

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
Омская государственная медицинская академия

Н.В.Рудаков

**Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии**

Часть первая. Общая микробиология, вирусология и иммунология

Омск - 2002

ББК 52.64 + 52.523я7

УДК 579+578+612.017.1(07)

Р-83

Рудаков Н.В. Краткий курс лекций по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. В 2 частях: Учебное пособие. - Омск, 2002.- с.

ISBN

Н.В.Рудаков - зав.кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Омской государственной медицинской академии, руководитель лаборатории зоонозных инфекций Омского НИИ природноочаговых инфекций, доктор медицинских наук.

В учебном пособии представлены краткие материалы в виде лекций по основным направлениям общей и частной бактериологии, вирусологии и иммунологии в соответствии с “Программой по микробиологии, вирусологии, иммунологии для студентов лечебных, медико - профилактических и педиатрических факультетов высших медицинских учебных заведений” (М.,2000).

Учебное пособие может быть полезным для студентов, изучающих микробиологию, вирусологию, иммунологию и смежные дисциплины, слушателям системы последипломого образования.

Рецензенты :

доктор медицинских наук, профессор В.В. Далматов

доктор медицинских наук, профессор В.Н. Дроздов

Рекомендуется к изданию редакторско - издательским советом Омской государственной медицинской академии.

© Н.В.Рудаков,2002

## **Лекция № 1. История развития микробиологии, вирусологии и иммунологии.**

**Предмет, методы, задачи.**

### **1. Введение**

**Микробиология** ( от греч. micros- малый, bios- жизнь, logos- учение, т.е. учение о малых формах жизни) - наука, изучающая организмы, неразличимые (невидимые) невооруженным какой- либо оптикой глазом, которые за свои микроскопические размеры называют **микроорганизмы** (микробы).

**Предметом** изучения микробиологии является их морфология, физиология, генетика, систематика, экология и взаимоотношения с другими формами жизни.

В *таксономическом* отношении микроорганизмы очень разнообразны. Они включают **прионы, вирусы, бактерии, водоросли, грибы, простейшие** и даже микроскопические многоклеточные животные.

По наличию и строению клеток вся живая природа может быть разделена на **прокариоты** (не имеющие истинного ядра), **эукариоты** (имеющие ядро) и **не имеющие клеточного строения** формы жизни. Последние для своего существования нуждаются в клетках, т.е. являются *внутриклеточными формами жизни* (рис.1).

По уровню организации геномов, наличию и составу белоксинтезирующих систем и клеточной стенки все живое делят на 4 царства жизни: **эукариоты, эубактерии, архебактерии, вирусы и плазмиды.**

**К прокариотам**, объединяющим эубактерии и архебактерии, относят бактерии, низшие (сине- зеленые) водоросли, спирохеты, актиномицеты, архебактерии, риккетсии, хламидии, микоплазмы. Простейшие, дрожжи и нитчатые грибы- **эукариоты.**

**Микроорганизмы-** это невидимые простым глазом представители всех царств жизни. Они занимают низшие (наиболее древние) ступени эволюции, но играют важнейшую роль в экономике, круговороте веществ в природе, в нормальном существовании и патологии растений, животных, человека.

Микроорганизмы заселяли Землю еще 3- 4 млрд. лет назад, задолго до появления высших растений и животных. Микробы представляют самую многочисленную и разнообразную группу живых существ. Микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в природе и являются единственными формами живой материи, заселяющими любые, самые разнообразные субстраты (**среды обитания**), включая и более высокоорганизованные организмы животного и растительного мира.

**Можно сказать, что без микроорганизмов жизнь в ее современных формах была бы просто невозможна.**

файл живая природа.док.

Микроорганизмы создали атмосферу, осуществляют кругоборот веществ и энергии в природе, расщепление органических соединений и синтез белка, способствуют плодородию почв, образованию нефти и каменного угля, выветриванию горных пород, многим другим природным явлениям.

С помощью микроорганизмов осуществляются важные производственные процессы - хлебопечение, виноделие и пивоварение, производство органических кислот, ферментов, пищевых белков, гормонов, антибиотиков и других лекарственных препаратов.

Микроорганизмы как никакая другая форма жизни испытывает воздействие разнообразных природных и **антрополических** (связанных с деятельностью людей) факторов, что, с учетом их короткого срока жизни и высокой скорости размножения, способствует их быстрому эволюционированию.

Наибольшую печальную известность имеют **патогенные микроорганизмы (микробы- патогены)** - возбудители заболеваний человека, животных, растений, насекомых. Микроорганизмы, приобретающие в процессе эволюции **патогенность** для человека (способность вызывать заболевания), вызывают **эпидемии**, уносящие миллионы жизней. До настоящего времени вызываемые микроорганизмами **инфекционные заболевания** остаются одной из основных причин смертности, причиняют существенный ущерб экономике.

Изменчивость патогенных микроорганизмов составляет основную движущую силу в развитии и совершенствовании систем защиты высших животных и человека от всего чужеродного (чужеродной генетической информации). Более того, микроорганизмы являлись до недавнего времени важным фактором естественного отбора в человеческой популяции ( пример- чума и современное распространение групп крови). В настоящее время **вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)** посягнул на святое святых человека- его иммунную систему.

## 2. Основные этапы развития микробиологии, вирусологии и иммунологии

К ним можно отнести следующие:

1. *Эмпирических знаний* ( до изобретения микроскопов и их применения для изучения микромира).

Дж.Фракасторо (1546г.) предположил живую природу агентов инфекционных заболеваний- *contagium vivum*.

2. *Морфологический период* занял около двухсот лет.

Антони ван Левенгук в 1675г. впервые описал простейших, в 1683г.- основные формы бактерий. Несовершенство приборов ( максимальное увеличение микроскопов X300) и

методов изучения микромира не способствовало быстрому накоплению научных знаний о микроорганизмах.

### 3. Физиологический период (с 1875г.)- эпоха Л.Пастера и Р.Коха.

Л.Пастер- изучение микробиологических основ процессов брожения и гниения, развитие промышленной микробиологии, выяснение роли микроорганизмов в кругообороте веществ в природе, открытие **анаэробных** микроорганизмов, разработка принципов **асептики**, методов **стерилизации**, ослабления (**аттенуации**) **вирулентности** и получения **вакцин (вакцинных штаммов)**.

Р.Кох- метод выделения **чистых культур** на твердых питательных средах, способы окраски бактерий анилиновыми красителями, открытие возбудителей сибирской язвы, холеры (**запятой Коха**), туберкулеза (**палочки Коха**), совершенствование техники микроскопии. Экспериментальное обоснование критериев Хенле, известные как постулаты (триада) Хенле- Коха.

### 4. Иммунологический период.

И.И.Мечников- “поэт микробиологии” по образному определению Эмиля Ру. Он создал новую эпоху в микробиологии - учение о невосприимчивости (иммунитете), разработав теорию фагоцитоза и обосновав клеточную теорию иммунитета.

Одновременно накапливались данные о выработке в организме **антител** против бактерий и их **токсинов**, позволившие П.Эрлиху разработать гуморальную теорию иммунитета. В последующей многолетней и плодотворной дискуссии между сторонниками фагоцитарной и гуморальной теорий были раскрыты многие механизмы иммунитета и родилась наука **иммунология**.

В дальнейшем было установлено, что наследственный и приобретенный иммунитет зависит от согласованной деятельности пяти основных систем : макрофагов, комплемента, Т- и В- лимфоцитов, интерферонов, главной системы гистосовместимости, обеспечивающих различные формы иммунного ответа. И.И.Мечникову и П.Эрлиху в 1908г. была присуждена Нобелевская премия.

12 февраля 1892г. на заседании Российской академии наук Д.И.Ивановский сообщил, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус. Эту дату можно считать днем рождения **вирусологии**, а Д.И.Ивановского- ее основоположником. Впоследствии оказалось, что вирусы вызывают заболевания не только растений, но и человека, животных и даже бактерий. Однако только после установления природы гена и генетического кода вирусы были отнесены к живой природе.

### 5. Следующим важным этапом в развитии микробиологии стало *открытие анти-*

*биотиков*. В 1929г. А.Флеминг открыл пенициллин и началась эра антибиотикотерапии, приведшая к революционному прогрессу медицины. В дальнейшем выяснилось, что микробы приспосабливаются к антибиотикам, а изучение механизмов лекарственной устойчивости привело к открытию второго- **внехромосомного (плазмидного) генома** бактерий.

Изучение **плазмид** показало, что они представляют собой еще более просто устроенные организмы, чем вирусы, и в отличие от **бактериофагов** не вредят бактериям, а наделяют их дополнительными биологическими свойствами. Открытие плазмид существенно дополнило представления о формах существования жизни и возможных путях ее эволюции.

6. Современный *молекулярно- генетический этап* развития микробиологии, вирусологии и иммунологии начался во второй половине 20 века в связи с достижениями генетики и молекулярной биологии, созданием электронного микроскопа.

В опытах на бактериях была доказана роль ДНК в передаче наследственных признаков. Использование бактерий, вирусов, а затем и плазмид в качестве объектов молекулярно- биологических и генетических исследований привело к более глубокому пониманию фундаментальных процессов, лежащих в основе жизни. Выяснение принципов кодирования генетической информации в ДНК бактерий и установление универсальности генетического кода позволило лучше понимать молекулярно- генетические закономерности, свойственные более высоко организованным организмам.

Расшифровка генома кишечной палочки сделало возможным конструирование и пересадку генов. К настоящему времени **генная инженерия** создала новые направления **биотехнологии**.

Расшифрованы молекулярно- генетическая организация многих вирусов и механизмы их взаимодействия с клетками, установлены способность вирусной ДНК встраиваться в геном чувствительной клетки и основные механизмы вирусного канцерогенеза.

Подлинную революцию претерпела иммунология, далеко вышедшая за рамки инфекционной иммунологии и ставшая одной из наиболее важных фундаментальных медико- биологических дисциплин. К настоящему времени иммунология- это наука, изучающая не только защиту от инфекций. В современном понимании *иммунология- это наука, изучающая механизмы самозащиты организма от всего генетически чужеродного, поддержании структурной и функциональной целостности организма*.

Иммунология в настоящее время включает ряд специализированных направлений, среди которых, наряду с инфекционной иммунологией, к наиболее значимым относятся

иммуногенетика, иммуноморфология, трансплантационная иммунология, иммунопатология, иммуногематология, онкоиммунология, иммунология онтогенеза, вакцинология и прикладная иммунодиагностика.

Микробиология и вирусология как *фундаментальные биологические науки* также включают ряд самостоятельных научных дисциплин со своими целями и задачами: общую, техническую (промышленную), сельскохозяйственную, ветеринарную и имеющую наибольшее значение для человечества *медицинскую микробиологию и вирусологию*.

*Медицинская микробиология и вирусология изучает возбудителей инфекционных болезней человека (их морфологию, физиологию, экологию, биологические и генетические характеристики), разрабатывает методы их культивирования и идентификации, специфические методы их диагностики, лечения и профилактики.*

К отдельным наиболее важным разделам медицинской микробиологии и вирусологии можно отнести клиническую микробиологию, санитарную микробиологию, медицинскую микологию и протозоологию, медицинскую паразитологию, учение о **сапронозах**.

#### *7. Перспективы развития.*

На пороге 21 века микробиология, вирусология и иммунология представляют одно из ведущих направлений биологии и медицины, интенсивно развивающееся и расширяющее границы человеческих знаний.

Иммунология вплотную подошла к регулированию механизмов самозащиты организма, коррекции иммунодефицитов, решению проблемы СПИДа, борьбе с онкозаболеваниями.

Создаются новые генно- инженерные вакцины, появляются новые данные об открытии инфекционных агентов - возбудителей “соматических” заболеваний (язвенная болезнь желудка, гастриты, гепатиты, инфаркт миокарда, склероз, отдельные формы бронхиальной астмы, шизофрения и др.).

Появилось понятие о **новых и возвращающихся инфекциях** (emerging and reemerging infections). Примеры реставрации старых патогенов- микобактерии туберкулеза, риккетсии группы клещевой пятнистой лихорадки и ряд других возбудителей природноочаговых инфекций. Среди новых патогенов- вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), легионеллы, бартонеллы, эрлихии, хеликобактер, хламидии (*Chlamydia pneumoniae*). Наконец, открыты **вириды и прионы** - новые классы инфекционных агентов.

Вириды - инфекционные агенты, вызывающие у растений поражения, сходные с вирусными, однако эти возбудители отличаются от вирусов рядом признаков: отсутствием белковой оболочки (голая инфекционная РНК), антигенных свойств, одноцепочечной

кольцевой структурой РНК ( из вирусов - только у вируса гепатита D), малыми размерами РНК.

Прионы (proteinaceous infectious particle- белкоподобная инфекционная частица) представляют лишенные РНК белковые структуры, являющиеся возбудителями некоторых **медленных инфекций** человека и животных, характеризующихся летальными поражениями центральной нервной системы по типу *губкообразных энцефалопатий*- куру, болезнь Крейтцфельдта- Якоба, синдром Герстманна- Страусслера- Шайнкера, амниотрофический лейкоспонгиоз, губкообразная энцефалопатия коров (коровье “бешенство”), скрепи у овец, энцефалопатия норок, хроническая изнуряющая болезнь оленей и лосей. Предполагается, что прионы могут иметь значение в этиологии шизофрении, миопатий. Существенные отличия от вирусов, прежде всего отсутствие собственного генома, не позволяют пока рассматривать прионы в качестве представителей живой природы.

### **3. Задачи медицинской микробиологии.**

К ним можно отнести следующие:

1. Установление этиологической (причинной) роли микроорганизмов в норме и патологии.

2. Разработка методов диагностики, специфической профилактики и лечения инфекционных заболеваний, индикации (выявления) и идентификации (определения) возбудителей.

3. Бактериологический и вирусологический контроль окружающей среды, продуктов питания, соблюдения режима стерилизации и надзор за источниками инфекции в лечебных и детских учреждениях.

4. Контроль за чувствительностью микроорганизмов к антибиотикам и другим лечебным препаратам, состоянием микробиоценозов (*микрофлорой*) поверхностей и полостей тела человека.

### **4. Методы микробиологической диагностики.**

Методы лабораторной диагностики инфекционных агентов многочисленны, к основным можно отнести следующие.

1. Микроскопический- с использованием приборов для микроскопии. Определяют форму, размеры, взаиморасположение микроорганизмов, их структуру, способность окрашиваться определенными красителями.

К основным способам микроскопии можно отнести *световую* микроскопию (с разновидностями- иммерсионная, темнопольная, фазово - контрастная, люминесцентная и др.) и *электронную* микроскопию. К этим методам можно также отнести автордиогра-

фию (изотопный метод выявления).

2.Микробиологический (бактериологический и вирусологический) - выделение чистой культуры и ее идентификация.

3.Биологический - заражение лабораторных животных с воспроизведением инфекционного процесса на чувствительных моделях (биопроба).

4.Иммунологический ( варианты - серологический, аллергологический) - используется для выявления **антигенов** возбудителя или **антител** к ним.

5.Молекулярно- генетический - ДНК- и РНК- зонды, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и многие другие.

Заключая изложенный материал, необходимо отметить теоретическое значение современной микробиологии, вирусологии и иммунологии. Достижения этих наук позволили изучить фундаментальные процессы жизнедеятельности на молекулярно- генетическом уровне. Они обуславливают современное понимание сущности механизмов развития многих заболеваний и направления их более эффективного предупреждения и лечения.

## **Лекция № 2. Систематика и морфология микроорганизмов.**

### **1. Систематика микроорганизмов.**

**Систематика**- распределение микроорганизмов в соответствии с их происхождением и биологическим сходством. Систематика занимается всесторонним описанием **видов** организмов, выяснением степени родственных отношений между ними и объединением их в различные по уровню родства классификационные единицы- **таксоны**. Основные вопросы, решаемые при систематике (три аспекта, три кита систематики)- **классификация, идентификация и номенклатура**.

**Классификация**- распределение (объединение) организмов в соответствии с их общими свойствами (сходными генотипическими и фенотипическими признаками) по различным таксонам.

**Таксономия**- наука о методах и принципах распределения (классификации) организмов в соответствии с их иерархией. Наиболее часто используют следующие таксономические единицы (таксоны)- **штамм, вид, род**. Последующие более крупные таксоны- **семейство, порядок, класс**.

В современном представлении вид в микробиологии- совокупность микроорганизмов, имеющих общее эволюционное происхождение, близкий генотип (высокую степень генетической гомологии, как правило более 60%) и максимально близкие фенотипические характеристики.

**Нумерическая (численная) таксономия** основывается на использовании максимального количества сопоставляемых признаков и математическом учете степени соответствия. Большое число сравниваемых фенотипических признаков и принцип их равной значимости затрудняло классификацию.

При изучении, идентификации и классификации микроорганизмов чаще всего изучают следующие (гено- и фенотипические) характеристики:

1. Морфологические- форма, величина, особенности взаиморасположения, структура.
2. Тинкториальные- отношение к различным красителям (характер окрашивания), прежде всего к **окраске по Граму**. По этому признаку все микроорганизмы делят на **грамположительные и грамотрицательные**.

*Морфологические свойства и отношение к окраске по Граму позволяют как правило отнести изучаемый микроорганизм к крупным таксонам- семейству, роду.*

3. Культуральные- характер роста микроорганизма на питательных средах.
4. Биохимические- способность ферментировать различные *субстраты* (углеводы, белки и аминокислоты и др.), образовывать в процессе жизнедеятельности различные

биохимические продукты за счет активности различных ферментных систем и особенностей обмена веществ.

5. Антигенные- зависят преимущественно от химического состава и строения клеточной стенки, наличия жгутиков, капсулы, распознаются по способности макроорганизма (хозяина) вырабатывать антитела и другие формы иммунного ответа, выявляются в иммунологических реакциях.

