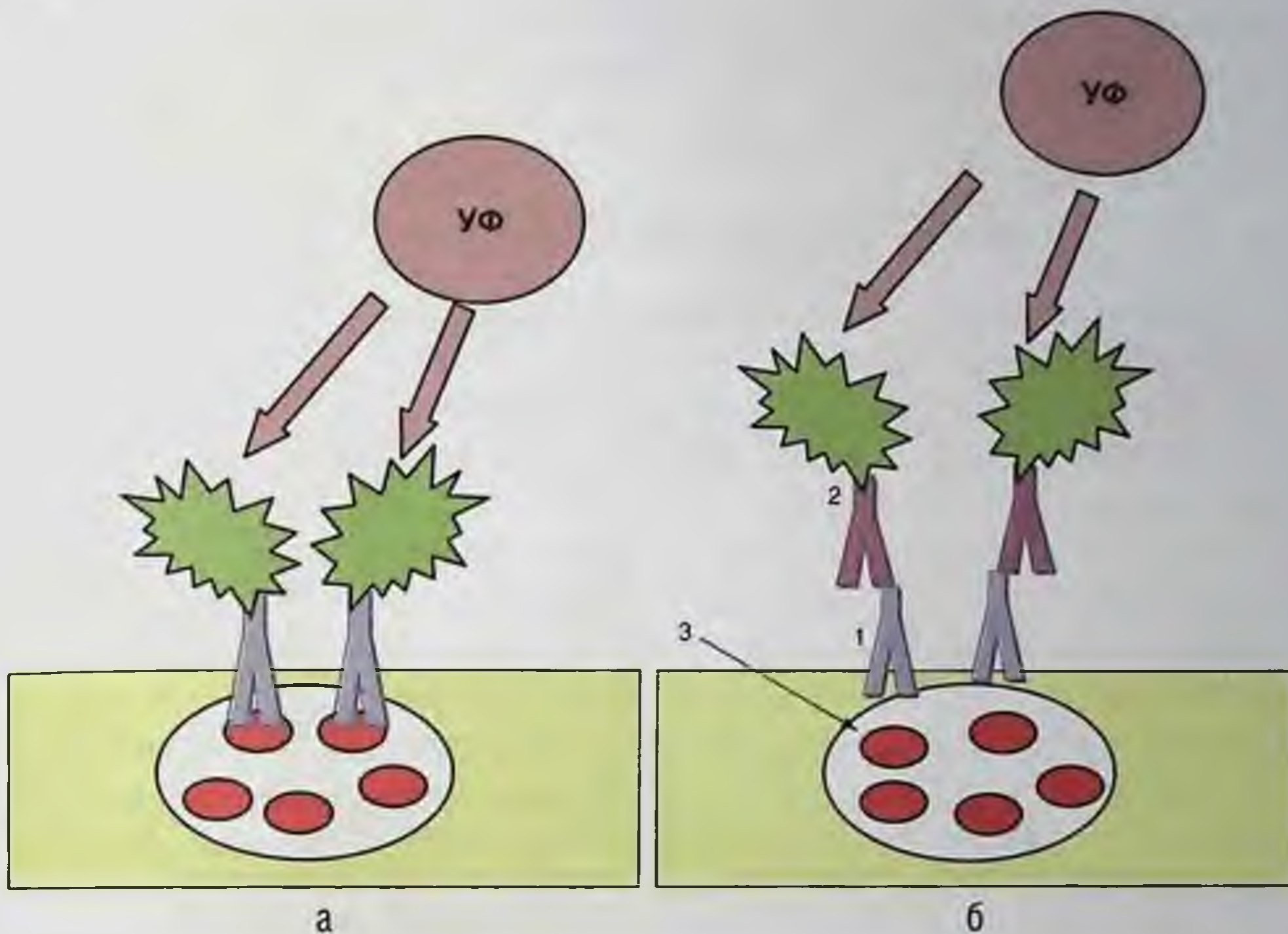


Рис. 12.4. а — реакция иммунофлюоресценции, прямой вариант; б — реакция непрямо́й флюоресценции, непрямо́й вариант; 1 — специфические антитела; 2 — конъюгат; 3 — антиген

кером и идентифицировать по ним объекты. Широко применяется при изучении иммунного статуса.

В иммуноферментном анализе используют антитела, меченные ферментом (пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и др.). Наиболее распространен твердофазный иммуноферментный анализ (рис. 12.5) — вариант иммунологического теста, когда один из компонентов иммунной реакции (стандартные диагностические антигены или антитела) сорбирован на твердом носителе, например в лунках планшета для реакций из полистирола. Результат реакции фиксируется по расщеплению субстрата, который, в свою очередь, модифицирует хромоген, изменяющий оптическую плотность реакционной смеси. Иммуноферментный анализ применяют, в частности, для диагностики ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов, определения гормонов, ферментов, лекарственных препаратов и других биологически активных веществ.

Для радиоиммунологического анализа применяют антигены или антитела, меченные одним из радионуклидов (^{125}I , ^{14}C , ^3H и др.). По-