6. Физиологические- способы углеводного (**аутоотрофы, гетеротрофы**), азотного (**аминоавтотрофы, аминокетотрофы**) и других видов питания, тип дыхания (**аэробы, микроаэрофилы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы**).

7. Подвижность и типы движения.

8. Способность к **спорообразованию**, характер спор.

9. Чувствительность к бактериофагам, фаготипирование.

10. Химический состав клеточных стенок- основные сахара и аминокислоты, липидный и жинокислотный состав.

11. Белковый спектр (полипептидный профиль).

12. Чувствительность к антибиотикам и другим лекарственным препаратам.

13. Генотипические (использование методов геносистематики).

В последние десятилетия для классификации микроорганизмов, помимо их фенотипических характеристик (см. пп.1- 12), все более широко и эффективно используются различные генетические методы (изучение генотипа- *генотипических свойств*). Используются все более совершенные методы- рестрикционный анализ, ДНК- ДНК гибридизация, ПЦР, сиквенс и др. В основе большинства методов лежит принцип определения степени гомологии генетического материала (ДНК, РНК). При этом чаще исходят из условного допущения, что степень гомологии более 60% ( для некоторых групп микроорганизмов- 80%) свидетельствует о принадлежности микроорганизмов к одному виду (различные генотипы - один геновид), 40- 60%- к одному роду.

### **Идентификация.**

Основные фено- и генотипические характеристики, используемые для классификации микроорганизмов, используются и для идентификации, т.е. *установления их таксономического положения и прежде всего видовой принадлежности- наиболее важного аспекта микробиологической диагностики инфекционных заболеваний*. Идентификация осуществляется на основе изучения фено- и генотипических характеристик изучаемого инфекционного агента и сравнения их с характеристиками известных видов. При этой работе часто применяют эталонные штаммы микроорганизмов, стандартные антигены и им-

мунные сыворотки к известным прототипным микроорганизмам. У патогенных микроорганизмов чаще изучают морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства.

**Номенклатура**- название микроорганизмов в соответствии с международными правилами. Для обозначения видов бактерий используют бинарную латинскую номенклатуру род/вид, состоящую из названия рода (пишется с заглавной буквы) и вида (со строчной буквы). Примеры- *Shigella flexneri*, *Rickettsia sibirica*.

В микробиологии часто используется и ряд других терминов для характеристики микроорганизмов.

**Штамм**- любой конкретный образец (изолят) данного вида. Штаммы одного вида, различающиеся по антигенным характеристикам, называют **серотипами (серовариантами- сокращенно сероварами)**, по чувствительности к специфическим фагам- **фаготипами**, биохимическим свойствам- **хемоварами**, по биологическим свойствам- **биоварами** и т.д.

**Колония**- видимая изолированная структура при размножении бактерий на плотных питательных средах, может развиваться из одной или нескольких родительских клеток. Если колония развилась из одной родительской клетки, то потомство называется **клон**.

**Культура**- вся совокупность микроорганизмов одного вида, выросших на плотной или жидкой питательной среде.

Основной принцип бактериологической работы- *выделение и изучение свойств только чистых* (однородных, без примеси посторонней микрофлоры) культур.

## **2. Морфология бактерий.**

Прокариоты отличаются от эукариот по ряду основных признаков.

- 1.Отсутствие истинного дифференцированного ядра (ядерной мембраны).
- 2.Отсутствие развитой эндоплазматической сети, аппарата Гольджи.
- 3.Отсутствие митохондрий, хлоропластов, лизосом.
- 4.Неспособность к эндоцитозу (захвату частиц пищи).
- 5.Клеточное деление не связано с циклическими изменениями строения клетки.
6. Значительно меньшие размеры (как правило). Большая часть бактерий имеет размеры 0,5- 0,8 микрометров (**мкм**) x 2- 3 мкм.

По форме выделяют следующие основные группы микроорганизмов.

- 1.Шаровидные или кокки ( с греч.- зерно).
- 2.Палочковидные.
- 3.Извитые.

#### 4. Нитевидные.

Кокковидные бактерии (кокки) по характеру взаиморасположения после деления подразделяются на ряд вариантов.

1. **Микрококки.** Клетки расположены в одиночку. Входят в состав нормальной микрофлоры, находятся во внешней среде. Заболеваний у людей не вызывают.

2. **Диплококки.** Деление этих микроорганизмов происходит в одной плоскости, образуются пары клеток. Среди диплококков много патогенных микроорганизмов- гонококк, менингококк, пневмококк.

3. **Стрептококки.** Деление осуществляется в одной плоскости, размножающиеся клетки сохраняют связь (не расходятся), образуя цепочки. Много патогенных микроорганизмов- возбудители ангин, скарлатины, гнойных воспалительных процессов.

4. **Тетракокки.** Деление в двух взаимоперпендикулярных плоскостях с образованием тетрад (т.е. по четыре клетки). Медицинского значения не имеют.

5. **Сарцины.** Деление в трех взаимоперпендикулярных плоскостях, образуя тюки (пакеты) из 8, 16 и большего количества клеток. Часто обнаруживают в воздухе.

6. **Стафилококки** (от лат.- гроздь винограда). Делятся беспорядочно в различных плоскостях, образуя скопления, напоминающие грозди винограда. Вызывают многочисленные болезни, прежде всего гнойно- воспалительные.

#### Палочковидные формы микроорганизмов.

1. Бактерии- палочки, не образующие спор.

2. Бациллы- аэробные спорообразующие микробы. Диаметр споры обычно не превышает размера (“ширины”) клетки (эндоспоры).

3. Клостридии- анаэробные спорообразующие микробы. Диаметр споры больше поперечника (диаметра) вегетативной клетки, в связи с чем клетка напоминает веретено или теннисную ракетку.

Необходимо иметь в виду, что термин “бактерия” часто используют для обозначения всех микробов- прокариот. В более узком (морфологическом) значении бактерии- палочковидные формы прокариот, не имеющих спор.

#### Извитые формы микроорганизмов.

1. Вибрионы и кампилобактерии- имеют один изгиб, могут быть в форме запятой, короткого завитка.

2. Спириллы- имеют 2- 3 завитка.

3. Спирохеты- имеют различное число завитков, аксостиль- совокупность фибрилл, специфический для различных представителей характер движения и особенности строе-

ния (особенно концевых участков). Из большого числа спирохет наибольшее медицинское значение имеют представители трех родов- *Borrelia*, *Treponema*, *Leptospira*.

Характеристика морфологии риккетсий, хламидий, микоплазм, более подробная характеристика вибрионов и спирохет будет дана в соответствующих разделах частной микробиологии.

Данный раздел завершаем краткой характеристикой (ключем) для характеристики основных родов микроорганизмов, имеющих медицинское значение, на основе критериев, применяемых в определителе бактерий по Берджи (Berge).

Таблица. Ключ к основным группам бактерий

<u>Основные группы бактерий</u>	<u>Роды бактерий</u>
1.Изгибающиеся бактерии с тонкими стенками, подвижность обеспечивается за счет скольжения- <b>скользящие бактерии</b>	
2.Изгибающиеся бактерии с тонкими стенками, подвижность связана с наличием осевой нити- <b>спирохеты</b>	<i>Borrelia</i> , <i>Leptospira</i>
3.Ригидные бактерии с толстыми стенками, неподвижные или подвижные благодаря жгутикам- <b>зубактерии</b>	
А. Мицелиальные формы	<i>Mycobacterium</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i>
Б.Простые одноклеточные	
1/облигатные внутриклеточные паразиты	<i>Rickettsia</i> , <i>Coxiella</i> , <i>Chlamydia</i>
2/свободноживущие	
а. грамположительные:	
кокки	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>
неспорообразующие палочки	<i>Corynebacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Erysipelothrix</i>
спорообразующие палочки	
в т.ч. обязательные аэробы	<i>Bacillus</i>
в т.ч. обязательные анаэробы	<i>Clostridium</i>
б. грамотрицательные:	
кокки	<i>Neisseria</i>

некишечные палочки	
в т.ч. спиральной формы	Spirillum
в т.ч. прямые, очень мелкие палочки	Pasteurella, Brucella, Yersinia, Francisella, Haemophilus, Borde- tella
кишечные палочки	
в т.ч. факультативные анаэробы	Escherichia, Salmone- lla, Shigella, Klebsiel- la, Proteus, Vibrio
в т.ч. облигатные аэробы	Pseudomonas
в т.ч. облигатные анаэробы	Bacteroides, Fuso- bacterium
4. Без клеточных стенок	Mycoplasma, Urea- plasma

### 3. Строение бактериальной клетки.

Обязательными органоидами являются: ядерный аппарат, цитоплазма, цитоплазматическая мембрана.

Необязательными (второстепенными) структурными элементами являются: клеточная стенка, капсула, споры, пили, жгутики.

1. В центре бактериальной клетки находится **нуклеоид**- ядерное образование, представленное чаще всего одной хромосомой кольцевидной формы. Состоит из двухцепочечной нити ДНК. Нуклеоид не отделен от цитоплазмы ядерной мембраной.

2. **Цитоплазма**- сложная коллоидная система, содержащая различные включения метаболического происхождения (зерна волютина, гликогена, гранулезы и др.), рибосомы и другие элементы белоксинтезирующей системы, плазмиды (вненуклеоидное ДНК), *мезосомы* (образуются в результате инвагинации цитоплазматической мембраны в цитоплазму, участвуют в энергетическом обмене, спорообразовании, формировании межклеточной перегородки при делении).

3. **Цитоплазматическая мембрана** ограничивает с наружной стороны цитоплазму, имеет трехслойное строение и выполняет ряд важнейших функций- барьерную (создает и поддерживает осмотическое давление), энергетическую (содержит многие ферментные

системы- дыхательные, окислительно- восстановительные, осуществляет перенос электронов), транспортную (перенос различных веществ в клетку и из клетки).

**4.Клеточная стенка-** присуща большинству бактерий (кроме микоплазм, ахлеплазм и некоторых других не имеющих истинной клеточной стенки микроорганизмов). Она обладает рядом функций, прежде всего обеспечивает механическую защиту и постоянную форму клеток, с ее наличием в значительной степени связаны антигенные свойства бактерий. В составе - два основных слоя, из которых наружный- более пластичный, внутренний- ригидный.

Основное химическое соединение клеточной стенки, которое специфично только для бактерий- *пептидогликан* (муреиновые кислоты). От структуры и химического состава клеточной стенки бактерий зависит важный для систематики признак бактерий- отношение к окраске по Граму. В соответствии с ним выделяют две большие группы- грамположительные (“грам+”) и грамотрицательные (“грам -“) бактерии. Стенка грамположительных бактерий после окраски по Граму сохраняет комплекс йода с *генциановым фиолетовым* (окрашены в сине- фиолетовый цвет), грамотрицательные бактерии теряют этот комплекс и соответствующий цвет после обработки и окрашены в розовый цвет за счет докрашивания фуксином.

#### Особенности клеточной стенки грамположительных бактерий.

Мощная, толстая, несложно организованная клеточная стенка, в составе которой преобладают пептидогликан и тейхоевые кислоты, нет липополисахаридов (ЛПС), часто нет диаминопимелиновой кислоты.

#### Особенности клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Клеточная стенка значительно тоньше, чем у грамположительных бактерий, содержит ЛПС, липопротейны, фосфолипиды, диаминопимелиновую кислоту. Устроена более сложно- имеется внешняя мембрана, поэтому клеточная стенка трехслойная.

При обработке грамположительных бактерий ферментами, разрушающими пептидогликан, возникают полностью лишенные клеточной стенки структуры- **протопласты**. Обработка грамотрицательных бактерий лизоцимом разрушает только слой пептидогликана, не разрушая полностью внешней мембраны; такие структуры называют **сферопластами**. Протопласты и сферопласты имеют сферическую форму (это свойство связано с осмотическим давлением и характерно для всех безклеточных форм бактерий).

#### L- формы бактерий.

Под действием ряда факторов, неблагоприятно действующих на бактериальную клетку (антибиотики, ферменты, антитела и др.), происходит *L- трансформация* бактерий,

приводящая к постоянной или временной утрате клеточной стенки. L- трансформация является не только формой изменчивости, но и приспособления бактерий к неблагоприятным условиям существования. В результате изменения антигенных свойств (утрата O- и K- антигенов), снижения вирулентности и других факторов L- формы приобретают способность длительно находиться (*персистировать*) в организме хозяина, поддерживая вяло текущий инфекционный процесс. Утрата клеточной стенки делает L- формы нечувствительными к антибиотикам, антителам и различным химиопрепаратам, точкой приложения которых является бактериальная клеточная стенка. *Нестабильные* L- формы способны *реверсировать* в классические (исходные) формы бактерий, имеющие клеточную стенку. Имеются также стабильные L- формы бактерий, отсутствие клеточной стенки и неспособность реверсировать которых в классические формы бактерий закреплены генетически. Они по ряду признаков очень напоминают микоплазмы и другие *молликуты*- бактерии, у которых клеточная стенка отсутствует как таксономический признак. Микроорганизмы, относящиеся к микоплазмам- самые мелкие прокариоты, не имеют клеточной стенки и как все бактериальные бесстеночные структуры имеют сферическую форму.

К поверхностным структурам бактерий (необязательным, как и клеточная стенка), относятся *капсула, жгутики, микроворсинки*.

Капсула или слизистый слой окружает оболочку ряда бактерий. Выделяют *микрoкапсулу*, выявляемую при электронной микроскопии в виде слоя микрофибрилл, и *макрокапсулу*, обнаруживаемую при световой микроскопии. Капсула является защитной структурой (прежде всего от высыхания), у ряда микробов- фактором патогенности, препятствует фагоцитозу, ингибирует первые этапы защитных реакций- распознавание и поглощение. У *сапрофитов* капсулы образуются во внешней среде, у патогенов- чаще в организме хозяина. Существуют ряд методов окраски капсул в зависимости от их химического состава. Капсула чаще состоит из полисахаридов (наиболее распространенная окраска- по *Гинсу*), реже- из полипептидов.

Жгутики. Подвижные бактерии могут быть скользящие (передвигаются по твердой поверхности в результате волнообразных сокращений) или плавающие, передвигающиеся за счет нитевидных спирально изогнутых белковых (*флагеллиновых* по химическому составу) образований- жгутиков.

По расположению и количеству жгутиков выделяют ряд форм бактерий.

1. Монотрихи- имеют один полярный жгутик.
2. Лофотрихи- имеют полярно расположенный пучок жгутиков.
3. Амфитрихи- имеют жгутики по диаметрально противоположным полюсам.

4. Перитрихи- имеют жгутики по всему периметру бактериальной клетки.

Способность к целенаправленному движению (хемотаксис, аэротаксис, фототаксис) у бактерий генетически детерминирована.

Фимбрии или реснички - короткие нити, в большом количестве окружающую бактериальную клетку, с помощью которых бактерии прикрепляются к субстратам (например, к поверхности слизистых оболочек). Таким образом, фимбрии являются *факторами адгезии и колонизации*.

F- пили (фактор фертильности) - аппарат *конъюгации бактерий*, встречаются в большом количестве в виде тонких белковых ворсинок.

Эндоспоры и спорообразование.

*Спорообразование*- способ сохранения определенных видов бактерий в неблагоприятных условиях среды. *Эндоспоры* образуются в цитоплазме, представляют собой клетки с низкой метаболической активностью и высокой устойчивостью (*резистентностью*) к высушиванию, действию химических факторов, высокой температуры и других неблагоприятных факторов окружающей среды. При световой микроскопии часто используют метод выявления спор *по Ожеешко*. Высокая резистентность связана с большим содержанием *кальциевой соли дитиколиновой кислоты* в оболочке спор. Расположение и размеры спор у различных микроорганизмов отличается, что имеет дифференциально- диагностическое (таксономическое) значение. Основные фазы “жизненного цикла” спор- *споруляция* (включает подготовительную стадию, стадию предспоры, образования оболочки, созревания и покоя) и *прорастание*, заканчивающееся образованием вегетативной формы. Процесс спорообразования генетически обусловлен.

Некультивируемые формы бактерий.

У многих видов грамотрицательных бактерий, не образующих спор, существует особое приспособительное состояние- некультивируемые формы. Они обладают низкой метаболической активностью и активно не размножаются, т.е. не образуют колоний на плотных питательных средах, при посевах не выявляются. Обладают высокой устойчивостью и могут сохранять жизнеспособность в течение нескольких лет. Не выявляются классическими бактериологическими методами, обнаруживаются только при помощи генетических методов (*полимеразной цепной реакции- ПЦР*).

#### **4.Морфологическая характеристика грибов.**

Грибы и простейшие имеют четко ограниченное ядро и относятся к эукариотам. Грибы крупнее бактерий, в эволюционном плане близки к растениям (наличие клеточной стенки, содержащей хитин или целлюлозу, вакуолей с клеточным соком, неспособность к

перемещению, видимое движение цитоплазмы). Ядерный материал грибов отделен от цитоплазмы ядерной мембраной. *Дрожжевые* грибы образуют отдельные овальные клетки. *Плесневые* грибы формируют клеточные нитеподобные структуры- **гифы**. **Мицелий**- переплетение гифов- основная морфологическая структура. У низших грибов мицелий одноклеточный, не имеет внутренних перегородок (*септ*). Грибы размножаются половым и бесполом (вегетативным) способом. При вегетативном размножении образуются специализированные репродуктивные структуры- споры- *конидии*. Они могут располагаться в специализированныхместилищах- *спорангиях* (эндоспоры) или отшнуровываться от плодоносящих гиф (экзоспоры). Реже наблюдают образование спор внутри клеток (*оидии*), являющихся сегментами гиф. Дрожжевые клетки размножаются почкованием, мицелий не образуют. Половое размножение включает взаимодействие специализированных клеток, имеющих существенные различия в морфологии у различных грибов и часто используемых как дифференциально- диагностический признак.