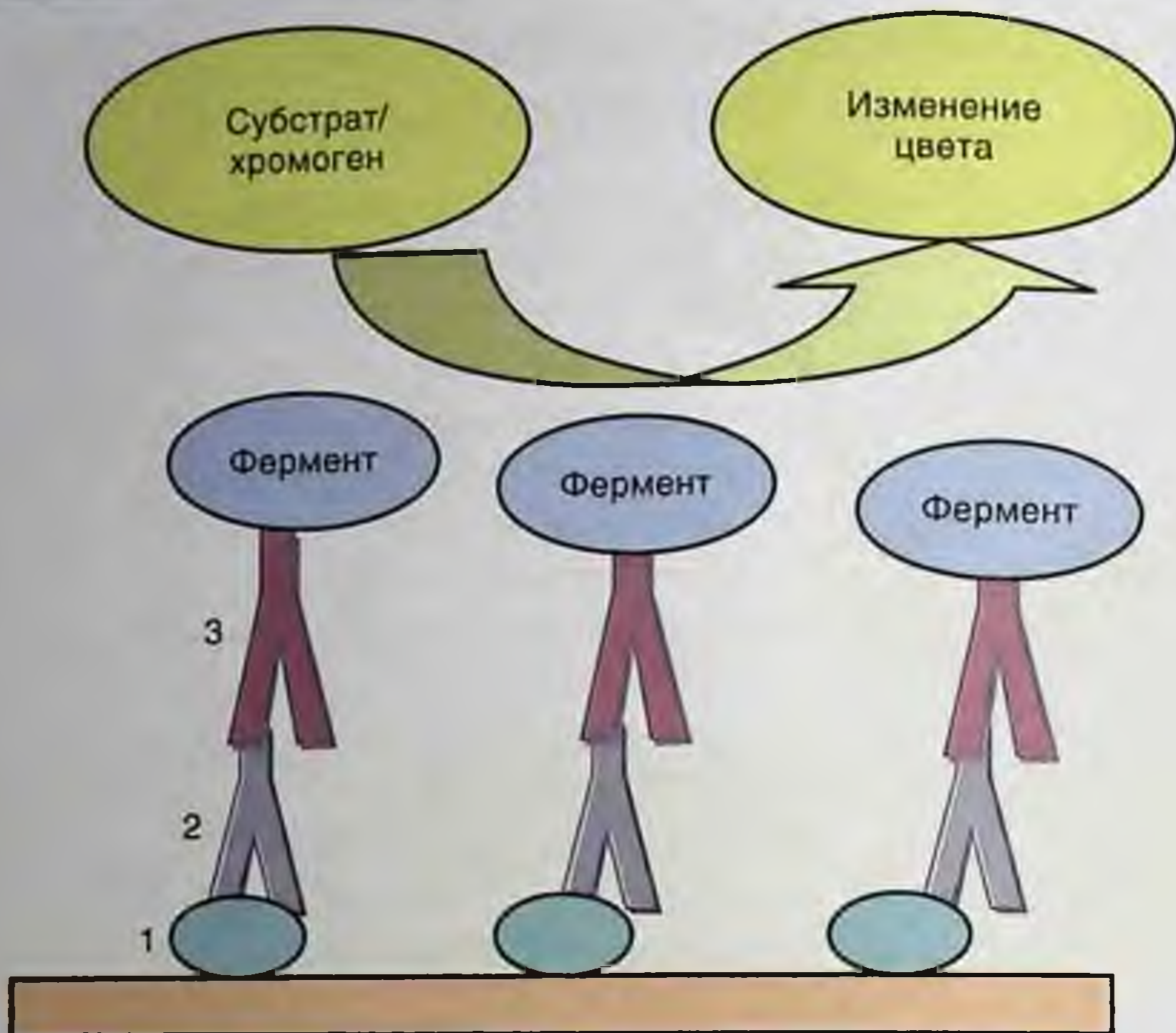


Рис. 12.5. Иммуноферментный анализ. Выявление антител: 1 — известные антигены на поверхности планшета; 2 — искомые антитела; 3 — антитела, меченные ферментом

сле взаимодействия антигена с антителами отделяют образовавшийся радиоактивный иммунный комплекс и определяют степень его радиоактивности. Интенсивность излучения прямо пропорциональна количеству связавшихся реагентов. В настоящее время при проведении серологических исследований не используется.

Иммуноблоттинг (вестерн-анализ) — высокочувствительный тест, основанный на сочетании электрофореза и одного из иммунологических методов (иммуноферментный или радиоиммунологический анализ). Антиген (или антитело) выделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят (то есть производят блоттинг, от англ. *blot* — пятно, клякса) из геля на нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью иммуноферментного или радиоиммунологического анализа. Иммуноблоттинг используют как диагностический метод при ВИЧ-инфекции и др.

Иммуноэлектронная микроскопия заключается в изучении в электронном микроскопе объектов (чаще вирусов), предварительно обрабо-

танных специфической иммунной сывороткой, меченной электронно-оптически плотными препаратами, например ферритином — железосодержащим белком.

12.6. РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Антитела способны нейтрализовать повреждающее действие биологически опасных агентов в испытании на живом тест-объекте: организме чувствительных животных, культуре клеток и тканей, эмбрионе. Это достигается блокадой антителами активных центров или адгезинов микробов, ферментов, токсинов и т.д. Так называемую *реакцию нейтрализации* проводят путем введения смеси «антитело — испытуемое вещество» в интактный или только известных антител в «пораженный» или зараженный тест-объект. При отсутствии в тест-объектах повреждающего действия говорят о нейтрализующем действии иммунной сыворотки. Реакцию нейтрализации используют как для идентификации поражающего агента или установления специфичности иммунной сыворотки, так и для подбора адекватной иммунотерапии.

ИММУНОПРОФИЛАКТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ

13.1. СУЩНОСТЬ И МЕСТО ИММУНОПРОФИЛАКТИКИ И ИММУНОТЕРАПИИ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Иммунопрофилактика и иммунотерапия являются разделами иммунологии, которые изучают и разрабатывают способы и методы специфической профилактики и лечения инфекционных и неинфекционных болезней с помощью иммунобиологических препаратов, действующих на основе иммунологических принципов и/ или влияющих на иммунную систему.

Иммунопрофилактика направлена на создание иммунитета к возбудителю инфекционного заболевания или его антигенам, а также патогену для предупреждения возможного заболевания путем формирования невосприимчивости к ним организма. **Иммунотерапия** направлена на лечение уже развившегося заболевания, в основе которого лежат нарушения функций иммунной системы, или же иммунной системе принадлежит ведущая роль в восстановлении здоровья.

Иммунопрофилактика и иммунотерапия применяются, когда необходимо:

- сформировать специфический иммунитет или активизировать деятельность иммунной системы;
- подавить активность отдельных звеньев иммунной системы;
- нормализовать работу иммунной системы, если имеются отклонения ее функций в ту или иную сторону.

Иммунопрофилактика и иммунотерапия широко применяются для профилактики и лечения инфекционных и онкологических болезней, аллергий, иммунопатологических состояний, иммунодефицитов и других заболеваний, а также при трансплантологии.

Часто иммунопрофилактика и иммунотерапия являются единственными способами борьбы с инфекционными болезнями.

Только благодаря вакцинопрофилактике на земном шаре удалось ликвидировать натуральную оспу, полиомиелит на большинстве континентов, резко снизить заболеваемость корью, эпидемическим паротитом, краснухой. В лечении целого ряда токсинемических инфекций (ботулизм, столбняк и др.) ведущее значение имеет серотерапия, то есть применение антитоксических сывороток и иммуноглобулинов.

Принцип иммунопрофилактики и иммунотерапии сводится к тому или иному воздействию на иммунную систему, то есть к активации, супрессии или нормализации ее работы. Это воздействие может быть активным или пассивным, специфическим или неспецифическим. Для такого избирательного и дифференцированного действия на иммунную систему разработано множество препаратов, объединенных в группу иммунобиологических препаратов.

13.2. ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ

13.2.1. Общая характеристика и классификация

Действующим началом иммунобиологических препаратов являются антигены, полученные тем или иным способом, антитела или микробные клетки, биологически активные вещества типа цитокинов, иммунокомпетентные клетки, другие иммунореагенты. Кроме действующего начала, иммунобиологические препараты могут включать стабилизаторы, адьюванты, консерванты и другие субстанции, улучшающие качество препаратов.

В настоящее время выделяют 5 основных групп иммунобиологических препаратов (А.А. Воробьев).

- Первая группа — иммунобиологические препараты, получаемые из живых или убитых микробов (бактерии, вирусы, грибы) или микробных продуктов и используемые для специфической профилактики и лечения. К этой группе относятся живые и инактивированные вакцины, субъединичные вакцины, анатоксины, бактериофаги, пробиотики.
- Вторая группа — иммунобиологические препараты на основе антител. К этой группе относятся иммуноглобулины, иммунные

сыворотки, иммунотоксины, антитела-ферменты, рецепторные антитела, мини-антитела.

- Третья группа — иммуномодуляторы для иммунокоррекции, лечения и профилактики инфекционных, неинфекционных болезней, иммунодефицитов. К этой группе относятся экзогенные и эндогенные иммуномодуляторы.
- Четвертая группа — адаптогены, сложные химические вещества растительного происхождения, обладающие широким спектром биологической активности, действующие на иммунную систему.
- Пятая группа — диагностические препараты и системы для специфической диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний, с помощью которых можно идентифицировать антигены, антитела, ферменты, продукты метаболизма, биологически активные вещества, чужеродные клетки.

13.2.2. Вакцины

Термин «вакцина» (от франц. *vaccina* — корова) ввел Л. Пастер в честь создателя первой вакцины Дженнера, применившего вирус коровьей оспы для иммунизации людей против натуральной оспы человека.

Вакцины используют в первую очередь для активной специфической профилактики инфекционных заболеваний. Однако в последнее время область применения вакцин значительно расширилась. Созданы вакцины для профилактики и лечения неинфекционных и онкологических болезней, наркозависимости, табакокурения и др. Действующим началом всех вакцин является специфический антиген.

Вакцина представляет собой сложный иммунобиологический препарат, в состав которого, кроме специфических антигенов, входят стабилизаторы, консерванты, адъюванты.

В качестве стабилизаторов, предохраняющих антиген от разрушения, чаще всего используют гомологичные белки (человеческий альбумин, сахарозо-агар-желатин и др.). В качестве консервантов для подавления роста случайно попавших в препарат микроорганизмов применяют мертиолят, формальдегид и другие антимикробные препараты. Иногда для повышения иммуногенности антигена в вакцинные препараты добавляют адъюванты различной природы.

Вакцины применяют парентерально, внутримышечно, подкожно, чрескожно или интраназально, перорально согласно календарю прививок или по определенным для каждой вакцины показаниям.

Живые вакцины

Живые вакцины представляют собой препараты, в которых действующим началом являются ослабленные тем или иным способом, потерявшие вирулентность, но сохранившие специфическую антигенную активность штаммы патогенных микроорганизмов (бактерий, вирусов). Такие штаммы получили название «аттенуированные штаммы». Атенюация (ослабление) достигается путем длительного воздействия на штамм химических (мутагены), физических (температура, радиация) факторов или же длительного пассирования через организм невосприимчивых к инфекции животных или других биообъектов (эмбрионы птиц, культуры клеток). В результате такой обработки селектируются штаммы со сниженной вирулентностью, но способные при введении в организм человека вызывать специфический иммунный ответ, не провоцируя инфекционного заболевания. Примером таких вакцин являются живые вакцины против кори, эпидемического паротита, краснухи, полиомиелита, гриппа. Кроме того, в качестве живых вакцин иногда используют так называемые дивергентные штаммы, то есть непатогенные для человека микроорганизмы, имеющие общие протективные антигены с возбудителем инфекции. Классическими примерами дивергентных живых вакцин являются вакцина для профилактики оспы, в которой используется живой вирус оспы коров, и БЦЖ-вакцина (вакцина для профилактики туберкулеза), в состав которой включены родственные в антигенном отношении микобактерии бычьего типа.

В последнее время успешно развивается новое направление в создании живых вакцин на основе генно-инженерных технологий. Принцип его основан на получении рекомбинантных штаммов бактерий или вирусов, в геном которых включены гены протективных антигенов патогенных микробов. Попадая в организм человека, эти штаммы при размножении синтезируют специфический антиген и, таким образом, создают иммунитет к возбудителю инфекции. Такие вакцины называют «векторные». В качестве вектора используются некоторые поксвирусы, непатогенные штаммы сальмонелл и другие микроорганизмы.

Инактивированные (убитые) вакцины

Инактивированные вакцины в качестве действующего начала включают убитые тем или иным способом микроорганизмы (бактерии, вирусы). Для инактивации микроорганизмов обычно используют формальдегид, спирты, фенол, температурное и ультрафиолетовое

воздействие, ионизирующую радиацию и другие физические или химические методы.

Получают инактивированные вакцины путем выращивания микроорганизмов на искусственных питательных средах (бактерии) или культурах клеток. После инактивации тем или иным методом проводят выделение и очистку антигенных комплексов, при необходимости лиофилизацию. В препарат добавляют консервант, иногда адъюванты. Применяются такие вакцины, как правило, в виде нескольких инъекций на курс вакцинации. Примером инактивированных вакцин являются вакцина для профилактики гриппа (инактивированная), вакцина для профилактики полиомиелита, вакцина для профилактики бешенства и некоторые другие вакцины против особо опасных инфекций.

Молекулярные вакцины

В молекулярных вакцинах антиген находится в молекулярной форме или в виде фрагментов его молекулы (эпитопов). Такие антигены можно получить либо биологическим синтезом в процессе культивирования микроорганизмов, либо при культивировании рекомбинантных бактерий или грибов, содержащих ген нужного антигена, либо химическим синтезом антигенных детерминант. К сожалению, рекомбинантные технологии получения молекулярных вакцин не нашли широкого распространения прежде всего из-за низкой иммуногенности антигенов. В медицинской практике широко применяется только одна рекомбинантная вакцина для профилактики вирусного гепатита В, полученная из антигена вируса, продуцируемого рекомбинантным штаммом дрожжей. При вакцинации этой вакциной препарат необходимо вводить трижды с короткими (месяц) промежутками для получения полноценного иммунного ответа.

Анатоксины (токсоиды)

Принцип получения анатоксинов состоит в том, что образующийся при культивировании бактерий токсин в молекулярном виде превращают в нетоксическую, но сохраняющую иммуногенность форму — анатоксин. Для этого токсин подвергают нагреванию до 37 °С и обработке 0,4% раствором формальдегида в течение 3–4 нед, после чего обязательно проверяют препарат на токсичность, очищают от клеточных компонентов, продуктов бактерий и питательной среды и концентрируют. Для повышения иммуногенности добавляют адъюванты. Примером таких вакцин служат дифтерийный, столбнячный, ботулинический, стафилококковый, холерный и гангренозный анатоксины.

Синтетические вакцины

Молекулы антигенов и их эпитопы сами по себе малоиммуногенны. Это связано с их быстрым распадом в организме, а также недостаточно активным процессом адгезии их иммунокомпетентными клетками из-за небольшой молекулярной массы. Для повышения иммуногенности их сшивают с полимерными крупномолекулярными безвредными для организма соединениями, которые играют роль шлеппера и адьюванта. Такой искусственно созданный комплекс долго сохраняется в организме и легко адгезируется иммунокомпетентными клетками. Вакцины, созданные таким образом, получили название «молекулярные вакцины». Примером такой вакцины является отечественная вакцина для профилактики гриппа (инактивированная) + азоксимера бромид (Гриппол плюс [Вакцина гриппозная тривалентная инактивированная полимер-субъединичная]*).

Ассоциированные вакцины

Ассоциированными называются вакцины, в состав которых входит несколько разнородных антигенов, что позволяет проводить вакцинопрофилактику сразу нескольких инфекций. Разработкой таких вакцин занимаются для того, чтобы уменьшить число вакцин и инъекций при проведении массовой вакцинации. Создание таких вакцин обосновано, так как показано, что иммунная система способна отвечать сразу на десятки различных антигенов. Основная задача при создании ассоциированных вакцин заключается в том, чтобы сбалансировать состав входящих в нее антигенов и не допустить их взаимную конкуренцию и поствакцинальные осложнения. В состав таких вакцин могут входить как живые, так и убитые вакцины. Если в состав препарата входят однородные компоненты, то такую вакцину называют поливакциной, например живая полиомиелитная вакцина, в состав которой входят аттенуированные штаммы вируса полиомиелита I, II и III типа. Если препарат состоит из разнородных компонентов, его называют комбинированной вакциной. Примерами комбинированных вакцин являются живая ассоциированная вакцина для профилактики кори, краснухи и паротита, вакцина для профилактики дифтерии, столбняка и коклюша (Вакцина коклюшно-дифтерийно-столбнячная адсорбированная жидкая [АКДС-вакцина]*).

Адьюванты

Как уже говорилось, иногда для усиления иммуногенности вакцинных препаратов прибегают к помощи адьювантов (от лат. *adjuvant* —

помощник). В качестве адъювантов используют минеральные сорбенты (гели гидрата окиси и фосфата алюминия), полимеры, сложные химические соединения (ЛПС, мурамилдипептид и др.), бактериальные клетки и их компоненты (БЦЖ, коклюшные бактерии), липиды и эмульгаторы (ланолин, арлацел), вещества, вызывающие воспаление (сапонин, скипидар живичный). Эти различные по происхождению и химической структуре вещества имеют одно общее свойство — способность усиливать иммуногенность различных антигенов. Механизм действия адъювантов очень сложный. Они действуют не только на антиген, но и на организм. Действие на антиген заключается в укрупнении его молекулы, превращении растворимой формы в корпускулярную. В результате антиген лучше захватывается и представляется иммунокомпетентным клеткам, то есть превращается из тимусзависимого в тимуснезависимый антиген. Кроме того, адъюванты в месте введения вызывают воспалительную реакцию с образованием фиброзной капсулы, в результате чего антиген долгое время сохраняется (депонируется) в месте инъекции и действует длительное время (эффект ревакцинации). В связи с этим адъювантные вакцины еще называют «депонированные». Кроме того, адъюванты непосредственно активируют пролиферацию клеток Т-, В-, А-систем иммунитета и в несколько раз усиливают синтез защитных белков организма. Обычно адъюванты усиливают иммуногенность антигенов в несколько раз, а некоторых антигенов в десятки раз.