Для большинства видов грибов, имеющих медицинское значение, характерно наличие конидий (или экзоспор), являющихся формами неполового размножения. Их классификация во многом основывается на морфологических формах конидий. Их наиболее частые формы- *бластоспоры*, *хламидоспоры*, *артроспоры*, *конидиоспоры*.

Бластоспоры- простые структуры, которые образуются в результате почкования, с последующим отделением почки от родительской клетки, например у дрожжевых грибов.

Хламидоспоры образуются в результате увеличения гифальных клеток с образованием толстой оболочки, защищающей споры от неблагоприятных условий окружающей среды.

Артроспоры- споры, образующиеся путем фрагментации гиф на отдельные клетки. Они встречаются у дрожжеподобных грибов, возбудителя кокцидиоидоза, тканевых форм дерматофитов в волосе, кожных чешуйках и в ногтях.

Конидиоспоры- зрелые наружные споры, возникающие на дифференцированных конидиофорах (конидионосцах), отличающихся от других нитей мицелия по форме и размерам (у аспергилл, пеницилл) или располагающиеся по бокам и на концах любой ветви мицелия, прикрепляясь к ней непосредственно или тонкой ножкой.

К эндоспорам совершенных грибов относятся спорангиоспоры муконовых грибов, развивающихся в специальных органах (спорангиях), располагающихся на вершине спорангионосца. Споры освобождаются при разрыве стенки спорангия.

Эндоспоры обнаруживают также у тканевых форм возбудителей кокцидиоидоза. Они развиваются в круглых образованиях - сферулах, при разрыве стенки зрелой сферулы

попадают во внешнюю среду.

Основное функциональное отличие спор у бактерий и грибов: у бактерий споры обеспечивают переживание в неблагоприятных условиях окружающей среды, у грибов образование спор- способ размножения.

**5. Морфологическая характеристика актиномицетов** (лучистых грибов по старым классификациям). Актиномицеты - формы бактерий, имеющие истинный, не имеющих перегородок мицелий. Мицелиальный (в виде ветвящихся нитей) рост этих грамположительных бактерий придает им внешнее сходство с грибами. Это сходство усиливается вследствие наличия у высших форм актиномицетов наружных неполовых спор, которые называются конидиями.

В отличие от грибов, актиномицеты имеют прокариотическое строение клетки, не содержат в клеточной стенке хитина или целлюлозы, размножаются только бесполым путем. У низших актиномицетов мицелий фрагментируется на типичные одноклеточные бактерии. Мицелий актиномицетов подразделяют на субстратный (в субстрате) и воздушный. К мицелиальным бактериям относят микобактерии, рода накардий и актиномицетов, несколько родов высших актиномицет.

Представители рода *Mycobacterium*, в который входят возбудители туберкулеза, являются кислотоустойчивыми микроорганизмами, плохо воспринимающими краски. Их высокая резистентность во внешней среде, кислотоустойчивость и ряд других свойств связан с особым составом клеточной стенки, большим содержанием липидов и воска.

У представителей родов *Actinomyces* и *Nocardia* мицелий выражен в значительно большей степени, чем у микобактерий, однако в старых культурах они также проявляют тенденцию фрагментироваться на отдельные клетки неправильной формы. Микроорганизмы рода *Actinomyces* являются анаэробами, *Nocardia* - аэробами, многие из которых проявляют кислотоустойчивость.

Микроорганизмы, относящиеся к высшим актиномицетам (рода *Streptomyces*, *Micromonospora*) образуют мицелий и размножаются наружными неполовыми спорами или конидиями. Обычным местом обитания для большинства из них является почва. Однако ряд видов актиномицет и нокардий могут инфицировать раны и вызывать образование абсцессов. Для актиномицетов характерно образование друз - плотных "зерен" в гное, представляющих собой беспорядочно переплетенные в центре нити мицелия с радиально отходящими на периферию колбовидно расширенными на концах "дубинками". С некоторыми актиномицетами (например, стрептомицетами) связана способность выработки антибиотиков.

## **6. Морфологическая характеристика простейших.**

Имеют эукариотическое строение клетки и значительно более сложную функциональную и морфологическую организацию по сравнению с бактериями и грибами. Снаружи тело простейших покрывает эластичная и ригидная *пелликула*, образованная внешним слоем цитоплазмы. У некоторых видов клеточная мембрана может включать опорные фибриллы и даже минеральный скелет. Простейшие могут иметь несколько ядер. Многие простейшие способны активно двигаться за счет псевдоподий, жгутиков или ресничек. Жизненный цикл паразитических простейших нередко включает образование промежуточных форм в различных хозяевах. Основные классы простейших: саркодовые или амёбы- наиболее просто устроенные простейшие, споровики (малярийные плазмодии, токсоплазмы, пневмоцисты, бабезии), жгутиконосцы (трихомонады, лейшмании), инфузории. Простейшие очень широко распространены, достаточно сказать, что малярийными плазмодиями и токсоплазмами в сумме поражено до трети населения земного шара. Всего известно около 7 тысяч видов простейших, патогенных для различных растений, животных, человека, непатогенных- во много раз больше. Простейших изучает наука *протозология*.

## терий.

Клетка- универсальная единица живой материи. По химическому составу существенных отличий прокариотических и эукариотических клеток нет.

Химические элементы, входящие в состав живой материи, можно разделить на три основные группы.

1. *Биогенные* химические элементы (С, О, N, H). На их долю приходится 95% сухого остатка, в т.ч. 50%- С, 20%- О, 15%- N, 10%- H).

2. *Макроэлементы*- P, S, Cl, K, Mg, Ca, Na. На них приходится около 5 %.

3. *Микроэлементы*- Fe, Cu, I, Co, Mo и др. На них приходятся доли процента, однако они имеют важное значение в обменных процессах.

Химические элементы входят в состав различных веществ- воды, белков, липидов, нейтральных жиров, углеводов, нуклеиновых кислот. Синтез соединений контролируется генами. Многие вещества бактериальная клетка может получать извне- из окружающей среды или организма хозяина.

*Вода* составляет от 70 до 90 % биомассы. Содержание воды больше у капсульных бактерий, меньше всего- в спорах.

*Белки* встречаются во всех структурных элементах клетки. Белки могут быть более простые (протеины) и сложные (протеиды), в чистом виде или в комплексе с липидами, сахарами. Выделяют структурные (структурообразующие) и функциональные (регуляторные) белки, к последним относятся ферменты.

**В состав белков** входят как обычные для эукариотов аминокислоты, так и оригинальные- *диаминотимелиновая, D-аланин, D-глутанин*, входящие в состав пептидогликанов и капсул некоторых бактерий. Только в спорах находится *дипиколиновая кислота*, с которой связана высокая резистентность спор. Жгутики построены из белка *флагеллина*, обладающего сократительной способностью и выраженными антигенными свойствами. Пили (ворсинки) содержат особый белок- *пилин*.

Пептидную природу имеют капсулы представителей рода *Bacillus*, возбудителя чумы, поверхностные антигены ряда бактерий, в том числе стафилококков и стрептококков. *Белок А* - специфический белок *S.aureus* - фактор, обуславливающий ряд свойств этого возбудителя. *Белок М* - специфический белок гемолитических стрептококков серогруппы А, позволяющий дифференцировать серовары (около 100), что имеет эпидемиологическое значение.

Ряд белков содержит наружная мембрана грамотрицательных бактерий, из которых 3 - 4 *мажорных* (основных) и более 10- второстепенных, выполняющих различные функ-

ции. Среди мажорных белков- *порины*, образующие диффузные поры, через которые в клетку могут проникать мелкие гидрофильные молекулы.

Белки входят в состав **пептидогликана**- биополимера, составляющего основу бактериальной клеточной стенки. Он состоит из остова (чередующиеся молекулы двух аминокислот) и двух наборов пептидных цепочек- боковых и поперечных. Наличие двух типов связей- гликозидных (между аминокислотами) и пептидных, которые соединяют субъединицы пептидогликанов, придают этому гетерополимеру структуру *молекулярной сети*. *Пептидогликан- наиболее устойчивое соединение, которое образует ригидную мешковидную макромолекулу, определяющую постоянную форму бактерий и ряд их свойств.*

1. Пептидогликан содержит родо- и видоспецифические антигенные детерминанты.
2. Он запускает классический и альтернативный пути активации системы комплемента.
3. Пептидогликан тормозит фагоцитарную активность и миграцию макрофагов.
4. Он способен инициировать развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).
5. Пептидогликан обладает противоопухолевым действием.
6. Он оказывает пирогенное действие, т.е. вызывает лихорадку.

Из соединений белков с небелковыми компонентами наибольшее значение имеют *липопротеиды, гликопротеиды и нуклеопротеиды*.

Удивительное таинство жизни- синтез белка осуществляется в *рибосомах*. Существует два основных типа рибосом - 70S (S- константа седиментации, единица Сведберга) и 80S. Рибосомы первого типа встречаются только у прокариотов. Антибиотики не действуют на синтез белка в рибосомах типа 80S, распространенных у эукариотов.

**Липиды** (главным образом фосфолипиды) содержатся в цитоплазматической мембране (липидный бислой), в также в наружной мембране грамотрицательных бактерий. Есть микроорганизмы, содержащие большое количество липидов (до 40% сухого остатка)- микобактерии. В состав липидов входят различные *жирные кислоты*, весьма специфичные для разных групп микроорганизмов. Их определение имеет в ряде случаев диагностическое значение, например у анаэробов, микобактерий.

У микобактерий туберкулеза в составе липидов имеется ряд кислотоустойчивых жирных кислот- *фтионовая, миколовая* и др. Высокое содержание липидов и их состав определяют многие свойства микобактерий туберкулеза:

- устойчивость к кислотам, щелочам и спиртам;
- трудная окрашиваемость красителями (используют специальные методы окраски,

чаще- по Циллю- Нильсену);

- устойчивость возбудителя к солнечной радиации и дезосредствам;
- патогенность.

*Тейхоевые кислоты* встречаются в клеточных стенках грамположительных бактерий. Представляют собой водорастворимые линейные полимеры, содержащие остатки глицерина или рибозы, связанные фосфодиэфирными связями. С тейхоевыми кислотами связаны главные поверхностные антигены ряда грамположительных бактерий.

**Углеводы** встречаются чаще в виде *полисахаридов*, которые могут быть экзо- и эндоклеточными. Среди экзоклеточных полисахаридов выделяют каркасные (входят в состав капсул) и истинно экзополисахариды (выходят во внешнюю среду). Среди бактериальных полисахаридов многие находят медицинское применение. *Декстраны*- полисахариды с большой молекулярной массой, по виду напоминают слизь. 6% раствор- кровезаменитель полиглюкин. Декстрановый гель *сефадекс* используется в колоночной хроматографии как молекулярное сито. Эндоклеточные полисахариды- запасные питательные вещества клетки (крахмал, гликоген и др.).

Липополисахарид (ЛПС) - один из основных компонентов клеточной стенки грамотрицательных бактерий, это соединение липида с полисахаридом. ЛПС состоит из комплекса: 1.Липид А.

- 2.Одинаковое для всех грамотрицательных бактерий *полисахаридное ядро*.
- 3.Терминальная сахаридная цепочка (*О- специфическая боковая цепь*).

Синонимы ЛПС- эндотоксин, О- антиген.

ЛПС выполняет две основные функции- определяет антигенную специфичность и является одним из основных факторов патогенности. Это- эндотоксин, токсические свойства которого проявляются преимущественно при разрушении бактериальных клеток. Его токсичность определяется липидом А. ЛПС запускает синтез более 20 биологически активных веществ, определяющих патогенез эндотоксикога, обладает пирогенным действием.

**Нуклеиновые кислоты**- ДНК и РНК. *Рибонуклеиновые кислоты* (РНК) находятся главным образом в рибосомах (р-РНК- 80- 85%), т(транспортные)- РНК- 10%, м(матричные)- РНК- 1- 2%, главным образом в одноцепочечной форме. ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота) может находиться в ядерном аппарате (хромосомная ДНК) или в цитоплазме в специализированных образованиях- плазмидах- плазмидная (внехромосомная) ДНК. Микроорганизмы отличаются по структуре нуклеиновых кислот, содержанию *азотистых оснований*. Генетический код состоит всего из четырех букв (оснований) - А

(аденин), Т (тимин), Г (гуанин) и Ц (цитозин). Наиболее часто для характеристики микроорганизмов используют как таксономический признак процентное соотношение Г/Ц, которое существенно отличается у различных групп микроорганизмов.

Микроорганизмы синтезируют различные **ферменты**- специфические белковые катализаторы. У бактерий обнаружены ферменты 6 основных классов.

1.Оксидоредуктазы- катализируют окислительно- восстановительные реакции.

2.Трансферазы- осуществляют реакции переноса групп атомов.

3.Гидролазы- осуществляют гидролитическое расщепление различных соединений.

4.Лиазы- катализируют реакции отщепления от субстрата химической группы не- гидролитическим путем с образованием двойной связи или присоединения химической группы к двойным связям.

5.Лигазы или синтетазы- обеспечивают соединение двух молекул, сопряженное с расщеплением пирофосфатной связи в молекуле АТФ или аналогичного трифосфата.

6.Изомеразы - определяют пространственное расположение групп элементов.

В соответствии с механизмами генетического контроля у бактерий выделяют три группы ферментов:

- *конститутивные*, синтез которых происходит постоянно;

- *индуцибельные*, синтез которых индуцируется наличием субстрата;

- *репрессибельные*, синтез которых подавляется избытком продукта реакции.

Ферменты бактерий делят на *экзо- и эндоферменты*. Экзоферменты выделяются во внешнюю среду, осуществляют процессы расщепления высокомолекулярных органических соединений. Способность к образованию экзоферментов во многом определяет *инвазивность* бактерий- способность проникать через слизистые, соединительнотканые и другие тканевые барьеры.

Примеры: *гиалуронидаза* расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества, что повышает проницаемость тканей (клостридии, стрептококки, стафилококки и многие другие микроорганизмы); *нейраминидаза* облегчает преодоление слоя слизи, проникновение внутрь клеток и распространение в межклеточном пространстве (холерный вибрион, дифтерийная палочка, вирус гриппа и многие другие). К этой же группе относятся энзимы, разлагающие антибиотики.

В бактериологии для дифференциации микроорганизмов по биохимическим свойствам основное значение часто имеют конечные продукты и результаты действия ферментов. В соответствии с этим существует микробиологическая (рабочая) классификация ферментов.

- 1.Сахаролитические.
- 2.Протеолитические.
- 3.Аутолитические.
- 4.Окислительно- восстановительные.
- 5.Ферменты патогенности (вирулентности).

Ферментный состав клетки определяется геномом и является достаточно постоянным признаком. Знание биохимических свойств микроорганизмов позволяет идентифицировать их по набору ферментов. Основные продукты ферментирования углеводов и белков- кислота, газ, индол, сероводород, хотя реальный спектр для различных микроорганизмов намного более обширный.

Основные ферменты вирулентности- гиалуронидаза, плазмокоагулаза, лецитиназа, нейраминидаза, ДНК-аза. Определение ферментов патогенности имеет значение при идентификации ряда микроорганизмов и выявления их роли в патологии.

Ряд ферментов микроорганизмов широко используется в медицине и биологии для получения различных веществ (аутолитические, протеолитические), в генной инженерии (рестриктазы, лигазы).

## Лекция № 4. Физиология и принципы культивирования микроорганизмов.

### Метаболизм микроорганизмов.

Для роста и размножения микроорганизмы нуждаются в веществах, используемых для построения структурных компонентов клетки и получения энергии. **Метаболизм** (т.е. обмен веществ и энергии) имеет две составляющих- **анаболизм** и **катаболизм**. Анаболизм- синтез компонентов клетки (*конструктивный обмен*). Катаболизм- энергетический обмен, связан с окислительно- восстановительными реакциями, расщеплением глюкозы и других органических соединений, синтезом АТФ. Питательные вещества могут поступать в клетку в растворимом виде (это характерно для прокариот)- *осмотрофы*, или в виде отдельных частиц- *фаготрофы*.

Основным регулятором поступления веществ в бактериальную клетку является цитоплазматическая мембрана. Существует четыре основных механизма поступления веществ: -*пассивная диффузия*- по градиенту концентрации, энергонезатратная, не имеющая субстратной специфичности;

- *облегченная диффузия*- по градиенту концентрации, субстратспецифичная, энергонезатратная, осуществляется при участии специализированных белков *пермеаз*;

- *активный транспорт*- против градиента концентрации, субстратспецифичен (специальные связывающие белки в комплексе с пермеазами), энергозатратный (за счет АТФ), вещества поступают в клетку в химически неизменном виде;

- *транслокация (перенос групп)*- против градиента концентрации, с помощью фосфотрансферазной системы, энергозатратна, вещества (преимущественно сахара) поступают в клетку в фосфорилированном виде.

*Основные химические элементы- органогены*, необходимые для синтеза органических соединений- углерод, азот, водород, кислород.

В зависимости от источника потребляемого *углерода* микробы подразделяют на *аутотрофы* (используют CO<sub>2</sub>) и *гетеротрофы* (используют готовые органические соединения). В зависимости от *источника энергии* микроорганизмы делят на *фототрофы* (энергию получают за счет фотосинтеза- например, цианобактерии) и *хемотрофы* (энергия добывается за счет химических, окислительно- восстановительных реакций). Если при этом донорами электронов являются неорганические соединения, то это *литотрофы*, если органические- *органотрофы*. Если бактериальная клетка в состоянии синтезировать все необходимые для жизнедеятельности вещества, то это *прототрофы*. Если бактерии нуждаются в дополнительных веществах (факторах роста), то это *ауксотрофы*. Основными факторами роста для труднокультивируемых бактерий являются пуриновые и пиримиди-

новые основания, витамины, некоторые (обычно незаменимые) аминокислоты, кровяные факторы (гемин) и др.