Общая характеристика вакцин, применяемых в практике

В настоящее время в мире создано более 100 различных вакцин, с помощью которых медицинские работники могут контролировать более 40 различных инфекций.

Применение этих вакцинных препаратов позволило человечеству достичь невероятных успехов в борьбе с инфекционными заболеваниями. Эффективность вакцин сильно различается. Тем не менее независимо от этого их применение всегда обоснованно, о чем свидетельствует значительное снижение заболеваемости и смертности среди вакцинированных. Специалисты из США считают, что средняя продолжительность жизни за XX в. выросла по сравнению с ожидаемой по крайней мере на 20 лет, и 80% этого увеличения, по их мнению, — результат широкого применения вакцинных препаратов. Применение вакцин не только позволяет сохранить здоровье и даже жизнь миллионам людей, но и дает огромный экономический

эффект. Всемирная организация здравоохранения считает вакцинацию наиболее эффективным способом борьбы с инфекционной заболеваемостью.

Существуют общие требования ко всем вакцинным препаратам. Любая вакцина, рекомендуемая для применения, должна быть иммуногенна, безопасна, не реактогенна, не должна вызывать аллергических реакций, не должна обладать тератогенностью и онкогенностью. Штаммы микроорганизмов, из которых готовят вакцинный препарат, должны быть генетически стабильными. Вакцина должна иметь длительный срок хранения, производство ее должно быть технологичным, а способ применения — простым и доступным для массового применения.

Календарь прививок. Показания и противопоказания к вакцинации

В большинстве стран, в том числе и в России, действует календарь прививок, в котором регламентируется обоснованное проведение во всех возрастных группах вакцинации против определенных инфекционных болезней. В календаре указано, какими вакцинами и по какой временной схеме должен быть привит человек в детском возрасте и во взрослом периоде. Так, в детском возрасте (до 10 лет) каждый человек должен быть привит против туберкулеза, кори, полиомиелита, эпидемического паротита, краснухи, гепатита В, дифтерии, столбняка, коклюша. Кроме того, в календарь прививок внесена вакцинопрофилактика гриппа по эпидемиологическим показаниям.

Кроме того, показаниями к вакцинации являются появление или угроза распространения инфекционного заболевания, а также возникновение вспышек или эпидемий тех или иных инфекций.

Противопоказания определены для каждой отдельной вакцины и указаны в инструкции для ее применения. Общими противопоказаниями являются острые инфекционные или неинфекционные заболевания; аллергические состояния; заболевания центральной нервной системы; хронические заболевания паренхиматозных органов; тяжелые заболевания сердечно-сосудистой системы; выраженные иммунодефициты; злокачественные заболевания.

Поствакцинальные реакции в виде кратковременного повышения температуры тела, местные реакции (гиперемия, отек на месте введения препарата), если они не превышают границу указанных в инструкции по применению вакцины параметров, не являются противопоказаниями к прививкам.

13.2.3. Бактериофаги

Бактериофаги — один из видов иммунобиологических препаратов, созданных на основе вирусов, поражающих бактерии. Их применяют в диагностике, профилактике и терапии многих бактериальных заболеваний (брюшной тиф, холера, дизентерия и др.). Бактериофаги получают путем культивирования пораженных бактериофагом бактерий на питательных средах с выделением из культуральной жидкости фильтрата, содержащего фаги. Активность препарата определяют путем титрования на чувствительных к нему культурах бактерий. Назначают эти препараты с профилактической и лечебной целью перорально или местно длительными курсами.

13.2.4. Пробиотики

Пробиотики — препараты, содержащие культуру непатогенных для человека и животных бактерий — представителей нормальной микрофлоры кишечника человека, предназначенные для ее коррекции при дисбактериозах. Пробиотики применяют как с профилактической, так и с лечебной целью при дисбактериозах различной этиологии (при соматических и инфекционных заболеваниях, вторичных иммунодефицитах, использовании антибиотиков широкого спектра действия и др.).

Препараты представляют собой лиофильно высушенные живые культуры соответствующих микроорганизмов с добавками стабилизатора и вкусовых веществ и выпускаются в виде порошков или таблеток. Дозируются пробиотики по числу живых бактериальных клеток в таблетке или 1 г.

Кроме того, в последнее время получили широкое распространение пробиотики в виде молочнокислых продуктов. Пробиотики назначают перорально длительными (1–6 мес) курсами по 2–3 раза в день, как правило, в сочетании с другими методами лечения.

13.2.5. Иммунобиологические препараты на основе специфических антител

Антитела относятся к числу основных иммунореагентов большинства иммунных реакций, определяющих состояние иммунитета организма. Они крайне разнообразны по функциям и структуре. К иммунобиологическим препаратам на основе антител относятся иммунные

сыворотки, иммуноглобулины, моноклональные антитела, иммунотоксины, иммуноадгезины, абзимы (антитела-ферменты).

Иммунные сыворотки и иммуноглобулины

Иммунные лечебные и профилактические сыворотки применяют уже более 100 лет. В настоящее время используют антитоксические (против различных бактериальных токсинов), антибактериальные (противотифозная, противодизентерийная, противочумная и др.), противовирусные (против бешенства, клещевого энцефалита и др.) иммунные сыворотки. Иммунные сыворотки получают путем гипериммунизации (многократной иммунизации) животных (лошади, ослы, кролики) специфическим антигеном с последующим выделением из крови иммунных сывороток. Такие препараты называются «гетерогенные иммунные сыворотки», так как они содержат чужеродные для человека сывороточные белки. Для получения гомологичных сывороток используют кровь переболевших людей или специально иммунизированных доноров. Такие сыворотки предпочтительнее, так как дают гораздо меньше побочных реакций на их введение. Основным действующим началом в иммунных сыворотках являются специфические иммуноглобулины против того или иного антигена токсинов, бактерий, вирусов. Поэтому их выделяют из иммунных сывороток, очищают и концентрируют различными физико-химическими методами. Иногда для повышения специфичности антител выделяют только их антигенсвязывающий участок (Fab-фрагмент). Такие препараты получили название «доменные антитела».

Иммунные сыворотки и препараты иммуноглобулинов применяют с лечебной и профилактической целью. Особенно эффективно их применение для лечения и профилактики токсинемических инфекций (столбняк, ботулизм, газовая гангрена, дифтерия). С лечебной целью эти препараты вводят как можно раньше внутримышечно или внутривенно в больших дозах.

Профилактические дозы сывороточных препаратов значительно меньше, препараты вводят внутримышечно людям, имевшим контакт с больным или источником инфекции, для создания пассивного иммунитета. После введения иммунных сывороток или иммуноглобулинов возможны осложнения в виде анафилактического шока и сывороточной болезни. Поэтому перед введением таких препаратов необходимо ставить аллергическую пробу на чувствительность к ним пациента, а вводить — по Безредке, то есть дробно небольшими ко-

личествами. Иногда прибегают к активно-пассивной иммунизации, то есть к одновременному введению вакцины и сыворотки для формирования кратковременного пассивного иммунитета с заменой его через несколько недель активным, возникающим в ответ на введение вакцины. К такому методу иммунизации прибегают при профилактике столбняка у раненых, профилактики бешенства и в некоторых других случаях.

Моноклональные антитела

Как известно, антитела по своей структуре и функциям очень разнообразны. Каждый В-лимфоцит синтезирует свой класс, подкласс, аллотип иммуноглобулинов. Поэтому в ответ на введение антигена в крови появляются поликлональные антитела, то есть смесь иммуноглобулинов, синтезированных множеством клонов активированных В-лимфоцитов.

Для получения иммуноглобулинов, синтезированных только одним В-лимфоцитом или одним полученным от него клоном, то есть моноклонального иммуноглобулина, необходимо иммунный В-лимфоцит размножить в искусственных условиях и добиться синтеза иммуноглобулина. Однако это невозможно, так как В-лимфоциты не размножаются *in vitro*. Исходя из этого немецкие ученые Келлер и Мильштейн разработали метод получения моноклональных антител с помощью гибридных клеток, образованных путем слияния иммунного В-лимфоцита с миеломной клеткой. Такие клетки получили название «гибридомы». Гибридомы способны быстро размножаться *in vitro* в культуре клеток и продуцировать при этом иммуноглобулин, характерный только для взятого В-лимфоцита.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, размножают или в специальных аппаратах, или вводя их внутривенно мышам особой линии, выделяя их потом из асцитической жидкости.

В лечебных целях моноклональные антитела практически не используются из-за высокого риска введения в организм генетического материала миеломных клеток. Однако они широко применяются для создания диагностических препаратов и очистки антигенов.

Иммуномодуляторы

Иммуномодуляторами называют вещества, оказывающие влияние на иммунную систему. Их подразделяют на эндогенные и экзогенные.

К экзогенным иммуномодуляторам относится большая группа веществ различной природы и происхождения (растительные, бактери-

альные, искусственно синтезируемые), оказывающих активирующее или супрессивное действие на иммунную систему.

Эндогенные иммуномодуляторы представляют собой достаточно большую группу олигопептидов, синтезируемых самим организмом, его иммунокомпетентными и другими клетками и способных активировать иммунную систему путем усиления пролиферации и функции иммунокомпетентных клеток, то есть обладающих иммуностимулирующим свойством. К ним относятся лимфокины, интерфероны, миело-пептиды, хемокины, пептиды тимуса.

Имуностимулирующим свойством обладают также экзогенные иммуномодуляторы, такие как адъюванты, многие химические соединения, цитокины и ИФН, лизаты бактерий, рибосомальные вакцины (риболизины), производные растений рода *Echinoseae*.

Иммуносупрессирующее действие оказывают все цитостатики, антагонисты пуринов и аминокислот; алкилирующие агенты (циклофосфамид), ингибирующие выработку антител; кортикостероиды, которые препятствуют презентации антигена, ингибируют первичный антительный ответ, уменьшают секрецию ИЛ-1 и количество циркулирующих Т-лимфоцитов, блокаторы действия ИЛ-2 (циклоспорин), действующие на Th1-лимфоциты, препятствуя выработке ими ИЛ-2, а также антилимфоцитарная сыворотка, рентгеновские лучи и γ -излучение.

Иммуномодуляторы широко применяют при лечении иммунодефицитов различной природы, онкологических заболеваний, иммунопатологических и аллергических болезней, профилактике и лечении инфекционных заболеваний, трансплантации органов и тканей. Для этого создан ряд препаратов, оказывающих иммуномодулирующее действие. К ним относятся препараты ИФН и его индукторов. Создан целый ряд препаратов на основе интерлейкинов, полученных в основном генно-инженерным путем. Из экзогенных иммуномодуляторов чаще всего используются препараты, полученные из микробных клеток, например препарат ИРС 19*, полученный из лизатов бактериальных смесей пневмококка, стрептококка, клебсиелл, гемофильной палочки.

Задания для самоподготовки (самоконтроля) (к главам 12, 13)

А. Отметьте реакции, которые используются для оценки иммунного статуса организма:

1. Реакция связывания комплемента.
2. Проточная цитометрия.

3. Реакция Кумбса.
4. Радиальная иммунодиффузия.
5. Иммуноферментный анализ.

Б. Назовите реакцию, которая используется для определения наличия неполных антител:

1. Реакция кольцепреципитации.
2. Реакция Кумбса.
3. Радиальная иммунодиффузия.
4. Реакция нейтрализации.

В. Отметьте препараты, которые создают в организме активный иммунитет:

1. Пробиотики.
2. Вакцины.
3. Иммуномодуляторы.
4. Анатоксины.
5. Моноклональные антитела.

ОТВЕТЫ К ТЕСТАМ

Часть I

Глава 1. А (1). Б (3). В (4).

Глава 2. А (3). Б (1, 2). В (2, 4). Г (1, 3, 4). Д (1, 2). Е (1, 4). Ж (1, 2). З (1, 2, 3). И (1, 3, 4). К (2). Л (2, 3, 4).

Глава 3. А (2). Б (3). В (4). Г (2). Д (3). Е (1, 2). Ж. Более эффективной средой является среда № 1. Продолжительность лаг-фазы зависит от того, насколько быстро происходит адаптация бактериальной культуры к новым условиям. Чем эффективнее и питательнее среда для конкретного микроба, тем период адаптации короче. З. Бактериальная культура А — факультативный анаэроб. Бактериальная культура Б — микроаэрофил. Бактериальная культура В — строгий аэроб. Бактериальная культура Г — строгий анаэроб.

Глава 4. А (1, 2, 4). Б (1, 2, 4, 5). В — синбиотики. Г (1, 3, 4). Д (2, 3, 4). Е (4). Ж (1, 2, 3). З (1). И (1). К (1). Л (1). М (1).

Глава 5. А (3). Б (1, 2, 3). В (1, 2, 3). Г (1, 2, 3). Д. Идентичность выделенных культур можно установить, выделив ДНК из обоих штаммов и произведя рестрикционный анализ ДНК. Сопоставляя карты рестрикции ДНК, выделенные из различных штаммов, можно определить их генетическое родство. Также можно определить плазмидный профиль выделенных культур. Плазмидный профиль позволяет произвести внутривидовую идентификацию бактерий. Для этого из бактериальной клетки выделяют плазмидную ДНК, которую разделяют электрофорезом в агарозном геле, для определения количества и размеров плазмид. Если плазмидные профили обоих штаммов будут одинаковы, то можно сделать заключение об их идентичности.

Глава 6. А (1, 3, 4). Б (2, 4). В (2, 3, 4). Г (1, 2, 3). Д (1, 2, 3, 4, 5). Е. Для борьбы с инактивирующим действием β -лактамаз используют вещества-ингибиторы (например, клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам). Они содержат β -лактамное кольцо и способны связываться с β -лактамазами, предотвращая их разрушительное действие на β -лактамный антибиотик.

Глава 7. А (2). Б (1, 2, 4). В (1, 2). Г (1, 2, 3). Д (2, 4). Е. Вторичная инфекция. Ж. Бактерии из крови можно выделить при бактериемии, сепсисе, септикопиемии.

Часть II

Глава 8. А (1, 2, 4, 5). Б (1, 3). В (3, 4). Г (1, 2, 4, 5, 6).