### Дыхание микроорганизмов.

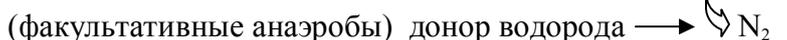
Путем дыхания микроорганизмы добывают энергию. Дыхание- биологический процесс переноса электронов через дыхательную цепь от доноров к акцепторам с образованием АТФ. В зависимости от того, что является конечным акцептором электронов, выделяют *аэробное и анаэробное дыхание*. При аэробном дыхании конечным акцептором электронов является молекулярный кислород ( $O_2$ ), при анаэробном- связанный кислород ( $-NO_3$ ,  $=SO_4$ ,  $=SO_3$ ).

Примеры.



Анаэробное дыхание

нитратное окисление



сульфатное окисление



По типу дыхания выделяют четыре группы микроорганизмов.

1. *Облигатные* (строгие) *аэробы*. Им необходим молекулярный (атмосферный) кислород для дыхания.

2. *Микроаэрофилы* нуждаются в уменьшенной концентрации (низком парциальном давлении) свободного кислорода. Для создания этих условий в газовую смесь для культивирования обычно добавляют  $CO_2$ , например до 10- процентной концентрации.

3. *Факультативные анаэробы* могут потреблять глюкозу и размножаться в аэробных и анаэробных условиях. Среди них имеются микроорганизмы, толерантные к относительно высоким (близких к атмосферным) концентрациям молекулярного кислорода - т.е. аэротолерантные, а также микроорганизмы которые способны в определенных условиях переключаться с анаэробного на аэробное дыхание.

4. *Строгие анаэробы* размножаются только в анаэробных условиях т.е. при очень низких концентрациях молекулярного кислорода, который в больших концентрациях для них губителен. Биохимически анаэробное дыхание протекает по типу бродильных процессов, молекулярный кислород при этом не используется.

Аэробное дыхание энергетически более эффективно (синтезируется большее количество АТФ).

В процессе аэробного дыхания образуются токсические продукты окисления ( $H_2O_2$ -перекись водорода,  $\cdot O_2$  - свободные кислородные радикалы), от которых защищают специфические ферменты, прежде всего каталаза, пероксидаза, *пероксиддисмутаза*. У анаэробов эти ферменты отсутствуют, также как и *система регуляции окислительно-восстановительного потенциала ( $rH_2$ )*.

#### Основные методы создания анаэробных условий для культивирования микроорганизмов.

1. Физический- откачивание воздуха, введение специальной газовой безкислородной смеси (чаще-  $N_2$ - 85%,  $CO_2$ - 10%,  $H_2$ - 5%).
2. Химический- применяют химические поглотители кислорода.
3. Биологический- совместное культивирование строгих аэробов и анаэробов (аэробы поглощают кислород и создают условия для размножения анаэробов).
4. Смешанный- используют несколько разных подходов.

Необходимо отметить, что создание оптимальных условий для строгих анаэробов- очень сложная задача. Очень непросто обеспечить постоянное поддержание безкислородных условий культивирования, необходимы специальные среды без содержания растворенного кислорода, поддержание необходимого окислительно-восстановительного потенциала питательных сред, взятие и доставка, посев материала в анаэробных условиях.

Существует ряд приемов, обеспечивающих более подходящие условия для анаэробов- предварительное кипячение питательных сред, посев в глубокий столбик агара, заливка сред вазелиновым маслом для сокращения доступа кислорода, использование герметически закрывающихся флаконов и пробирок, шприцев и лабораторной посуды с инертным газом, использование плотно закрывающихся эксикаторов с горящей свечой. Используются специальные приборы для создания анаэробных условий- анаэростаты. Однако в настоящее время наиболее простым и эффективным оборудованием для создания анаэробных и микроаэрофильных условий является система "Газпак" со специальными газорегенерирующими пакетами, действующими по принципу вытеснения атмосферного воздуха газовыми смесями в герметически закрытых емкостях.

#### Основные принципы культивирования микроорганизмов на питательных средах.

1. Использование всех необходимых для соответствующих микробов питательных компонентов.
2. Оптимальные температура, рН,  $rH_2$ , концентрация ионов, степень насыщения кислородом, газовый состав и давление.

Микроорганизмы культивируют на питательных средах при оптимальной темпера-

туре в термостатах, обеспечивающих условия инкубации.

По температурному оптимуму роста выделяют три основные группы микроорганизмов.

1. Психрофилы- растут при температурах ниже +20 градусов Цельсия.

2. Мезофилы- растут в диапазоне температур от 20 до 45 градусов (часто оптимум- при 37 градусах С).

3. Термофилы- растут при температурах выше плюс 45 градусов.

Краткая характеристика питательных сред.

*По консистенции* выделяют жидкие, плотные (1,5- 3% агара) и полужидкие (0,3- 0,7 % агара) среды.

*Агар*- полисахарид сложного состава из морских водорослей, основной отвердитель для плотных (твердых) сред. В качестве универсального источника углерода и азота применяют *пептоны*- продукты ферментации белков пепсином, различные *гидролизаты*- мясной, рыбный, казеиновый, дрожжевой и др.

*По назначению* среды разделяют на ряд групп:

- универсальные (простые), пригодные для различных нетребовательных микроорганизмов (мясо- пептонный бульон- МПБ, мясо- пептонный агар- МПА);

- специальные- среды для микроорганизмов, не растущих на универсальных средах (среда Мак- Коя на туляремию, среда Левенштейна- Иенсена для возбудителя туберкулеза);

- дифференциально- диагностические- для дифференциации микроорганизмов по ферментативной активности и культуральным свойствам ( среды Эндо, Плоскирева, Левина, Гисса);

- селективные (элективные)- для выделения определенных видов микроорганизмов и подавления роста сопутствующих- пептонная вода, селенитовая среда, среда Мюллера.

*По происхождению* среды делят на естественные, полусинтетические и синтетические.

Рост и размножение микроорганизмов.

Бактериальные клетки размножаются в результате деления. Основные стадии размножения микробов в жидкой среде в стационарных условиях:

- лаг- фаза (начальная стадия адаптации с медленным темпом прироста биомассы бактерий);

- экспоненциальная (геометрического роста) фаза с резким ростом численности популяции микроорганизмов ( $2^n$  в степени n);

- стационарная фаза (фаза равновесия размножения и гибели микробных клеток);
- стадия гибели - уменьшение численности популяции в связи с уменьшением и отсутствием условий для размножения микроорганизмов (дефицит питательных веществ, изменение рН, гН<sub>2</sub>, концентрации ионов и других условий культивирования).

Данная динамика характерна для *периодических культур* с постепенным истощением запаса питательных веществ и накоплением метаболитов.

Если в питательной среде создают условия для поддержания микробной популяции в экспоненциальной фазе- это *хемотратные (непрерывные) культуры*.

Характер роста бактерий на плотных и жидких питательных средах: сплошной рост, образование колоний, осадок, пленка, помутнение.

Чистая культура- популяция одного вида микроорганизмов.

Основные принципы получения чистых культур: механическое разобщение, рассев, серийные разведения, использование селективных сред, особых условий культивирования (с учетом устойчивости некоторых микробов к определенным температурам, кислотам, щелочам, парциальному давлению кислорода, рН и мн.др).

## **Лекция № 5. Общая вирусология. Классификация, структура и особенности биологии вирусов. Бактериофаги.**

Открытие вирусов Д.И.Ивановским в 1892г. положило начало развитию науки вирусологии. Более быстрому ее развитию способствовали: изобретение электронного микроскопа, разработка метода культивирования микроорганизмов в культурах клеток.

Слово “вирус” в переводе с латинского- яд (животного происхождения). Этот термин применяют для обозначения уникальных представителей живой природы, не имеющих клеточного (эукариотического или прокариотического) строения и обладающих облигатным внутриклеточным паразитизмом, т.е. которые не могут жить без клетки.

В настоящее время вирусология- бурно развивающаяся наука, что связано с рядом причин:

- ведущей ролью вирусов в инфекционной патологии человека (примеры- вирус гриппа, ВИЧ- вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус и другие герпесвирусы) на фоне практически полного отсутствия средств специфической химиотерапии;
- использованием вирусов для решения многих фундаментальных вопросов биологии и генетики.

Основные свойства вирусов (и плазмид), по которым они отличаются от остального живого мира.

1.Ультрамикроскопические размеры (измеряются в нанометрах). Крупные вирусы (вирус оспы) могут достигать размеров 300 нм, мелкие- от 20 до 40 нм.  $1\text{мм}=1000\text{мкм}$ ,  $1\text{мкм}=1000\text{нм}$ .

2.Вирусы содержат нуклеиновую кислоту только одного типа- или ДНК (*ДНК- вирусы*) или РНК (*РНК- вирусы*). У всех остальных организмов геном представлен ДНК, в них содержится как ДНК, так и РНК.

3.Вирусы не способны к росту и бинарному делению.

4.Вирусы размножаются путем воспроизводства себя в инфицированной клетке хозяина за счет собственной геномной нуклеиновой кислоты.

5.У вирусов нет собственных систем мобилизации энергии и белок- синтезирующих систем, в связи с чем вирусы являются *абсолютными внутриклеточными паразитами*.

6.Средой обитания вирусов являются живые клетки- бактерии (это вирусы бактерий или бактериофаги), клетки растений, животных и человека.

Все вирусы существуют в двух качественно разных формах: внеклеточной- **вирион** и внутриклеточной- **вирус**. Таксономия этих представителей микромира основана на ха-

рактеристике вирионов- конечной фазы развития вирусов.

#### Строение (морфология) вирусов.

1. *Геном вирусов* образуют нуклеиновые кислоты, представленные одноцепочечными молекулами РНК (у большинства РНК- вирусов) или двухцепочечными молекулами ДНК (у большинства ДНК- вирусов).

2. *Капсид* - белковая оболочка, в которую упакована геномная нуклеиновая кислота. Капсид состоит из идентичных белковых субъединиц- *капсомеров*. Существуют два способа упаковки капсомеров в капсид- спиральный (спиральные вирусы) и кубический (сферические вирусы).

*При спиральной симметрии* белковые субъединицы располагаются по спирали, а между ними, также по спирали, уложена геномная нуклеиновая кислота (нитевидные вирусы). *При кубическом типе симметрии* вирионы могут быть в виде многогранников, чаще всего- двадцатигранники - *икосаэдры*.

3. Просто устроенные вирусы имеют только *нуклеокапсид*, т.е. комплекс генома с капсидом и называются “голыми”.

4. У других вирусов поверх капсида есть дополнительная мембраноподобная оболочка, приобретаемая вирусом в момент выхода из клетки хозяина- *суперкапсид*. Такие вирусы называют “одетыми”.

Кроме вирусов, имеются еще более просто устроенные формы способных передаваться агентов - плазмиды, вириды и прионы.

#### Основные этапы взаимодействия вируса с клеткой хозяина.

1. Адсорбция- пусковой механизм, связанный со взаимодействием *специфических* рецепторов вируса и хозяина (у вируса гриппа- гемагглютинин, у вируса иммунодефицита человека- гликопротеин gp 120).

2. Проникновение- путем слияния суперкапсида с мембраной клетки или путем эндоцитоза (пиноцитоза).

3. Освобождение нуклеиновых кислот- “раздевание” нуклеокапсида и активация нуклеиновой кислоты.

4. Синтез нуклеиновых кислот и вирусных белков, т.е. подчинение систем клетки хозяина и их работа на воспроизводство вируса.

5. Сборка вирионов- ассоциация реплицированных копий вирусной нуклеиновой кислоты с капсидным белком.

6. Выход вирусных частиц из клетки, приобретения суперкапсида оболочечными вирусами.

### Исходы взаимодействия вирусов с клеткой хозяина.

1. *Абортивный процесс*- когда клетки освобождаются от вируса:

- при инфицировании *дефектным* вирусом, для репликации которого нужен вирус-помощник, самостоятельная репликация этих вирусов невозможна (так называемые вируссоиды). Например, вирус дельта (D) гепатита может реплицироваться только при наличии вируса гепатита В, его Нbs - антигена, аденоассоциированный вирус- в присутствии аденовируса);

- при инфицировании вирусом генетически нечувствительных к нему клеток;

- при заражении чувствительных клеток вирусом в неразрешающих условиях.

2. *Продуктивный процесс*- репликация (продукция) вирусов:

- *гибель (лизис) клеток* (цитопатический эффект)- результат интенсивного размножения и формирования большого количества вирусных частиц - характерный результат продуктивного процесса, вызванного вирусами с высокой цитопатогенностью. Цитопатический эффект действия на клеточные культуры для многих вирусов носит достаточно узнаваемый специфический характер;

- *стабильное взаимодействие*, не приводящее к гибели клетки (персистирующие и латентные инфекции) - так называемая *вирусная трансформация клетки*.

3. *Интегративный процесс*- интеграция вирусного генома с геномом клетки хозяина. Это особый вариант продуктивного процесса по типу стабильного взаимодействия. Вирус реплицируется вместе с геномом клетки хозяина и может длительно находиться в латентном состоянии. Встраиваться в ДНК- геном хозяина могут только ДНК- вирусы (принцип “ДНК- в ДНК”). Единственные РНК- вирусы, способные интегрироваться в геном клетки хозяина- ретровирусы, имеют для этого специальный механизм. Особенность их репродукции- синтез ДНК провируса на основе геномной РНК с помощью фермента обратной транскриптазы с последующим встраиванием ДНК в геном хозяина.

### Основные методы культивирования вирусов.

1. В организме лабораторных животных.

2. В куриных эмбрионах.

3. В клеточных культурах - основной метод.

### Типы клеточных культур.

1. *Первичные (трипсинизированные) культуры*- фибробласты эмбриона курицы (ФЭК), человека (ФЭЧ), клетки почки различных животных и т.д. Первичные культуры получают из клеток различных тканей чаще путем их размельчения и трипсинизации, используют однократно, т.е. постоянно необходимо иметь соответствующие органы или

ткани.

2. *Линии диплоидных клеток* пригодны к повторному диспергированию и росту, как правило не более 20 пассажей (теряют исходные свойства).

3. *Перевиваемые линии* (гетероплоидные культуры), способны к многократному диспергированию и перевиванию, т.е. к многократным пассажам, наиболее удобны в вирусологической работе- например, линии опухолевых клеток Hela, Нер и др.

#### Специальные питательные среды для культур клеток.

Используются разнообразные синтетические вирусологические питательные среды сложного состава, включающие большой набор различных факторов роста- среда 199, Игла, раствор Хэнкса, гидролизат лактальбумина. В среды добавляют стабилизаторы рН (Нерес), различные в видовом отношении сыворотки крови (наиболее эффективной считают эмбриональную телячью сыворотку), L-цистеин и L-глутамин.

В зависимости от функционального использования среды могут быть *ростовые* (с большим содержанием сыворотки крови) - их используют для выращивания клеточных культур до внесения вирусных проб, и *поддерживающие* (с меньшим содержанием сыворотки или ее отсутствием)- для содержания инфицированных вирусом клеточных культур.

#### Выявляемые проявления вирусной инфекции клеточных культур.

1. Цитопатический эффект.

2. Выявление телец включений.

3. Выявление вирусов методом флюоресцирующих антител (МФА), электронной микроскопией, автордиографией.

4. Цветная проба. Обычный цвет используемых культуральных сред, содержащих в качестве индикатора рН феноловый красный, при оптимальных для клеток условиях культивирования (рН около 7,2)- красный. Размножение клеток меняет рН и соответственно цвет среды с красного на желтый за счет смещения рН в кислую сторону. При размножении в клеточных культурах вирусов происходит лизис клеток, изменения рН и цвета среды не происходит.

5. Выявление гемагглютинаина вирусов- гемадсорбция, гемагглютинация.

6. Метод бляшек (бляшкообразования). В результате цитолитического действия многих вирусов на клеточные культуры образуются зоны массовой гибели клеток. Выявляют бляшки- вирусные “клеточно- негативные” колонии.

#### Номенклатура вирусов.

Название семейства вирусов заканчивается на “viridae”, рода- “virus”, для вида обычно используют специальные названия, например - вирус краснухи, вирус иммуноде-

фицита человека- ВИЧ, вирус парагриппа человека типа 1 и т.д.

### Вирусы бактерий (бактериофаги).

Естественной средой обитания фагов является бактериальная клетка, поэтому фаги распространены повсеместно (например, в сточных водах). Фагам присущи биологические особенности, свойственные и другим вирусам.

Наиболее морфологически распространенный тип фагов характеризуется наличием головки- икосаэдра, отростка (хвоста) со спиральной симметрией (часто имеет полый стержень и сократительный чехол), шипов и отростков (нитей), т.е. внешне несколько напоминают сперматозоид.

Взаимодействие фагов с клеткой (бактерией) строго специфично, т.е. бактериофаги способны инфицировать только определенные виды и *фаготипы* бактерий.

### Основные этапы взаимодействия фагов и бактерий.

1.Адсорбция (взаимодействие специфических рецепторов).

2.Внедрение вирусной ДНК (инъекция фага) осуществляется за счет лизирования веществами типа лизоцима участка клеточной стенки, сокращения чехла, вталкивания стержня хвоста через цитоплазматическую мембрану в клетку, впрыскивание ДНК в цитоплазму.

3.Репродукция фага.

4.Выход дочерних популяций.

### Основные свойства фагов.

Различают *вирулентные фаги*, способные вызвать продуктивную форму процесса, и *умеренные фаги*, вызывающие редуцированную фаговую инфекцию (редукцию фага). В последнем случае геном фага в клетке не реплицируется, а внедряется (интегрируется) в хромосому клетки хозяина (ДНК в ДНК), фаг превращается в *профаг*. Этот процесс получил название *лизогении*. Если в результате внедрения фага в хромосому бактериальной клетки она приобретает новые наследуемые признаки, такую форму изменчивости бактерий называют *лизогенной (фаговой) конверсией*. Бактериальную клетку, несущую в своем геноме профаг, называют лизогенной, поскольку профаг при нарушении синтеза особого белка- репрессора может перейти в литический цикл развития, вызвать продуктивную инфекцию с лизисом бактерии.

Умеренные фаги имеют важное значение в обмене генетическим материалом между бактериями- *в трансдукции* (одна из форм генетического обмена). Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только возбудитель дифтерии, в хромосому ко-

того интегрирован умеренный профаг, несущий *оперон tox*, отвечающий за синтез дифтерийного экзотоксина. *Умеренный фаг tox вызывает лизогенную конверсию нетоксигенной дифтерийной палочки в токсигенную.*

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на :

- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);
- моновалентные (лизируют бактерии одного вида);
- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя).

На плотных средах фаги обнаруживают чаще с помощью спот (spot) - теста (образование негативного пятна при росте колоний) или методом агаровых слоев (титрования по Грациа).

Практическое использование бактериофагов.

1. Для идентификации (определение фаготипа).
2. Для фагопрофилактики (купирование вспышек).
3. Для фаготерапии (лечение дисбактериозов).
4. Для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.

## **Лекция № 6. Генетика бактерий и вирусов.**

Молекулярная биология, изучающая фундаментальные основы жизни, является в значительной степени детищем микробиологии. В качестве основных объектов изучения в ней используют вирусы и бактерии, а основное направление- молекулярная генетика основана на генетике бактерий и фагов.

Бактерии- удобный материал для генетики. Их отличает:

- относительная простота *генома* (сопокупности нуклеотидов хромосом);
- *гаплоидность* (один набор генов), исключая доминантность признаков;
- различные интегрированные в хромосомы и обособленные *фрагменты ДНК*;
- половая дифференциация в виде донорских и реципиентных клеток;
- легкость культивирования, быстрота накопления биомасс.

### Общие представления о генетике.

*Ген*- уникальная структурная единица наследственности, носитель и хранитель жизни. Он имеет *три фундаментальные функции*.

1. *Непрерывность наследственности*- обеспечивается механизмом *репликации ДНК*.

2. *Управление структурами и функциями организма* - обеспечивается с помощью единого *генетического кода* из четырех оснований (А- аденин, Т- тимин, Г- гуанин, Ц- цитозин). Код триплетный, поскольку *кодон*- функциональная единица, кодирующая аминокислоту, состоит из трех оснований (букв).

3. *Эволюция организмов*- благодаря *мутациям и генетическим рекомбинациям*.

В узкоспециальном плане ген чаще всего представляет структурную единицу ДНК, расположение кодонов в которой детерминирует первичную структуру соответствующей полипептидной цепи (белка). Хромосома состоит из особых функциональных единиц- *оперонов*.

Основные этапы развития (усложнения) генетической системы можно представить в виде следующей схемы:

кодон → ген → оперон → геном вирусов и плазмид → хромосома прокариот (нуклеоид) → хромосомы эукариот (ядро).

### Генетический материал бактерий.

1. *Ядерные структуры бактерий*- хроматиновые тельца или нуклеоиды (хромосомная ДНК). У бактерий одна замкнутая кольцевидная хромосома (до 4 тысяч отдельных генов). Бактериальная клетка гаплоидна, а удвоение хромосомы (репликация ДНК) сопровождается делением клетки. Вегетативная репликация хромосомной (и плазмидной) ДНК обуславливает передачу генетической информации по вертикали- от родительской клетки-

к дочерней. Передача генетической информации по горизонтали осуществляется различными механизмами- в результате *конъюгации, трансдукции, трансформации, сексдукции.*

*2.Внехромосомные молекулы ДНК* представлены *плазмидами, мигрирующими генетическими элементами- транспозонами и инсервационными (вставочными) или IS- последовательностями.*

Плазмиды- экстрахромосомный генетический материал (ДНК), более просто устроенные по сравнению с вирусами организмы, наделяющие бактерии *дополнительными полезными свойствами.* По молекулярной массе плазмиды значительно меньше хромосомной ДНК, содержат от 40 до 50 генов.

*Их* объединение в одно царство жизни с вирусами связано с наличием ряда общих свойств- отсутствием собственных систем мобилизации энергии и синтеза белка, саморепликацией генома, абсолютным внутриклеточным паразитизмом.

*Их выделение в отдельный класс* определяется существенными отличиями от вирусов.

1.Среда их обитания- только бактерии (среди вирусов , кроме вирусов бактерий- бактериофагов имеются вирусы растений и животных).

2.Плазмиды сосуществуют с бактериями, наделяя их дополнительными свойствами. У вирусов эти свойства могут быть только у умеренных фагов при лизогении бактерий, чаще же всего вирусы вызывают отрицательные последствия, лизис клеток.

3.Геном представлен двунитевой ДНК.

4.Плазмиды представляют собой “голые” геномы, не имеющие никакой оболочки, их репликация не требует синтеза структурных белков и процессов самосборки.

Плазмиды могут распространяться по вертикали (при клеточном делении) и по горизонтали, прежде всего путем конъюгационного переноса. В зависимости от наличия или отсутствия механизма самопереноса (его контролируют гены *tra-* оперона) выделяют *конъюгативные и неконъюгативные плазмиды.* Плазмиды могут встраиваться в хромосому бактерий- *интегративные плазмиды* или находиться в виде отдельной структуры- автономные плазмиды (*эписомы*).

#### Классификация и биологическая роль плазмид.

*Функциональная классификация плазмид* основана на свойствах, которыми они наделяют бактерии. Среди них- способность продуцировать экзотоксины и ферменты, устойчивость к лекарственным препаратам, синтез бактериоцинов.

#### Основные категории плазмид.

1.F- плазмиды - донорские функции, индуцируют деление (от *fertility* - плодови-

тость). Интегрированные F - плазмиды- Hfr- плазмиды (высокой частоты рекомбинаций).

2.R- плазмиды (resistance) - устойчивость к лекарственным препаратам.

3.Col- плазмиды- синтез колицинов (бактериоцинов)- факторов конкуренции близкородственных бактерий (антогонизм). На этом свойстве основано колицинотипирование штаммов.

4.Hly- плазмиды- синтез гемолизинов.

5.Ent- плазмиды- синтез энтеротоксинов.

6.Tox- плазмиды- токсинообразование.

Близкородственные плазмиды не способны стабильно сосуществовать, что позволило объединить их по степени родства в Inc- группы (incompatibility- несовместимость).

Биологическая роль плазмид многообразна, в том числе:

- контроль генетического обмена бактерий;
- контроль синтеза факторов патогенности;
- совершенствование защиты бактерий.

Бактерии для плазмид- среда обитания, плазмиды для них- переносимые между ними дополнительные геномы с наборами генов, благоприятствующих сохранению бактерий в природе.

Мигрирующие генетические элементы - отдельные участки ДНК, способные определять свой перенос между хромосомами или хромосомой и плазмидой с помощью фермента рекомбинации *транспозазы*. Простейшим их типом являются *инсерционные последовательности (IS- элементы)* или *вставочные элементы*, несущие только один ген транспозазы, с помощью которой IS- элементы могут встраиваться в различные участки хромосомы. Их функции- координация взаимодействия плазмид, умеренных фагов, транспозонов и генофора для обеспечения репродукции, регуляция активности генов, индукция мутаций. Величина IS- элементов не превышает 1500 пар оснований.

*Транспозоны (Tp- элементы)* включают до 25 тысяч пар нуклеотидов, содержат фрагмент ДНК, несущий специфические гены, и два Is- элемента. Каждый транспозон содержит гены, приносящие важные для бактерии характеристики, как и плазмиды (множественная устойчивость к антибиотикам, токсинообразование и т.д.). Транспозоны- самоинтегрирующиеся фрагменты ДНК, могут встраиваться и перемещаться среди хромосом, плазмид, умеренных фагов, т.е. обладают потенциальной способностью распространяться среди различных видов бактерий.

Понятие о генотипе и фенотипе.

*Генотип*- вся совокупность имеющихся у организма генов.

*Фенотип*- совокупность реализованных (т.е. внешних) генетически детерминированных признаков, т.е. индивидуальное (в определенных условиях внешней среды) проявление генотипа. При изменении условий существования фенотип бактерий изменяется при сохранении генотипа.

*Изменчивость у бактерий* может быть ненаследуемой (*модификационной*) и генотипической (*мутации, рекомбинации*).

Временные, наследственно не закрепленные изменения, возникающие как адаптивные реакции бактерий на изменения окружающей среды, называются *модификациями* (чаще - морфологические и биохимические модификации). После устранения причины бактерии реверсируют к исходному фенотипу.

Стандартное проявление модификации- распределение однородной популяции на две или более двух типов- *диссоциация*. Пример- характер роста на питательных средах: S- (гладкие) колонии, R- (шероховатые) колонии, M- (мукоидные, слизистые) колонии, D- (карликовые) колонии. Диссоциация протекает обычно в направлении  $S \rightarrow R$ . Диссоциация сопровождается изменениями биохимических, морфологических, антигенных и вирулентных свойств возбудителей.

*Мутации*- скачкообразные изменения наследственного признака. Могут быть спонтанные и индуцированные, генные (изменения одного гена) и хромосомные (изменения двух или более двух участков хромосомы).

Одновременно у бактерий имеются различные механизмы *репарации мутаций*, в том числе с использованием ферментов- эндонуклеаз, лигаз, ДНК- полимеразы.

*Генетические рекомбинации*- изменчивость, связанная с обменом генетической информации. Генетические рекомбинации могут осуществляться путем *трансформации, трансдукции, конъюгации, слияния протопластов*.

1.Трансформация- захват и поглощение фрагментов чужой ДНК и образование на этой основе рекомбинанта.

2.Трансдукция- перенос генетического материала фагами (умеренными фагами- специфическая трансдукция).

3.Конъюгация- при непосредственном контакте клеток. Контролируется tra (transfer) опероном. Главную роль играют конъюгативные F- плазмиды.

#### Генетика вирусов.

Геном вирусов содержит или РНК, или ДНК (РНК- и ДНК- вирусы соответственно). Выделяют позитивную (+) РНК, обладающую матричной активностью и соответственно инфекционными свойствами, и негативную ( - ) РНК, не проявляющую инфекционные

свойства, которая для воспроизводства должна *транскрибироваться* (превращаться) в +РНК. Механизмы репродукции различных вирусов очень сложные и существенно отличаются. Основные их схематические варианты представлены ниже.

1. вирионная (матричная) +РНК → комплементарная -РНК (в рибосомах) → вирионная +РНК.

2. - РНК → вирусная (информационная) +РНК → - РНК (формируется на геноме зараженной клетки).

3. однонитевая ДНК: +ДНК → +ДНК -ДНК → +ДНК -ДНК +ДНК → +ДНК.

4. ретровирусная однонитевая РНК: РНК → ДНК (провирус) → РНК.

5. двунитевая ДНК: разделение нитей ДНК и формирование на каждой комплементарной нити ДНК.

Генофонд вирусов создается и пополняется из четырех основных источников:

двух внутренних (мутации, рекомбинации) и двух внешних (включение в геном генетического материала клетки хозяина, поток генов из других вирусных популяций).

*Комплементация*- функциональное взаимодействие двух дефектных вирусов, способствующее их репликации и горизонтальной передаче.

*Фенотипическое смешивание*- при заражении клетки близкородственными вирусами с образованием вирионов с гибридными капсидами, кодируемыми геномами двух вирусов.

*Популяционная изменчивость* вирусов связана с двумя разнонаправленными процессами - мутациями и селекцией, связанными с внешней средой как индуктором мутаций и фактором стабилизирующего отбора. Гетерогенность вирусных популяций- адаптационный генетический механизм, способствующий пластичности (устойчивости, приспособляемости) популяций, фактор эволюции и сохранения видов во внешней среде.

Генофонд вирусных популяций сохраняется за счет нескольких механизмов:

- восстановления изменчивости за счет мутаций;
- резервирующих механизмов (возможность перехода любых, даже негативных мутаций в следующую генерацию)- комплементация, рекомбинация;
- буферных механизмов (образование дефектных вирусных частиц, иммунных комплексов и др.), способствующие сохранению вируса в изменяющихся внешних условиях.

## **Лекция № 7. Медицинская биотехнология и генная инженерия. Микробиологические основы антимикробной профилактики и терапии.**

Достижения научно-технического прогресса способствовали развитию новых биологических технологий создания диагностических, лечебных и профилактических препаратов, решению проблем сбалансированности питания, экологических проблем. Основные *принципы биотехнологии- ферментация, культивирование микроорганизмов, растительных и животных клеток, генная и клеточная инженерия.* Генная инженерия- сердцевина современной биотехнологии.

На основе достижений генетики разработаны высокоточные *методы диагностики и идентификации микроорганизмов-* определение плазмидного профиля, рестрикционный анализ, ДНК-гибридизация, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование и мн.др. Методы основаны на использовании ряда специфических ферментов- рестриктаз (ферментов, расщепляющих ДНК в специфических участках), лигаз или синтетаз (обеспечивают соединение двух молекул), в частности ДНК- лигаз (получение рекомбинантных молекул ДНК), полимераз (ДНК-зависимая ДНК-полимераза обеспечивает ПЦР- многократное реплицирование специфического участка нуклеотидной последовательности).

Плазмиды (F- плазмиды) и вирусы (бактериофаги) используют в генной инженерии в качестве *векторов* для переноса генетического материала (генов). *Метод клонирования* заключается в том, что выделенный фрагмент (ген) вводится в состав плазмиды или другой самореплицирующейся системы и накапливается в размножающихся клетках. Практический вариант использования: микроорганизмы- продуценты биологически активных веществ (в том числе вакцин). *Гибридную технологию* используют для получения *моноклональных антител (МКА).*

Кроме клонирования для получения генов используют секвенирование и химический синтез. С помощью генно-инженерных методов получают вакцины, антигены, диагностикумы, гормоны, иммуномодуляторы. Одним из крупных разделов биотехнологии является производство антибиотиков и различных химиотерапевтических препаратов антибактериального действия.

Методы воздействия на микроорганизмы по виду использованного фактора можно разделить на физические и химические, по характеру воздействия- на неизбирательные (обеззараживание- дезинфекция, стерилизация) и избирательные (химиотерапевтические).

*Физические методы.*

1.Термическая обработка- прокаливание, кипячение, пастеризация, автоклавирование.

2. Облучение- ультрафиолетовое, гамма- и рентгеновское, микроволновое.

3. Фильтрация (оптимально- бактериологические фильтры с диаметром пор около 200 нм).

*Химические методы.*

1. Неспецифического действия- *дезинфектанты* (обработка помещений и др., *антисептики*- обработка живых тканей). Среди них- препараты йода и хлора, спирты, альдегиды, кислоты и щелочи, соли тяжелых металлов, катионные детергенты, фенолы, окислители, природные препараты- деготь, ихтиол, хлорофиллипт.

2. Избирательно подавляющие жизнедеятельность микроорганизмов- антибиотики и химиотерапевтические препараты.

Эре антибиотикотерапии предшествовал период разработки антимикробных химиопрепаратов. Некоторые вехи: в 1891г. Д.А. Романовский сформулировал основные принципы химиотерапии инфекционных болезней, предложил хинин для лечения малярии, П. Эрлих в 1906г. предложил принцип химической вариации. Синтезированы производные мышьяка сальварсан и неосальварсан, предложен химиотерапевтический индекс. Круг химиопрепаратов постепенно расширялся. В 1932г. открыты подходы к созданию сульфаниламидных препаратов. Однако поистинне революционное значение имело открытие антибиотиков.

Одним из универсальных механизмов антогонизма микроорганизмов является синтез *антибиотиков*, которые тормозят рост и размножение микроорганизмов (бактериостатическое действие) или убивают их (бактерицидное действие). Антибиотики- вещества, которые могут быть получены из микроорганизмов, растений, животных тканей и синтетическим путем, обладающие выраженной биологической активностью в отношении микроорганизмов.

Таких веществ известно несколько тысяч, однако реально используют значительно меньше. Существует ряд требований к антибиотикам, существенно ограничивающих их терапевтическое применение:

- эффективность в низких концентрациях;
- стабильность в организме и в различных условиях хранения;
- низкая токсичность или ее отсутствие;
- выраженный бактериостатический и (или) бактерицидный эффект;
- отсутствие выраженных побочных эффектов;
- отсутствие иммунодепрессивного воздействия.

Первыми открытыми антибиотиками были пенициллин (Флеминг) и стрептомицин

(Ваксман).

Антибиотики могут быть разделены по происхождению, направленности и спектру действия, по механизму действия.

*По происхождению* антибиотики могут быть:

- бактериального (полимиксин, грамицидин);
- актиномицетного (стрептомицин, левомицетин, эритромицин);
- грибкового (пенициллин);
- растительного (рафанин, фитонциды);
- животного происхождения (интерфероны, лизоцим).

Больше всего известно антибиотиков актиномицетного происхождения. Актиномицеты- преимущественно почвенные микроорганизмы. В условиях большого количества и разнообразия почвенных микроорганизмов их антогонизм, в том числе с помощью выработки антибиотиков- один из механизмов их выживания.

*По спектру действия* антибиотики разделяют на:

- действующие преимущественно на грамположительную микрофлору- пенициллин, эритромицин;
- действующие преимущественно на грамотрицательную микрофлору- полимиксин;
- широкого спектра действия ( на грам-плюс и грам-минус флору)- стрептомицин, неомицин;
  
- противогрибковые- нистатин, амфотеррицин, леварин, низорал;
- противотуберкулезные- стрептомицин, канамицин;
- противоопухолевые- рифампицин;
- противовирусные- интерферон, зовиракс, ацикловир.

*Антибиотики разделяют по механизму действия:*

- ингибиторы синтеза пептикогликана клеточной стенки ( пенициллин, цефалоспорины, ванкомицин, ристомицин). Действуют на имеющих клеточную стенку растущие бактерии, не действуют на L- формы, покоящиеся формы бактерий;
- ингибиторы синтеза белка (стрептомицин, левомицетин, тетрациклин);
- ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, пуринов и аминокислот (налидиксовая кислота, рифампицин);
- ингибиторы синтеза мембраны и цитоплазматической мембраны грибов (нистатин, полимиксин).