Глава 9. А (2, 3, 4). Б (1, 2, 3). В (2, 3, 4). Г (1, 2, 3). Д (1, 2, 3, 4). Е (1, 2, 3, 4). Ж (1, 3, 4). З (1). И (2). К. Суперантигены микробов взаимодействуют с рецептором 2-го класса главного комплекса гистосовместимости и антигенраспознающим Т-клеточным рецептором вне антигенсвязывающей щели. В результате такого взаимодействия специфический иммунный ответ блокируется, при этом происходит ложная реакция распознавания антигена; вызываются поликлональная активация и антигеннеспецифическая пролиферация лимфоцитов и гиперпродукция цитокинов, способствующая гибели Т-лимфоцитов.

Глава 10. А (2). Б (3). В (1). Г (2, 3). Д (3). Е (1, 3). Ж (2, 3). З (2). И. Контактная аллергия относится к ГЗТ (IV тип). Аллергеном могут служить как большие молекулы, так и гаптены. Проникнув через кожу, аллерген прикрепляется к нормальной белковой молекуле, модифицируя ее. Клетки Лангерганса захватывают ее и представляют Т-клеткам в регионарных лимфатических образованиях. При повторном контакте с аллергеном сенсibilизированные Т-лимфоциты мигрируют к кожным участкам, вызывая реакцию, сопровождаемую моноцитарной инфильтрацией, отеком, появлением везикул на коже. К. При родах эритроциты плода попадают в кровяное русло матери. К ним вырабатываются антирезус-IgG. При повторных беременностях резус-положительным плодом у резус-отрицательных женщин антирезус-IgG проходит через плаценту и, оказывая цитотоксическое действие на эритроциты плода, разрушает их. Это вызывает развитие гемолитической болезни новорожденных, поэтому для предотвращения образования антирезус-антител вводится антирезус-сыворотка. Л. Наибольшей толерантностью обладают наименее чужеродные по отношению к организму антигены, обладающие низкой молекулярной массой и гомогенностью. Толерантность легко формируется к тимуснезависимым антигенам, например бактериальным полисахаридам.

Глава 11. А (3). Б (1, 2, 3). В (2, 4, 5). Г (1,4). Д. У пациента возможно наличие Т-клеточного иммунодефицита.

Главы 12, 13. А (2, 4). Б (2). В (2, 4).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- L**
L-формы 35
- A**
Авидность 365
Агар 66
Аденилатциклаза
 внеклеточная 250
Адсорбция вириона 102
Адьюваты 426
Активация иммунной системы 347
Актиномицеты 42
 нокардиоподобные 43
Аллерген 310, 376
Аллергия 376
 анафилактическая 379
 иммунокомплексная 379
 клеточноопосредованная 379
 цитотоксическая 379
Аминогликозиды 216
Аммонификация 71, 126
Амфиболиты 77
Анализ
 иммуноферментный 417
 радиоиммунологический 418
Анаморфы 45
Анатоксины 425
Анафилаксия 403
Анаэробы
 облигатные 88
 факультативные 89
Антибиотики 211
Антибиотикорезистентность 224
Антигенность 304, 363
- Антигены 303
 CD 318
 аллогенные 309
 аутогенные 308
 бактерий 318
 белковые 308
 вирусов 320
 гистосовместимости 313
 глобулярные 308
 жгутиковые 318
 забарьерные 308
 изогенные 310
 капсульные 319
 крови 312
 ксеногенные 309
 микробов 318
 небелковые 308
 неполноценные 309
 опухоль-ассоциированные 317
 вирусные 317
 мембранные 317
 мутантные 317
 нормальные 317
 сывороточные 317
 эмбриональные 317
 органоспецифические 310
 полноценные 308
 соматические 318
 суперкапсидные 320
 Т-зависимые 310
 тканеспецифические 310
 Т-независимые 311
 фибриллярные 308
 Форсмана 309

- человека 311
- экзогенные 308
- эндогенные 308
- ядерные 320
- Антисептика 148
- Антитела 355
 - доменные 430
 - моноклональные 362, 431
 - неполные 363
 - нормальные 362
 - поликлональные 363
 - полные 363
 - строение 356
- Антителопродукция 369
- Апоптоз 108
- Асептика 148
- Аскомицеты 47
- Ауксотрофы 73
- Аутотрофы 64
- Аффинность 364
- Аэробы облигатные 88
- Аэромонады 159

- Б**
- Базидиомицеты 48
- Базофилы 301, 341
- Бактериемия 237
- Бактерии 25
 - ветвящиеся 30
 - галофильные 66
 - извитые 30
 - колиформные 154
 - коринеформные 132
 - лизогенные 121
 - палочковидные 29
 - сферические 28
- Бактерионосительство 239
- Бактериофаги 116, 157, 429
 - вирулентные 119
 - умеренные 121
- Бактериоцины 245
- Бактероиды 138
- Барьеры организма
 - при инфекции 260
- Бделловибрионы 159
- Белки Бенс-Джонса 356
- Биопленки 99
- Биосинтез
 - аминокислот 73
 - нуклеотидов 75
 - углеводов 76
- Биотехнология 204
- Бифидобактерии 137
- Бляшки 114
- Болезни
 - аллергические 402
 - аутоиммунные 402
- Болезни
 - инфекционные 235
- Боррелии 41
- Брожение 71
 - маслянокислое 73
 - молочнокислое 72
 - муравьинокислое 72
 - спиртовое 72

- В**
- Вакцина(ы) 423
 - ассоциированные 426
 - векторные 424
 - депонированные 427
- Дженнера 423
- живые 424
- инактивированные 424
- комбинированные 426
- молекулярные 425, 426
- синтетические 426
- Вид 26

- Вирионы 53
 дефектные 109
Вироиды 58
Вирулентность 243
Вирусы 53
 дефектные 109
ДНК 105
 двунитевые 106
 однонитевые 106
с обратной
 транскрипцией 107
простые 54
РНК
 двунитевые 107
 минус-нитевые 105
 минус-однонитевые 106
 плюс-нитевые 105
 плюс-однонитевые 106
сложные 54
Вода 160
Волютин 36
Ворсинки 39
Восприимчивость 257
Выход вирусов 108
- Г**
Гаптены 309
Генетика
 вирусов 197
 иммуноглобулинов 367
 микробов 181
Геном 181
Гетеротрофы 64
Гетерохемоорганотрофы 65
Гиалуронидаза 245
Гибрид 363
Гиперчувствительность
 замедленная 380
 немедленная 377
- Гликокаликс 38
Гликопептиды 215, 221
Глицилциклиты 216
Гниение 71
Гранзимы 338
Гранулизин 338
Грибы 44
 Candida 138, 158
 гифальные 44
 дрожжевые 45
 несовершенные 46
 совершенные 46
- Д**
Дезинфекция 143
 механическая 143
 физическая 143
 химическая 143
Дейтеромицеты 46, 48
Делеция 189
Денитрификация 71, 126
Детерминанты 304
 аллотипические 364
 антигенные
 видовые 363
 идиопатические 364
 изотипические 364
 глубинные 304
 линейные 304
 поверхностные 304
Диморфизм 45
Диплококки 28
Дисбактериоз 140
 декомпенсированный 141
 компенсированный 140
 субкомпенсированный 141
Дисбиоз 229
Диффузия
 облегченная 76