Побочное действие антибиотиков.

*Для макроорганизма:*

- токсическое действие;
- дисбактериозы;
- аллергические реакции;
- иммунодепрессивное действие;
- эндотоксический шок.

*Для микроорганизмов :*

- формирование атипичных форм микробов;
- формирование антибиотикорезистентных и антибиотикозависимых форм микроорганизмов.

#### Биохимические и генетические механизмы лекарственной устойчивости микроорганизмов.

Существует два типа лекарственной устойчивости- естественная (природная) и приобретенная (в результате мутаций, обмена R- плазмидами др.).

*Естественная лекарственная устойчивость* является видовым признаком, чаще связана с недоступностью антибиотика к его мишени, т.е. невозможностью осуществления его механизма действия. В природных условиях, особенно в почве, микроорганизмы находятся в конкурентной борьбе за субстраты. Антибиотики- один из селективных факторов отбора. Микроорганизмы- продуценты антибиотиков защищены от синтезируемых антибиотиков генетическими механизмами (генетически детерминированная устойчивость, кодируемая в хромосоме или обусловленная наличием R- плазмид). Микроорганизмы в условиях совместного обитания вынуждены вырабатывать устойчивость к антибиотикам.

Резистентность к антибиотикам у микробов может быть связана с *негенетическими факторами* (низкая метаболическая активность, переход в L- форму).

Основную роль в лекарственной устойчивости принадлежит R- плазмидам, способным передаваться в другие бактерии и формировать своеобразный *генофонд лекарственной устойчивости* микроорганизмов. Резистентность современных стафилококков к пенициллину доходит до 100%.

*На биохимическом уровне* в формировании резистентности могут участвовать различные механизмы.

1.Разрушение молекулы антибиотика (пенициллины и другие бета- лактамные антибиотики разрушаются ферментом бета- лактамазой).

2.Модификация структуры молекулы антибиотика, приводящая к утрате биологиче-

ской активности ( так действуют изоферменты).

3.Изменение структуры мишеней, чувствительных к антибиотику (белков 70S рибосом- устойчивость к тетрациклам, стрептомицину, макролидам, гираз- к хинолонам, рнк- полимераз- к рифампицину, пенициллинсвязывающих белков- транспептидаз- к бета- лактамам).

4.Образование бактериями “обходного” пути метаболизма.

5.Формирование механизмов активного выведения антибиотика из клетки.

*Из-за формирования антибиотикоустойчивых популяций микроорганизмов с целью эффективного лечения необходимо предварительно определять чувствительность данного антибиотика к выделенной культуре возбудителя.*

Основными методами определения *антибиотикочувствительности бактерий in vitro* является метод серийных разведений, диффузии в агар (бумажных *дисков*), определение способности к продукции бета- лактамазы, *in vivo*- на модели безмикробных животных, определение концентрации антибиотиков в крови и моче.

*Метод диффузии в агар* с применением стандартных дисков, пропитанных различными антибиотиками в определенных концентрациях (зависят от терапевтической дозы и соответствуют рекомендациям ВОЗ). Основан на использовании стандартных питательных сред, дисков и методов. Оценка результатов связана с существованием зависимости между размером зоны подавления роста исследуемых культур вокруг дисков и значениями *минимальных подавляющих концентраций (МПК)* соответствующих антибиотиков (чувствительностью микроорганизмов). Имеются специальные таблицы для оценки результатов, в соответствии с которыми культуры определяют как чувствительные, умеренно устойчивые и устойчивые (резистентные) к тестируемому антибиотику.

*Метод серийных разведений* антибиотиков позволяет более точно определить МПК, однако из-за громоздкости применяется реже.

*Бета- лактамазный тест* (определение способности к образованию бета- лактамаз) чаще определяют методом дисков с *нитроцефином* - цефалоспорином, изменяющим окраску дисков при гидролизе. Положительный тест свидетельствует о резистентности бактерий ко всем бета- лактамаза- чувствительным пенициллинам.

Существует ряд причин, обуславливающих различную чувствительность микроорганизмов к антибиотикам *in vitro* и *in vivo*.

На антимикробную активность *in vitro* влияют многие факторы, в том числе :

- рН среды;

- компоненты среды;

- концентрация микроорганизмов;
- условия и время культивирования.

На антимикробную активность препаратов *in vivo* также влияют различные факторы, из которых необходимо отметить:

- фармакодинамику препарата в организме (скорость всасывания, выведения, расщепления и т.д.);
- локализацию микробов в организме (особенно внутриклеточную локализацию).

## **Лекция № 8. Экология микроорганизмов.**

Микроорганизмы распространены повсюду. Они заселяют почву, воду, воздух, растения, организмы животных и людей- *экологические среды обитания микробов*.

Выделяют свободноживущие и паразитические микроорганизмы. Всюду, где есть хоть какие- то источники энергии, углерода, азота, кислорода и водорода (кирпичиков всего живого), обязательно встречаются микроорганизмы, различающиеся по своим физиологическим потребностям и занимающих свои *экологические ниши*. Титаническая роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе имеет исключительное значение для поддержания *динамического равновесия биосферы*.

Микроорганизмы в экологических нишах сосуществуют в виде сложных ассоциаций- *биоценозов* с различными типами взаимоотношений, в конечном счете обеспечивающих сосуществование многочисленных видов прокариот и различных царств жизни.

Все типы взаимоотношений микроорганизмов объединяются понятием *симбиоз*. Он может быть *антагонистическим* и *синэргическим*.

### Роль микроорганизмов в круговороте веществ в природе.

Под круговоротом веществ в природе понимают циклы превращения химических элементов, из которых построены живые существа, происходящие вследствие разнообразия и гибкости метаболизма микроорганизмов.

Наибольшее значение для всего живого имеет обмен (кругооборот) углерода, кислорода, водорода, азота, серы, фосфора и железа. Этапы кругооборота различных химических элементов осуществляется микроорганизмами разных групп. Непрерывное существование каждой группы зависит от химических превращений элементов, осуществляемых другими группами микроорганизмов. Жизнь на Земле непрерывна, поскольку все основные элементы жизни подвергаются циклическим превращениям, в значительной степени определяемых микроорганизмами.

### Микрофлора почвы.

Почва является основным местом обитания микробов. Состав микрофлоры складывается из многих тысяч видов бактерий, грибов, простейших и вирусов. Количество микробов зависит от состава почв и ряда других факторов, в одном грамме пахотной почвы может содержаться до 10 млрд. микроорганизмов. Среди них *сапрофиты* ( “гнилое растение”), т.е. микроорганизмы, живущие за счет мертвых органических субстратов. В процессе самоочищения почвы и кругооборота веществ принимают участие также нитрифицирующие, азотфиксирующие, денитрифицирующие и другие группы микроорганизмов.

Патогенные микроорганизмы попадают в почву с биовыделениями людей и животных (калом, мочой, мокротой, слюной, гноем, потом и др.), а также с трупами. Дольше всего в почве сохраняются спорообразующие патогенные микроорганизмы- возбудители сибирской язвы, столбняка, газовой гангрены, ботулизма, что определяет эпидемическое значение почвы при этих инфекциях. Возбудители *сапронозов* могут автономно обитать в почве и воде и быть связанными с почвенными и водными организмами, т.е. эта природная среда обитания для них- основной резервуар возбудителей. Почва и вода в случае сапронозов выступает в качестве источника заражения животных и людей.

#### Микрофлора воды.

Вода- древнейшее место обитания микроорганизмов. Пресноводные водоемы и реки отличаются богатой микрофлорой. Многие виды *галофильных* микробов обитает в морской воде, в том числе на глубинах в несколько тысяч метров. Численность микроорганизмов в воде в определенной степени связано с содержанием органических веществ. Серьезной экологической проблемой являются сточные воды, содержащие значительное количество микроорганизмов и органических веществ, не успевающих самоочищаться.

Санитарно- гигиеническое качество воды оценивается различными способами. Чаще определяют *коли- титр* и *коли- индекс*, а также *общее количество микроорганизмов* в мл. Коли- индекс- количество *E.coli* (кишечной палочки) в одном литре, коли- титр- наименьшее количество воды, в котором обнаруживается одна клетка кишечной палочки. Санитарно- эпидемиологическое значение определения в различных объектах микроорганизмов изучает санитарная микробиология. К числу ее основных принципов можно отнести индикацию (выявление) патогенов в объектах окружающей среды, к косвенным методам- выявление санитарно- показательных микроорганизмов, определение общей микробной обсемененности.

Вода имеет существенное значение в эпидемиологии кишечных инфекций. Их возбудители могут попадать с испражнениями во внешнюю среду (почву), со сточными водами- в водоемы и в некоторых случаях- в водопроводную сеть.

#### Микрофлора воздуха.

Воздух как среда обитания менее благоприятен, чем почва и вода- мало питательных веществ, солнечные лучи, высушивание. Главным источником загрязнения воздуха микроорганизмами является почва, меньше- вода. В видовом отношении преобладают кокки (в т.ч. сарцины), споровые бактерии, грибы, актиномицеты. Особое значение имеет микрофлора закрытых помещений (накапливается при выделении через дыхательные пути человека). Воздушно- капельным путем (за счет образования стойких аэрозолей) распро-

страняются многие респираторные инфекции (грипп, коклюш, дифтерия, корь, туберкулез и др.).

Микробиологическая чистота воздуха имеет большое значение в больничных условиях (особо- операционные и другие хирургические отделения).

#### Микрофлора человека и ее значение.

Ребенок развивается в организме матери в норме в стерильных условиях. Формирование новой экологической системы “организм человека + населяющая его микрофлора” начинается в момент рождения, причем основой ее является микрофлора матери и окружающей ребенка внешней среды (прежде всего воздуха). В течение короткого времени кожные покровы и слизистые оболочки, сообщаемые со внешней средой, заселяются разнообразными микроорганизмами. В формировании микрофлоры детей первого года (главным образом- бифидобактерии и лактобактерии) существенную роль имеет естественное (грудное) вскармливание.

Нормальная (т.е. в условиях здорового организма) микрофлора в количественном и качественном отношении представлена на различных участках тела (*эктопах*) неодинаково. Причины- неодинаковые условия обитания.

*Аутохтонная* (т.е. присущая данной области) микрофлора может быть разделена на *резидентную* (постоянную) и *транзиторную* (непостоянную). На слизистых оболочках, особенно желудочно- кишечного тракта, представители нормальной микрофлоры обитают в виде двух форм- часть из них располагается в просвете (просветная), другая заключена в мукозный пристеночный матрикс, образующий биопленку (пристеночная микрофлора). С ней связана *колонизационная резистентность* кишечника- естественный барьер защиты кишечника (и организма в целом) от инфекционных агентов.

#### *Нормальная микрофлора кожи.*

Наиболее заселены микроорганизмами места, защищенные от действия света и высыхания. Наиболее постоянен состав микрофлоры в области устьев сально- волосяных фолликулов. Чаще выявляют *Staphylococcus epidermidis* и *S.saprophyticus*, грибы рода *Candida*, реже- дифтероиды и микрококки.

#### *Микрофлора дыхательных путей.*

Слизистые оболочки гортани, трахеи, бронхов и альвеолы здорового человека не содержат микроорганизмов. Основная масса микрофлоры рото- и носоглотки приходится на зеленящего стрептококка, реже выявляются нейссерии, дифтероиды и стафилококки.

#### *Микрофлора мочеполового тракта.*

Микробный биоценоз скуден, верхние отделы обычно стерильны. Во влагалище здо-

ровой женщины преобладают молочнокислые палочки Додерлейна (лактобактерии), создающие кислую рН, угнетающую рост грамотрицательных бактерий и стафилококков, и дифтероиды. Существует баланс между лактобактериями с одной стороны и гарднереллами и анаэробами с другой.

*Микрофлора желудочно-кишечного тракта.*

Наиболее активно бактерии обживают желудочно-кишечный тракт. При этом колонизация осуществляется четко “по этажам”. В желудке с кислой реакцией среды и верхних отделов тонкой кишки количество микроорганизмов не превышает 1000 в мл, чаще обнаруживают лактобациллы, энтерококки, дрожжи, бифидобактерии, *E.coli*.

Микрофлора толстого кишечника наиболее стабильна и многообразна. Это поистинне резервуар бактерий всего организма- обнаружено более 250 видов, общая биомасса микробов может достигать 1,5 кг. Доминирующей группой в норме являются бесспорные анаэробные бактерии (бифидобактерии и бактероиды)- до 99%. Выделяют мукозную (пристеночную) и просветную микрофлору. Пристеночная микрофлора обеспечивает колонизационную резистентность кишечника, играющую важную роль в предупреждении (в норме) и в развитии (при патологии) экзо- и эндогенных инфекционных заболеваний.

Нормальная микрофлора и особенно микрофлора толстого кишечника оказывает существенное влияние на организм. Основные ее функции:

- защитная (антагонизм к другим, в том числе патогенным микробам);
- иммуностимулирующая (антигены микроорганизмов стимулируют развитие лимфоидной ткани);
- пищеварительная (прежде всего обмен холестерина и желчных кислот);
- метаболическая (синтез витаминов группы В- В1,2,6,12, К, никотиновой, пантотеновой, фолиевой кислот).

Существуют различные методы изучения роли нормальной микрофлоры. *Гнотобионты* (безмикробные животные) используются для изучения роли микроорганизмов для функционирования физиологических систем. Гнотобиологические технологии используются для лечения иммунодефицитов, ожогов.

В результате разнообразных воздействий, снижающих естественную резистентность, при тяжелых инфекционных и соматических заболеваниях и особенно при нерациональном применении антибиотиков возникают *дисбактериозы*. Дисбактериоз- изменения количественного и качественного состава микрофлоры, главным образом кишечника. Чаще сопровождаются увеличением факультативно-анаэробной или остаточной микрофлоры (грамотрицательных палочек - кишечной палочки, протей, псевдомонад), стафилококков,

грибов рода *Candida*. Эти микроорганизмы как правило устойчивы к антибиотикам и при подавлении нормофлоры антибиотиками и снижении естественной резистентности получают возможность беспрепятственно размножаться.

Наиболее тяжелые формы дисбактериозов- стафилококковые пневмонии, колиты и сепсис, кандидомикозы, псевдомембранозный колит, вызываемый *Clostridium difficile*.

Для лечения используют биопрепараты, восстанавливающие нормальную микрофлору- эубиотики- колибактерин (используют специальный штамм *E.coli*, антогонист шигелл), лактобактерин, бифидумбактерин, бификол, бактисубтил и другие, а также специальные бактериофаги.

## **Лекция № 9. Учение об инфекции.**

Исторически слово “инфекция” (лат. *inficere*- заражать) впервые было введено для обозначения венерических болезней.

*Инфекция*- совокупность всех биологических явлений и процессов, возникающих в организме при внедрении и размножении в нем микроорганизмов, результат взаимоотношений между макро- и микроорганизмом в виде адаптационных и патологических процессов в организме т.е. *инфекционного процесса*.

*Инфекционная болезнь*- наиболее выраженная форма инфекционного процесса.

В общебиологическом плане взаимоотношения микро- и макроорганизмов представляют собой *симбиоз* (т.е. сожительство), так как все живые существа сосуществуют в природе. Человек сосуществует на планете Земля с микроорганизмами, растениями, животными. Основными формами взаимодействия микро- и макроорганизмов (их симбиоза) являются: *мутуализм, комменсализм, паразитизм*.

*Мутуализм*- взаимовыгодные отношения (пример- нормальная микрофлора).

*Комменсализм*- выгоду извлекает один партнер (микроб), не причиняя особого вреда другому. Необходимо отметить, что при любом типе взаимоотношений микроорганизм может проявить свои патогенные свойства (пример- условно- патогенные микробы- комменсалы в иммунодефицитном хозяине).

*Паразитизм*- крайняя форма антогонистического симбиоза, когда микроорганизм питается за счет хозяина, т.е. извлекает выгоду, нанося при этом вред хозяину.

Микробный паразитизм носит эволюционный характер. В процессе перехода от свободноживущего к паразитическому типу жизнедеятельности микроорганизмы теряют ряд ферментных систем, необходимых для существования во внешней среде, но приобретают ряд свойств, обеспечивающих возможность паразитизма.

Основные этапы инфекционного процесса.

1. *Адгезия*- прикрепление микроорганизма к соответствующим клеткам хозяина.
2. *Колонизация*- закрепление микроорганизмов в соответствующем участке.
3. *Размножение* (увеличение количества- мультипликация).
4. *Пенетрация*- проникновение в нижележащие слои и распространение инфекта.
5. Повреждение клеток и тканей (связано с размножением, пенетрацией и распространением инфекта).

Инфекционный процесс может быть:

*по длительности- острый и хронический.*

Острая циклическая инфекция заканчивается элиминацией (удалением) возбудителя

или смертью больного. При хронической инфекции возбудитель длительно сохраняется в организме (это состояние называется *персистенция*). Для персистенции микроорганизмы имеют ряд механизмов- внутриклеточная локализация (укрываются в клетке), переход в не имеющие клеточной стенки L- формы, антигенная мимикрия (совпадение по химическому составу антигенных детерминант микроба и клеток хозяина ), укрытие в локальных очагах и забарьерных органах (головной мозг), Для вирусов дополнительными факторами персистенции является интеграция генома вируса с хромосомой клетки- мишени, недоступность действию антител, наличие дефектных вирусных частиц и слабая индукция иммунного ответа и др. Персистенция в организме и периодическая смена хозяина- два основных механизма поддержания микробных популяций.

*по степени распространения- локальный и генерализованный.*

Локальный инфекционный процесс- возбудитель сосредоточен в определенном очаге, не выходя за его пределы, что сдерживает механизмы защиты. Если микроорганизм способен диссеминировать по организму, возникает генерализованный процесс. Существует два основных пути распространения- лимфогенный (по лимфатической системе) и гематогенный (по кровяным сосудам).