- простая 76
 - ДНКаза 246
 - Дрожжи 47
 - Дупликация 189
 - Дыхание 69
 - анаэробное 71
 - сульфатное 71
- Ж**
- Жгутики 38
 - Жгутиконосцы 52
- З**
- Заболевания
 - лимфопрролиферативные 406
 - Зигомицеты 46
 - Зонд 200
- И**
- Идентификация 111
 - Имидазолы 220
 - Иммунитет 121, 270
 - антибактериальный 276, 392
 - антипротозойный 276
 - антитоксический 276, 392
 - виды 272
 - врожденный 274, 276
 - гуморальный 276
 - клеточный 276
 - кожи 387
 - местный 276, 387
 - нестерильный 276
 - оболочек слизистых 389
 - приобретенный 274
 - активный 275
 - естественный 274
 - искусственный 274
 - пассивный 275
 - противовирусный 276, 393
 - противоглистный 394
 - противогрибковый 276, 394
 - противоопухолевый 276, 396
 - противопаразитарный 394
 - системный 276
 - стерильный 276
 - трансплантационный 276, 395
 - Иммуоблоттинг 418
 - Иммуногенность 305
 - Иммуногены 310
 - Иммуноглобулины 355, 358
 - А 361
 - секреторный 361
 - В 362
 - Е 362
 - М 360
 - рецепторные 362
 - Иммунодефициты 399
 - вторичные 401
 - первичные 400
 - Иммунодоминантность 306
 - Иммунокоррекция 406
 - Иммунология 269
 - беременности 397
 - развитие 269
 - Иммуномодуляторы 406, 431
 - экзогенные 431
 - эндогенные 432
 - Иммунопоз 326
 - Иммунопрофилактика 421
 - Иммунотерапия 421
 - Иммуноэлектрофорез 414
 - Инвазия 249
 - Инверсия 189
 - Индекс 153
 - Индикация 111
 - Индукция 122
 - Инженерия генетическая 204
 - Интегроны 185

- Интервенция антигенная 321
Интерференция 289
Инфекция(и) 235
 антропозные 238
 бактериальные 235
 вирусные 235
 вторичная 237
 генерализованная 236
 госпитальная 238
 грибковые 235
 зоонозные 238
 латентная 109, 239
 медленная 239
 местная 236
 острые 238
 прионные 235
 протозойные 235
 смешанная 237
 сапронозные 238
 хронические 238
 экзогенные 236
 эндемическая 238
 эндогенные 236
 эпидемическая 238
Инициация 74
Исследование
 воды 159
 воздуха 166
 молока 170
 почвы 163
 продуктов молочных 172
- К**
Календарь прививок 428
Капсула 37
Карбоксипенициллины 214
Карбапенемы 215
Капсид 54
Кассета генная 185
Каталаза 246
Кератиноциты 388
Киллеры
 естественные 298, 339
 кровяные 340
 тканевые 340
Киллинг 373
Клан 27
Клетки
 антигенпрезентирующие 316,
 330
Гринстейна 279
дендритные 342
Лангерганса 279, 388
Панета 281
регуляторные 328
системы иммунной 327
тучные 301, 341
эффektorные 330
Клостридии 137, 156
Кожа 277, 387
Кокки 28
Колифаги 161
Колонизация 249, 281
Компетентность 196
Комплементация 197
Конверсия 122
Конъюгация 192
Кортекс 40
Культивирование
 бактерий 97
 вирусов 111
Культуры клеток
 однослойные 112
 органные 113
 первичные 113
 перевиваемые 113
 полуперевиваемые 113
 супспензионные 112

- Л**
Лактамы 213
Лактобактерии 137
Лейшмании 52
Лептоспиры 41
Лимфа 327
Лимфопоз 323
Лимфоциты 331
 В 333
 Т 335
 γδТ 339
Линкозамиды 217
Лиофилизация 61
Липополисахарид 34
Липопептиды 216, 222
Литотрофы 64
Лямблия 52
- М**
Макролиды 217
Макрофаги 295, 340
Масса молекулярная 306
Мезосомы 36
Мезофилы 86
Мембрана
 наружная 33
 цитоплазматическая 35
Метаболизм
 бродильный 71
 вторичный 85
 конструктивный 73
 окислительный 69
 энергетический 68
Метод(ы)
 диагностики генетические 198
 Коха 166
 секвенирования 204
Микоплазмы 43
Микориза 176
Микробиология
 медицинская 15
 аллергическая 17
 бактериологическая 17
 биологическая 17
 задачи 17
 микроскопическая 17
 молекулярно-
 биологическая 18
 серологическая 17
 хемотаксономическая 17
санитарная 150
 косвенная 151
 прямая 151
Микробы 15, 19
 клеточные 25
 неклеточные 25
 патогенные 16
 резиденты 16
 условно-патогенные 16
Микрокапсула 37
Микрококки 28
Микроорганизмы 25
 санитарно-показательные 152
Микроскопия электронная
 иммунная 419
Микрофлора
 влагалища 138
 воды 127
 воздуха 128
 желудка 133
 кишечника 137
 кишки
 толстой 133
 тонкой 133
 кожи 132
 новорожденных 136

- нормальная 130
 пищевода 133
 почвы 126
 путей
 дыхательных верхних 132
 рта 132
 тракта
 мочеполового 138
 тракта пищеварительного 132
 транзиторная 129
 факультативная 129
 человека 129
 Микрoэкология 125
 Миндалины 327
 Мицелий 43
 Мозг костный 323
 Монобактамы 215
 Моноинфекция 237
 Мутагены 189
 Мутации 188
 индуцированные 189
 спонтанные 189
 супрессорные 188
- Н**
- Нейраминидаза 245
 Нейрофилы 294
 Нейтрализация 365
 Неоантигены 308
 Нитроимидазолы 220
 Нитрофикация 126
 Нитрофураны 220
 Нуклеоид 30, 37
- О**
- Области гипермутабельные 368
 Оксазолидиноны 220
 Организм хозяина 257
 Органотрофы 65
- Органы иммунной системы
 периферические 326
 центральные 323
 Острова патогенности 187
- П**
- Палочка
 кишечная 154, 164, 174
 синегнойная 157
 Память иммунологическая 381
 Паразиты 52, 65
 облигатные 65
 факультативные 65
 Паратоп 364
 Патогенность 242
 Пелликула 48
 Пенициллины 213
 полусинтетические 213
 антисинегнойные 214
 депо-препарат 213
 кислотоустойчивые 213
 комбинированные 214
 пенициллиназоустойчивые 213
 широкого спектра 214
 природные 213
 Пептидогликан 31, 221, 254
 Персистенция
 возбудителя 253
 микроорганизмов 254
 Перфорин 337
 Печень 327
 Пили 39
 Питание бактерий 61
 Плазмиды 37, 182
 интегративные 182
 мобилизуемые 183
 трансмиссивные 183
 Полиены 218
 Полимиксины 223

- Полипептиды 218
Популяция бактерий 98
Порины 35
Последовательности
 вставочные 184
Почкование 108
Пребиотики 142
Препараты
 бифидосодержащие 142
 иммунобиологические 422, 429
 колисодержащие 142
 лактосодержащие 142
 химиотерапевтические
 антимикробные 209
 синтетические 218
 микробостатические 210
 микробоцидные 210
 противовирусные 210, 231
Прионы 58
Природа антигена 306
Пробиотики 141, 429
Провирус 110
Прокаливание 145
Прокариоты 19
Проникновение вирусов 102
Проспора 39
Простейшие 48
Протей 156
Протеосомы 315
Протопласты 35
Прототрофы 73
Профаг 121
Психрофилы 86
- Р**
Размножение бактерий 91
Распространение микробов 125
Растворимость антигена 307
Реактивация генетическая 197
- Реакция(и)
 агглютинации 409, 410
 непрямая 411
 пассивная 411
 прямая 410
 развернутая 411
 анафилактические 403
 антиген–антитело 409
 гемагглютинации 410
 гемадсорбции 115
 гиперчувствительности 376
 иммунодиффузии
 по Оухтерлони 413
 радиальной 414
 иммунокомплексные 404
 иммунофлюоресценции 416
 непрямая 416
 прямая 416
 Кумбса 313, 411
 лизиса 414
 нейтрализации 409, 419
 опосредованные
 Т-лимфоцитами 405
 преципитации 409, 412
 связывания компонента 414
 серологические 409
 флоккуляции 414
 цветная 115
 цитотоксические 404
- Реакция(и) аллергическая
 III типа 380
 II типа 380
 I типа 378
- Резистентность
 колониционная 131, 281
- Резисфера 176
- Резус-
 конфликт 313
 фактор 313