*по выраженности- манифестный и инаппарантный.*

Манифестный (ярко выраженный) инфекционный процесс- инфекционная болезнь- типичная, атипичная, хроническая и т.д. Бессимптомный (инаппарантный) инфекционный процесс характерен для латентной инфекции. Размножение возбудителя в организме не сопровождается клиническими проявлениями, а только иммунными реакциями.

Инфекционные заболевания имеют ряд отличий от соматических, в том числе- наличие возбудителя, заразность, цикличность течения.

Динамика развития инфекционной болезни.

Инфекционные заболевания характеризуются цикличностью, сменой периодов.

1.*Инкубационный период*- от момента заражения до первых клинических признаков (процесс активного размножения возбудителя).

2.*Продромальный период* (предвестников) характеризуется общими неспецифическими проявлениями- недомоганием, головной болью, повышением температуры и другими симптомами преимущественно токсического генеза.

3.*Период развития (разгара)* болезни характеризуется типичными (специфическими) для данной инфекции клиническими проявлениями.

4.*Период реконвалесценции* (выздоровления). В качестве исхода болезни может наступить выздоровление, развиться носительство или летальный исход.

Бактерионосительство может иметь большое значение в распространении многих инфекций. Может наблюдаться как при латентной инфекции, так и после перенесенного инфекционного заболевания. Особое значение при некоторых инфекциях имеют хронические носители (брюшной тиф, вирусный гепатит В).

Инфекционное заболевание возникает не при каждом попадании патогенного микроорганизма в организм человека. Требуются определенные условия для реализации:

- *достаточная доза микроорганизмов* (понятие о *критических дозах*). Чума- несколько бактериальных клеток, дизентерия- десятки, для некоторых возбудителей- тысячи- сотни тысяч;

- *естественный путь проникновения*. Существует понятие о *входных воротах инфекции*, различных для различных групп инфекций- раневых, респираторных, кишечных, урогенитальных с различными механизмами заражения (глаза, кожа, дыхательные пути, желудочно- кишечный тракт, мочеполовая система и др.);

- *характеристики возбудителя*, его болезнетворные свойства, способность преодолевать защитные механизмы хозяина;

- *состояние организма хозяина* (наследственность- гетерогенность человеческой популяции по восприимчивости к инфекции, пол, возраст, состояние иммунной, нервной и эндокринной систем, образ жизни, природные и социальные условия жизни человека и др.).

*Патогенность* (“рождающий болезнь”)- способность микроорганизма вызвать заболевание. Это свойство характеризует видовые *генетические* особенности микроорганизмов, их генетически детерминированные характеристики, позволяющие преодолеть защитные механизмы хозяина, проявить свои патогенные свойства.

*Вирулентность* - *фенотипическое* (индивидуальное) количественное выражение патогенности (патогенного генотипа). Вирулентность может варьировать и может быть определена лабораторными методами (чаще- DL50- 50% летальная доза- количество патогенных микроорганизмов, позволяющая вызвать гибель 50% зараженных животных).

По способности вызывать заболевания микроорганизмы можно разделить на *патогенные, условно- патогенные, непатогенные*. Условно- патогенные микроорганизмы обнаруживаются как в окружающей среде, так и в составе нормальной микрофлоры. В определенных условиях (иммунодефицитные состояния, травмы и операции с проникновением микроорганизмов в ткани) они могут вызывать *эндогенные инфекции*.

Основные факторы патогенности микроорганизмов - адгезины, ферменты патогенности, подавляющие фагоцитоз вещества, микробные токсины, в определенных условиях-

капсула, подвижность микробов. Вирулентность связана с *токсигенностью* (способностью образования токсинов) и *инвазивностью* (способностью проникать в ткани хозяина, размножаться и распространяться). Токсигенность и инвазивность имеют самостоятельный генетический контроль, часто находятся в обратной зависимости (возбудитель с высокой токсигенностью может обладать низкой инвазивностью и наоборот).

Патогенность - т.е. способность микроорганизма вызывать заболевание- более широкое понятие, чем паразитизм. Патогенными свойствами могут обладать не только паразитические виды микробов, но и свободно живущие, в т.ч. возбудители сапронозов (иерсинии, легионеллы и др.). Естественной средой для последних является почва и растительные организмы, однако они способны перестраивать свой метаболизм в организме теплокровных животных и оказывать патогенное действие.

*Адгезины и факторы колонизации*- чаще поверхностные структуры бактериальной клетки, с помощью которых бактерии распознают рецепторы на мембранах клеток, прикрепляются к ним и колонизируют ткани. Функцию адгезии выполняют *пили, белки наружной мембраны, ЛПС, тейхоевые кислоты, гемагглютинины вирусов*. Адгезия- пусковой механизм реализации патогенных свойств возбудителей.

*Факторы инвазии, проникновения в клетки и ткани хозяина*. Микроорганизмы могут размножаться вне клеток, на мембранах клеток, внутри клеток. Бактерии выделяют вещества, способствующие преодолению барьеров хозяина, их проникновению и размножению. У грамотрицательных бактерий это обычно белки наружной мембраны. К этим же факторам относятся ферменты патогенности.

*Ферменты патогенности*- это факторы агрессии и защиты микроорганизмов. Способность к образованию экзоферментов во многом определяет инвазивность бактерий- возможность проникать через слизистые, соединительнотканые и другие барьеры. К ним относятся различные литические ферменты- гиалуронидаза, коллагеназа, лецитиназа, нейраминидаза, коагулаза, протеазы. Более подробно их характеристика дана в лекции по физиологии микроорганизмов.

Важнейшими факторами патогенности считают *токсины*, которые можно разделить на две большие группы- *экзотоксины и эндотоксины*.

Экзотоксины продуцируются во внешнюю среду (организм хозяина), обычно белковой природы, могут проявлять ферментативную активность, могут секретировать как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Они обладают очень высокой токсичностью, термически нестойки, часто проявляют антиметаболитные свойства. Экзотоксины проявляют высокую иммуногенность и вызывают образование специфиче-

ских нейтрализующих антител- *антитоксинов*. По механизму действия и точке приложения экзотоксины отличаются- цитотоксины (энтеротоксины и дерматонекротоксины), мембранотоксины (гемолизины, лейкоцидины), функциональные блокаторы (холероген), эксфолианты и эритрогенины. Микробы, способные продуцировать экзотоксины, называют *токсигенными*.

Эндотоксины высвобождаются только при гибели бактерий, характерны для грамотрицательных бактерий, представляют собой сложные химические соединения клеточной стенки (ЛПС)- подробнее смотри лекцию по химическому составу бактерий. Токсичность определяется липидом А, токсин относительно термостоек; иммуногенные и токсические свойства выражены более слабо, чем у экзотоксинов.

Наличие капсул у бактерий затрудняет начальные этапы защитных реакций- распознавание и поглощение (фагоцитоз). Существенным фактором инвазивности является подвижность бактерий, обуславливающая проникновение микробов в клетки и в межклеточные пространства.

Факторы патогенности контролируются:

- генами хромосомы;
- генами плазмид;
- генами, принесенными умеренными фагами.

## **Лекция № 10. Иммуитет, виды и формы. Структура иммунной системы. Факторы неспецифической защиты.**

Первоначально иммунология возникла как наука о невосприимчивости (иммуитете) к инфекционным болезням. Наиболее существенный вклад в ее создание внесли И.И.Мечников (фагоцитарная или клеточная теория иммуитета) и П.Эрлих (гуморальная теория), в творческой дискуссии между которыми совершенствовались представления об иммуитете.

В настоящее время считается, что *наследственный* (врожденный, видовой) и *приобретенный* иммуитет зависит от согласованной деятельности пяти основных систем : макрофагов, комплемента, интерферонов, Т- и В- лимфоцитов, главной системы гистосовместимости (МНС- в английском варианте), обеспечивающих различные формы иммунного ответа.

В современном понимании иммунология- это не только наука, изучающая защиту от инфекционных заболеваний. *Иммунология- наука, изучающая механизмы самозащиты организма от всего генетически чужеродного, поддержания структурной и функциональной целостности организма (гомеостаза организма)*. Подробнее - см. лекцию 1.

Центральным биологическим механизмом иммуитета является механизм распознавания “своего” и “чужого”. Пример- необходимость защиты от собственных мутантных и раковых клеток (одномоментно в организме находится около 10 млн. измененных клеток).

**Иммуитет-** целостная система биологических механизмов самозащиты организма, с помощью которых он распознает и уничтожает все чужеродное (генетически отличающееся).

Выделяют две **основные формы иммуитета-** *видовой (врожденный) и приобретенный*. Приобретенный иммуитет может быть *естественный* (результат встречи с возбудителем) и *искусственный* (иммунизация), *активный* (вырабатываемый) и *пассивный* (получаемый), *стерильный* (без наличия возбудителя) и *нестерильный* (существующий в присутствии возбудителя в организме), *гуморальный* и *клеточный*, *системный* и *местный*, по направленности- *антибактериальный, антивирусный, антитоксический, противоопухолевый, антитрансплантационный*.

В основе видовой иммуитета лежат различные механизмы **естественной неспецифической резистентности**. Среди них- кожные покровы и слизистые оболочки, нормальная микрофлора организма, фагоцитоз, воспаление, лихорадка, система комплемента, барьерные механизмы лимфоузлов, противомикробные вещества, выделительные системы организма, главная система гистосовместимости.

**Кожа и слизистые**- первая линия защиты против возбудителей. Кроме функции механического (анатомического) барьера кожа обладает бактерицидной активностью. Слизь, лизоцим, желудочный сок, слезная жидкость, слюна, деятельность мерцательного эпителия способствует защите слизистых оболочек.

**Нормальная микрофлора организма** препятствует колонизации организма посторонней микрофлорой (конкуренция за субстраты, различные формы антагонизма, в т.ч. выделение антибиотических веществ, изменение рН и др.).

**Фагоцитоз и система комплемента**- вторая линия защиты организма против микроорганизмов, преодолевших поверхностные барьеры. Клеточные факторы системы видовой резистентности- *фагоциты*, поглощающие и разрушающие патогенные микроорганизмы и другой генетически чужеродный материал. Представлены полиморфоядерными лейкоцитами или *гранулоцитами*- нейтрофилами, эозинофилами и базофилами (клетками миелопоэтического ряда), а также моноцитами и тканевыми макрофагами (клетками макрофагально- моноцитарной системы).

Значение фагоцитирующих клеток для защиты организма впервые доказал И.И.Мечников, разработавший фагоцитарную теорию иммунитета.

#### Стадии фагоцитоза.

Процесс фагоцитоза (поглощения твердофазного объекта) состоит из пяти стадий.

1.Активация (усиление энергетического метаболизма). Факторами активации и хемотаксиса являются бактериальные продукты (ЛПС, пептиды), компоненты комплемента (С3 и С5), цитокины и антитела.

2.Хемотаксис.

3.Адгезия.

4.Поглощение.

5.Исход фагоцитоза.

Адгезия связана с наличием ряда рецепторов на поверхности фагоцитов ( к Fc-фрагментам антител, компонентам комплемента, фибронектину), обеспечивающих прочность рецептор- опосредованных взаимодействий **опсонинов**, обволакивающих микроорганизмы и ограничивающих их подвижность (антитела, С3в, фибронектин).

Фагоциты обладают амебоподобными псевдоподиями. При поглощении образуется **фагосома** с поглощенным объектом (бактерией), к ней присоединяется и сливается содержащая литические ферменты лизосома, образуется **фаголизосома**.

Возможно три исхода фагоцитоза:

- **завершенный фагоцитоз**;

- незавершенный фагоцитоз;
- процессинг антигенов.

Завершенный фагоцитоз- полное переваривание микроорганизмов в клетке- фагоците.

Незавершенный фагоцитоз- выживание и даже размножение микроорганизмов в фагоците. Это характерно для факультативных и особенно - *облигатных внутриклеточных паразитов*. Механизмы персистенции в фагоцитах связаны с блокадой фагосомо- лизосомального слияния (вирус гриппа, микобактерии, токсоплазмы), резистентностью к действию лизосомальных ферментов (гонококки, стафилококки), способностью микробов быстро покидать фагосомы после поглощения и длительно пребывать в цитоплазме (риккетсии).

В процессе фагоцитоза происходит “окислительный взрыв” с образованием активных форм кислорода, что обеспечивает бактерицидный эффект.

К одной из важнейших функций макрофагов (наряду с хемотаксисом, фагоцитозом, секрецией биологически активных веществ) является **переработка (процессинг) антигена и представление его** иммунокомпетентным клеткам с участием белков главной системы гистосовместимости (МНС) класса 2.

Фагоцитоз- не только уничтожение чужеродного, но и представление антигена для запуска иммунных реакций и секреции медиаторов иммунных и воспалительных реакций. Система макрофагов- центральное звено не только естественной резистентности (видового иммунитета), но и играет важную роль в приобретенном иммунитете, кооперации клеток в иммунном ответе.

**Воспаление** как защитная реакция организма на различные повреждения тканей возникло на более высокой ступени эволюции, чем фагоцитоз и характерно для высокоорганизованных организмов, обладающих кровеносной и нервной системами.

Инфекционное воспаление сопровождается различными сосудистыми и клеточными (включая фагоцитоз) реакциями, а также запуском целого ряда медиаторов воспалительных реакций (гистамина, серотонина, кининов, белков острой фазы воспаления, лейкотриенов и простагландинов, цитокинов, системы комплемента).

Многие бактериальные продукты активируют клетки макрофагально- моноцитарной системы и лимфоциты, отвечающие на них выделением биологически активных продуктов- *цитокинов, в частности интерлейкинов*. Их можно характеризовать как *медиаторы клеточных иммунных реакций*. В воспалительных реакциях основную роль имеет **интерлейкин-1 (ИЛ-1)**, стимулирующий лихорадку, повышающий проницаемость сосудов и

адгезивные свойства эндотелия, активирующий фагоциты.

**Лихорадка.** Повышение температуры тела- защитная реакция организма, ухудшающая условия для размножения многих микроорганизмов, активирует макрофаги, ускоряет кровоток и усиливает обменные процессы в организме.

**Барьерные функции лимфоузлов.** По выражению П.Ф.Здродовского (1969) лимфоузлы- своеобразный биологический фильтр для возбудителей, переносимых с лимфой. Здесь проникшие через кожу или слизистые и занесенные током лимфы микроорганизмы задерживаются и подвергаются действию макрофагов и активированных лимфоцитов.

**Система комплемента-** комплекс белков и гликопротеидов сыворотки крови человека и позвоночных животных (их более 20). Отдельные компоненты опосредуют процессы воспаления, опсонизацию чужеродных фрагментов для последующего фагоцитоза, участвуют наряду с макрофагами в непосредственном уничтожении микроорганизмов и других чужеродных клеток (*лизис бактерий и вирусов*). В условиях физиологической нормы компоненты системы комплемента находятся в неактивной форме. Известны **три пути активации системы комплемента- классический, альтернативный и с использованием C1- шунта.**

*Классический путь-* каскад протеазных реакций с компонента C1q до C9, реализуется *при наличии антител* к соответствующему антигену. С комплексом “антиген-антитела” взаимодействует компонент C1q, затем C4, следом- C2. Образуется комплекс “антиген- антитела-C1C4C2”, с ним соединяется C3 (*центральный компонент системы*) и запускается цепь активации с эффекторными функциями (опсонизация и лизис бактерий, активация системы макрофагов, воспаление).

*Альтернативный путь* реализуется при первичном контакте с возбудителем (когда еще нет антител). Он индуцируется ЛПС и другими микробными антигенами. C1, C4, C2 не участвуют, альтернативный и классический пути смыкаются на уровне C3.

### **Система интерферонов.**

Интерфероны- синтезируемые различными клетками организма гликопротеиды широкого спектра биологической активности (прежде всего антивирусной), *быстрый ответ организма на получение клетками неспецифического сигнала чужеродности*. Существует целая система интерферонов, которые разделены на альфа, бета и гамма подтипы с выраженной гетерогенностью свойств. Противовирусное действие проявляется в способности подавлять внутриклеточное размножение ДНК- и РНК- вирусов (прежде всего в результате блокировки синтеза вирусных макромолекул). Индукцию синтеза интерферонов вызывают вирусы, бактерии, риккетсии, простейшие, синтетические соединения.

### **Киллерные клетки.**

В обеспечении видового иммунитета существенную роль принадлежит *T- цитотоксическим лимфоцитам (T- киллерам)*, а также *главной системе гистосовместимости* (подробнее- в следующих лекциях).

*T- киллеры* по представлению антигенов главной системы гистосовместимости класса 1 распознают любые чужеродные антигены (включая мутантные, например- раковые клетки), атакуют и уничтожают их.

*Клетки NK (natural killer- натуральные киллеры)* имеют важное значение в поддержании генетического гомеостаза и противоопухолевой защите, их функции распознавания не зависят от представления антигенов МНС (major histocompatibility complex) класса 1.

Системы неспецифической резистентности и видового иммунитета способствуют поддержанию структурной и функциональной целостности организма и являются основой для формирования приобретенного (специфического) иммунитета. Стыкаясь на этом, более высоком уровне, системы видового и приобретенного иммунитета образуют единую и наиболее **эффективную систему самозащиты организма от всего чужеродного.**

### **Иммунная система**

**Иммунная система-** совокупность органов, тканей и клеток, обеспечивающих клеточно- генетическое постоянство организма. Принципы *антигенной (генетической) чистоты* основываются на распознавании “своего- чужого” и в значительной степени обусловлены системой генов и гликопротеидов (продуктов их экспрессии)- *главным комплексом гистосовместимости (МНС)*, у человека часто называемой системой HLA (human leucocyte antigens). На лейкоцитах человека четко экспрессированы белки МНС, с помощью исследования лейкоцитов типизируют антигены МНС.