- Реинфекция 237
 Рекомбинация
 генетическая 190, 197
 гомологичная 191
 незаконная 191
 сайт-специфическая 191
 Репликация вирусов 105
 Репродукция вируса 102
 Рестриктазы 198
 Ретровирусы 105
 Рецептор иммунитета
 врожденного 290
 Рибосомы 36
 Риккетсии 41
 Рифамицины 217
 Рост бактерий 91
- С**
- Сальмонеллы 157
 Сапрофиты 65
 Сарцины 29
 Селезенка 326
 Сепсис 237
 Септикопиемия 237
 Сердцевина 56
 Синбиотики 142
 Синтез
 белков 74
 вирусных 104
 Система
 иммунная 322
 комплемента 282
 Слизь 38
 Смешивание фенотипическое 197
 Состав химический 306
 Специфичность 307
 Спириллы 30
 Спирохеты 30, 40
- Сплайсинг 368
 Споровики 52
 Споры 39
 Среда питательная
 обогащенная 67
 простая 66, 67
 сложная 66
 элективная 66
 Средства антисептические 148
 Статус иммунный 397
 Стафилококки 29, 138
 Стенка
 клеточная 30
 споры 39
 Стерилизация 145
 дробная 146
 жаром сухим 145
 лучевая 147
 механическая 147
 паром 146
 химическая 147
 Стрептограммины 217
 Стрептококки 28, 138
 Сульфаниламиды 219, 223
 Суперантигены 311
 Супероксиддисмутаза 89, 246
 Супрессия иммунного ответа 349
 Сферопласты 35
 Сыворотки иммунные 430
 гетерогенные 430
- Т**
- Телеоморфы 45
 Тельца
 ретикулярные 42
 элементарные 42
 Терминация 74
 Термофилы 157

- Тетрапептид 32
Тетрациклины 216
Тимус 323
Тиндализация 147
Титр 153
Т-киллеры 337
Токсигенность 250
Толерантность
иммунологическая 382
врожденная 382
высокодозная 383
локальная 384
низкодозная 383
поливалентная 383
приобретенная 383
расщепленная 383
центральная 384
Толероген 310
Транзиция 189
Трансдукция 194
общая 194
специфическая 194
Транскрипция 104
Транслокация 189
радикалов 76
Трансляция 104
Транспозоны 185
Транспорт веществ 76
активный 76
пассивный 76
Трансформация 195
Тремофилы 87
термотолерантные 87
факультативные 87
экстремальные 87
Трепонемы 41
Трипаносомы 52
Трихомонада влагалищная 52
Тромбоцитопения 220
Т-хелперы 335
- У**
Узлы лимфатические 326
Уничтожение микробов 143
Уреидопенициллины 214
Устойчивость
приобретенная 224
природная 224
- Ф**
Фаготипирование 122
Фагоцитоз 296
Фагоцитозиммунный 373
Ферментация белков 73
Ферменты бактерий 67
Фибринолизин 245
Физиология
бактерий 61
вирусов 101
Фолликулы лимфатические 327
Фототрофы 64
- Х**
Хемотрофы 64
Химиотерапия 209
Хинолоны/фторхинолоны 219
Хламидии 42
Хлорамфеникол 217
Хромосома бактериальная 181
- Ц**
Цефалоспорины 214
Цитокичность клеточно-
опосредованная
антителозависимая 374
антителонезависимая 375

Цитофлюориметрия иммунная
 проточная 416

Ч

Чувствительность
 инфекционная 257
Чужеродность 305

Ш

Шапероны 75
Шлеппер 309
Шок
 анафилактический 230
 эндотоксический 231
Штамм(ы) 27
 аттенуированные 424
 дивергентные 424

Э

Экзоспориум 40
Экзотоксины 245, 250
Экзоферменты 67
Эластаза 246
Элонгация 74
Эндотоксины 250
Эндоферменты 67
Энтерококки 155
Эозинофилы 299, 341
Эпидермис 388
Эпитоп 304
Эубактерии 137
Эукариоты 19
Эффект
 цитопатический 114
Эшерихии 138

ПРИГЛАШЕНИЕ К СОТРУДНИЧЕСТВУ

Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа» приглашает к сотрудничеству авторов и редакторов медицинской литературы.

ИЗДАТЕЛЬСТВО СПЕЦИАЛИЗИРУЕТСЯ НА ВЫПУСКЕ
учебной литературы для вузов и колледжей, атласов,
руководств для врачей, переводных изданий.

По вопросам издания рукописей обращайтесь в отдел по работе с авторами.
Тел. 8 (495) 921-39-07.

Учебное издание

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ, ВИРУСОЛОГИЯ, ИММУНОЛОГИЯ

В двух томах

Том 1

Под редакцией

**Виталия Васильевича Зверева,
Марины Николаевны Бойченко**

2-е издание, переработанное и дополненное

Зав. редакцией *А.В. Андреева*

Менеджер проекта *А.М. Страхова*

Научный редакторы *И.В. Кислицына*

Выпускающие редакторы

И.М. Науменко, В.А. Гончарова, Т.В. Журавлёва

Корректоры *Н.Н. Ширяева, Т.М. Ряшенцева*

Компьютерная верстка *А.В. Кубрак*

Дизайн обложки *Д.Т. Халмурзина*

Ведущий технолог *Ю.В. Поворова*

Подписано в печать 14.05.2021. Формат 60×90 1/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 28 усл. печ. л.
Доп. тираж 1000 экз. Заказ № 1049.

ООО Издательская группа «ГЭОТАР-Медиа».
115035, Москва, ул. Садовническая, д. 11, стр. 12.
Тел.: 8 (495) 921-39-07.
E-mail: info@geotar.ru, <http://www.geotar.ru>.

Отпечатано в ООО «Типография «Перфектум».
428000, г. Чебоксары, ул. К. Маркса, д. 52.

ISBN 978-5-9704-5835-8



9 785970 458358 >

В создании книги принимали участие сотрудники кафедр микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова, Московского государственного медико-стоматологического университета им. А.И. Евдокимова, Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, государственных медицинских университетов Омска, Оренбурга, Челябинска.

Издание состоит из двух томов, включающих 19 глав, в которых последовательно разбираются вопросы общей и частной микробиологии, вирусологии и иммунологии. Материал, изложенный в обоих томах, значительно переработан согласно современным научным тенденциям и дополнен новыми рисунками, схемами, таблицами.

Учебник написан в соответствии с официально утвержденными программами преподавания микробиологии, вирусологии и иммунологии для студентов лечебного, педиатрического и медико-профилактического факультетов медицинских вузов.

ЧАСТЬ I

Общая иммунология

- Введение в микробиологию и иммунологию
- Морфология и классификация микробов
- Физиология микробов
- Экология микробов — микроэкология
- Генетика микробов
- Антимикробные химиотерапевтические препараты
- Учение об инфекции

ЧАСТЬ II

Общая микробиология

- Учение об иммунитете и факторы врожденного иммунитета
- Антигены и иммунная система человека
- Основные формы иммунного реагирования
- Особенности иммунитета при различных локализациях и состояниях
- Иммунодиагностические реакции
- Иммунопрофилактика и иммунотерапия



ISBN 978-5-9704-5835-8



9 785970 458358 >

Лечебное дело

www.geolab.ru

www.medknigaservis.ru