#### **Органы иммунной системы.**

Выделяют *центральные* (костный мозг- кроветворный орган, вилочковая железа или тимус, лимфоидная ткань кишечника) и *периферические* (селезенка, лимфатические узлы, скопления лимфоидной ткани в собственном слое слизистых оболочек кишечного типа) *органы иммунитета.*

Клетки- предшественники иммунокомпетентных клеток продуцируются костным мозгом. Некоторые потомки стволовых клеток становятся лимфоцитами. Лимфоциты подразделяют на два класса- Т и В. Предшественники Т- лимфоцитов мигрируют в тимус, где созревают в клетки, способные участвовать в иммунном ответе. У человека В- лимфоциты созревают в костном мозге. У птиц незрелые В- клетки мигрируют в сумку (бурсу)

Фабрициуса, где достигают зрелости. Зрелые В- и Т- лимфоциты заселяют периферические лимфоузлы. Таким образом, *центральные органы иммунной системы осуществляют образование и созревание иммунокомпетентных клеток, периферические органы обеспечивают адекватный иммунный ответ на антигенную стимуляцию- “обработку” антигена, его распознавание и клональную пролиферацию лимфоцитов- антиген- зависимую дифференцировку.*

## Лекция № 11. Антигены, основные свойства. Антигены гистосовместимости.

### Процессинг антигенов.

*Антигены*- вещества различного происхождения, несущие признаки *генетической чужеродности* и вызывающие развитие иммунных реакций (*гуморальных, клеточных, иммунологической толерантности, иммунологической памяти* и др.).

Свойства антигенов, наряду с *чужеродностью*, определяет их *иммуногенность*- способность вызывать иммунный ответ и *антигенность*- способность (антигена) избирательно взаимодействовать со специфическими антителами или антиген- распознающими рецепторами лимфоцитов.

Антигенами могут быть белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты в комбинации между собой или липидами. Антигенами являются любые структуры, несущие признаки генетической чужеродности и распознаваемые в этом качестве иммунной системой. Наибольшей иммуногенностью обладают белковые антигены, в том числе бактериальные экзотоксины, вирусная нейраминидаза.

### Многообразие понятия “антиген”.

Антигены разделены на *полные (иммуногенные)*, всегда проявляющие иммуногенные и антигенные свойства, и *неполные (гаптены)*, не способные самостоятельно вызывать иммунный ответ.

Гаптены обладают антигенностью, что обуславливает их специфичность, способность избирательно взаимодействовать с антителами или рецепторами лимфоцитов, определяться иммунологическими реакциями. Гаптены могут стать иммуногенными при связывании с иммуногенным носителем (например, белком), т.е. становятся полными.

За специфичность антигена отвечает гаптенная часть, за иммуногенность- носитель (чаще белок).

*Иммуногенность* зависит от ряда причин (молекулярного веса, подвижности молекул антигена, формы, структуры, способности к изменению). Существенное значение имеет степень *гетерогенности антигена, т.е. чужеродность* для данного вида (макроорганизма), степени эволюционной дивергенции молекул, уникальности и необычности структуры. Чужеродность определяется также *молекулярной массой, размерами и строением биополимера, его макромолекулярностью и жесткостью структуры*. Белки и другие высокомолекулярные вещества с более высоким молекулярным весом наиболее иммуногенны. Большое значение имеет жесткость структуры, что связано с наличием ароматических колец в составе аминокислотных последовательностей. Последовательность аминокислот в полипептидных цепочках- генетически детерминированный признак.

Антигенность белков является проявлением их чужеродности, а ее специфичность зависит от аминокислотной последовательности белков, вторичной, третичной и четвертичной (т.е. от общей конформации белковой молекулы) структуры, от поверхностно расположенных детерминантных групп и концевых аминокислотных остатков. *Коллоидное состояние и растворимость*- обязательные свойства антигенов.

Специфичность антигенов зависит от особых участков молекул белков и полисахаридов, называемых **эпитопами**. Эпитопы или *антигенные детерминанты*- фрагменты молекул антигена, вызывающие иммунный ответ и определяющие его специфичность. Антигенные детерминанты избирательно реагируют с антителами или антиген- распознающими рецепторами клетки.

Структура многих антигенных детерминант известна. У белков это обычно фрагменты из 8- 20 выступающих на поверхности аминокислотных остатков, у полисахаридов- выступающие О- боковые дезоксисахаридные цепи в составе ЛПС, у вируса гриппа- гемагглютинин, у вируса иммунодефицита человека- мембранный гликопептид.

Эпитопы качественно могут отличаться, к каждому могут образовываться “свой” антитела. Антигены, содержащие одну антигенную детерминанту, называют *моновалентными*, ряд эпитопов- *поливалентными*. **Полимерные антигены** содержат в большом количестве идентичные эпитопы (флагеллины, ЛПС).

Основные типы антигенной специфичности (зависят от специфичности эпитопов).

1. *Видовая*- характерна для всех особей одного вида (общие эпитопы).

2. *Групповая*- внутри вида (изоантигены, которые характерны для отдельных групп).

Пример- группы крови (АВО и др.).

3. *Гетероспецифичность*- наличие общих антигенных детерминант у организмов различных таксономических групп. Имеются перекрестно- реагирующие антигены у бактерий и тканей макроорганизма.

а. Антиген Форсмана- типичный перекрестно- реагирующий антиген, выявлен в эритроцитах кошек, собак, овец, почке морской свинки.

б. Rh- система эритроцитов. У человека Rh- антигены агглютинируют антитела к эритроцитам обезьян *Macacus rhesus*, т.е. являются перекрестными.

в. Известны общие антигенные детерминанты эритроцитов человека и палочки чумы, вирусов оспы и гриппа.

г. Еще пример- белок А стрептококка и ткани миокарда (клапанный аппарат).

Подобная антигенная мимикрия обманывает иммунную систему, защищает от ее воздействия микроорганизмы. Наличие перекрестных антигенов способно блокировать

системы, распознающие чужеродные структуры.

4. *Патологическая.* При различных патологических изменениях тканей происходят изменения химических соединений, что может изменять нормальную антигенную специфичность. Появляются “ожоговые”, “лучевые”, “раковые” антигены с измененной видовой специфичностью. Существует понятие **аутоантигенов** - веществ организма, к которым могут возникать иммунные реакции ( так называемые *аутоиммунные реакции*), направленные против определенных тканей организма. Чаще всего это относится к органам и тканям, в норме не подвергающимся воздействию иммунной системы в связи с наличием барьеров (мозг, хрусталик, паразитовидные железы и др.).

5. *Стадиоспецифичность.* Имеются антигены, характерные для определенных стадий развития, связанные с морфогенезом. Альфа- фетопроtein характерен для эмбрионального развития, синтез во взрослом состоянии резко увеличивается при раковых заболеваниях печени.

#### Антигенная специфичность и антигенное строение бактерий.

Для характеристики микроорганизмов выделяют родовую, видовую, групповую и типовую специфичность антигенов. Наиболее точная дифференциация осуществляется с использованием *моноклональных антител* (МКА), распознающих только одну антигенную детерминанту.

Обладая сложным химическим строением, бактериальная клетка представляет целый комплекс антигенов. Антигенными свойствами обладают жгутики, капсула, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, рибосомы и другие компоненты цитоплазмы, токсины, ферменты.

Основными видами бактериальных антигенов являются:

- соматические или О- антигены (у грамотрицательных бактерий специфичность определяется дезоксисахарами полисахаридов ЛПС);
- жгутиковые или Н- антигены (белковые);
- поверхностные или капсульные К- антигены.

Выделяют *протективные антигены*, обеспечивающие защиту (протекцию) против соответствующих инфекций, что используется для создания вакцин.

*Суперантигены* (некоторые экзотоксины, например- стафилококковый) вызывают чрезмерно сильную иммунную реакцию, часто приводят к побочным реакциям, развитию иммунодефицита или аутоиммунных реакций.

#### Антигены гистосовместимости.

При пересадках органов возникает проблема совместимости тканей, связанная со

степенью их генетического родства, реакциями отторжения чужеродных *аллогенных и ксеногенных* трансплантатов, т.е. проблемами трансплантационного иммунитета. Существует ряд тканевых антигенов. Трансплантационные антигены во многом определяют индивидуальную антигенную специфичность организма. Сопокупность генов, определяющих синтез трансплантационных антигенов, получила название главной системы гистосовместимости. У людей она часто называется системой HLA (Human leucocyte antigens), в связи с четким представительством на лейкоцитах трансплантационных антигенов. Гены этой системы расположены на коротком плече хромосомы С6. *Система HLA- это система сильных антигенов. Спектр молекул МНС уникален для организма, что определяет его биологическую индивидуальность и позволяет различать “чужое- несовместимое”.*

Семь генетических локусов системы разделены на *три класса.*

*Гены первого класса* контролируют синтез антигенов класса 1, определяют тканевые антигены и контролируют гистосовместимость. Антигены класса 1 *определяют индивидуальную антигенную специфичность, они представляют любые чужеродные антигены Т-цитотоксическим лимфоцитам.* Антигены класса 1 представлены на поверхности всех ядродержащих клеток. Молекулы МНС класса 1 взаимодействуют с молекулой CD8, экспрессируемой на мембране предшественников цитотоксических лимфоцитов (CD-cluster difference).

*Гены МНС класса 2* контролируют антигены класса 2. Они контролируют ответ к *тимусзависимым антигенам.* Антигены класса 2 экспрессированы преимущественно на мембране *иммунокомпетентных клеток* (прежде всего макрофагов и В- лимфоцитов, частично- активированных Т- лимфоцитов). К этой же группе генов (точнее- области HLA-D) относятся также *гены Ir - силы иммунного ответа и гены Is - супрессии иммунного ответа.* Антигены МНС класса 2 обеспечивают взаимодействие между макрофагами и В-лимфоцитами, участвуют во всех стадиях иммунного ответа- представлении антигена макрофагами Т- лимфоцитам, взаимодействии (кооперации) макрофагов, Т- и В- лимфоцитов, дифференцировке иммунокомпетентных клеток. Антигены класса 2 принимают участие в формировании *противомикробного, противоопухолевого, трансплантационного и других видов иммунитета.*

Структуры, с помощью которых белки МНС классов 1 и 2 связывают антигены (так называемые *активные центры*) по уровню специфичности уступают только активным центрам антител.

*Гены МНС класса 3* кодируют отдельные компоненты системы комплемента.

*Процессинг антигенов-* это их судьба в организме. Одной из важнейших функций

макрофагов является переработка антигена в иммуногенную форму (это собственно и есть процессинг антигена) и представление его иммунокомпетентным клеткам. В процессинге, наряду с макрофагами, участвуют В- лимфоциты, дендритные клетки, Т- лимфоциты. Под процессингом понимают такую переработку антигена, в результате которой пептидные фрагменты антигена (эпитопы), необходимые для передачи (представления), отбираются и связываются с белками МНС класса 2 (или класса 1). В таком комплексном виде антигенная информация передается лимфоцитам. Дендритные клетки имеют значение в фиксации и длительном хранении (депонировании) переработанного антигена.

*Экзогенные антигены* подвергаются эндоцитозу и расщеплению в антиген- представляющих (презентирующих) клетках. Фрагмент антигена, содержащий антигенную детерминанту, в комплексе с молекулой класса 2 МНС транспортируется к плазматической мембране антиген- представляющей клетки, встраивается в нее и представляется CD4 Т- лимфоцитам.

*Эндогенные антигены* - продукты собственных клеток организма. Это могут быть вирусные белки или аномальные белки опухолевых клеток. Их антигенные детерминанты представляются CD8 Т- лимфоцитам в комплексе с молекулой класса 1 МНС.

## Лекция № 12. Гуморальный иммунитет. Иммуноглобулины. Роль антител в иммунном ответе. Реакция антиген- антитело, ее применение.

Основными формами иммунного ответа на попадание антигена в организм являются: биосинтез антител, образование клеток иммунной памяти, реакция гиперчувствительности немедленного типа, реакция гиперчувствительности замедленного типа, иммунологическая толерантность, идиотип- антиидиотипические отношения.

Для гуморального иммунитета характерна выработка специфических антител (иммуноглобулинов).

Антитела - специфические белки гамма- глобулиновой природы, образующиеся в организме в ответ на антигенную стимуляцию и способные специфически взаимодействовать с антигеном (in vivo, in vitro). В соответствии с международной классификацией совокупность сывороточных белков, обладающих свойствами антител, называют **иммуноглобулинами**.

Уникальность антител заключается в том, что они способны специфически взаимодействовать только с тем антигеном, который вызвал их образование.

Иммуноглобулины ( Ig ) разделены в зависимости от локализации на три группы:

- сывороточные (в крови);
- секреторные ( в секретах- содержимом желудочно- кишечного тракта, слезном секрете, слюне, особенно- в грудном молоке) обеспечивают *местный иммунитет* (иммунитет слизистых);
- поверхностные ( на поверхности иммунокомпетентных клеток, особенно В- лимфоцитов).

Любая молекула антител имеет сходное строение ( Y- образную форму) и состоит из двух тяжелых ( H ) и двух легких ( L ) цепей, связанных дисульфидными мостиками. Каждая молекула антител имеет два одинаковых антигенсвязывающих фрагмента Fab ( fragment antigen binding ), определяющих антительную специфичность, и один Fc ( fragment constant ) фрагмент, который не связывает антиген, но обладает эффекторными биологическими функциями. Он взаимодействует со “своим” рецептором в мембране различных типов клеток ( макрофаг, тучная клетка, нейтрофил).

Концевые участки легких и тяжелых цепей молекулы иммуноглобулина переменны по составу ( аминокислотным последовательностям ) и обозначаются как VL и VH области. В их составе выделяют гипервариабельные участки, которые определяют структуру *активного центра антител (антигенсвязывающий центр или паратон)*. Именно с ним взаимодействует антигенная детерминанта (эпитоп) антигена. Антигенсвязывающий

центр антител комплементарен эпитопу антигена по принципу “ключ - замок” и образован гипервариабельными областями L- и H- цепей. Антитело свяжется антигеном (ключ попадет в замок) только в том случае, если детерминантная группа антигена полностью влезет в щель активного центра антител.

Легкие и тяжелые цепи состоят из отдельных блоков- **доменов**. В легких ( L ) цепях - два домена- один вариабельный ( V ) и один константный ( C ), в тяжелых ( H ) цепях- один V и 3 или 4 ( в зависимости от класса иммуноглобулина ) C домена.

Существуют легкие цепи двух типов- каппа и лямбда, они встречаются в различных пропорциях в составе различных (всех) классов иммуноглобулинов.

Выявлено *пять классов тяжелых цепей*- альфа ( с двумя подклассами), гамма ( с четырьмя подклассами), эксилон, мю и дельта. Соответственно обозначению тяжелой цепи обозначается и класс молекул иммуноглобулинов- A, G, E, M и D.

Именно константные области тяжелых цепей, различаясь по аминокислотному составу у различных классов иммуноглобулинов, в конечном результате и определяют специфические свойства иммуноглобулинов каждого класса.

Известно пять классов иммуноглобулинов, отличающихся по строению тяжелых цепей, молекулярной массе, физико- химическим и биологическим характеристикам: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. В составе IgG выделяют 4 подкласса ( IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 ), в составе IgA- два подкласса (IgA1, IgA2 ).

Структурной единицей антител является **мономер**, состоящий из двух легких и двух тяжелых цепей. Мономерами являются IgG, IgA ( сывороточный), IgD и IgE. IgM- **пентамер** (полимерный Ig). У полимерных иммуноглобулинов имеется дополнительная j ( joint) полипептидная цепь, которая объединяет ( полимеризует) отдельные субъединицы ( в составе пентамера IgM, ди- и тримера секреторного IgA).

#### Основные биологические характеристики антител.

1. *Специфичность* - способность взаимодействия с определенным (своим) антигеном (соответствие эпитопа антигена и активного центра антител).

2. *Валентность*- количество способных реагировать с антигеном активных центров ( это связано с молекулярной организацией- моно- или полимер). Иммуноглобулины могут быть *двухвалентными* ( IgG ) или *поливалентными* (пентамер IgM имеет 10 активных центров). Двух- и более валентные антитела называют *полными антителами*. *Неполные антитела* имеют только один участвующий во взаимодействии с антигеном активный центр ( блокирующий эффект на иммунологические реакции, например, на агглютинационные тесты). Их выявляют в антиглобулиновой пробе Кумбса, реакции угнетения связывания

комплемента.

3. *Аффинность* - прочность связи между эпитопом антигена и активным центром антител, зависит от их пространственного соответствия.

4. *Авидность* - интегральная характеристика силы связи между антигеном и антителами, с учетом взаимодействия всех активных центров антител с эпитопами. Поскольку антигены часто поливалентны, связь между отдельными молекулами антигена осуществляется с помощью нескольких антител.

5. *Гетерогенность* - обусловлена антигенными свойствами антител, наличием у них трех видов антигенных детерминант:

- *изотипические* - принадлежность антител к определенному классу иммуноглобулинов;

- *аллотипические* - обусловлены аллельными различиями иммуноглобулинов, кодируемых соответствующими аллелями Ig гена;

- *идиотипические* - отражают индивидуальные особенности иммуноглобулина, определяемые характеристиками активных центров молекул антител. Даже тогда, когда антитела к конкретному антигену относятся к одному классу, субклассу и даже аллотипу, они характеризуются специфическими отличиями друг от друга (**идиотипом**). Это зависит от особенностей строения V- участков H- и L- цепей, множества различных вариантов их аминокислотных последовательностей.

*Понятие о поликлональных и моноклональных антителах будет дано в следующих разделах.*

#### Характеристика основных классов иммуноглобулинов.

**Ig G.** Мономеры, включают четыре субкласса. Концентрация в крови - от 8 до 17 г/л, период полураспада - около 3- 4 недель. Это основной класс иммуноглобулинов, защищающих организм от бактерий, токсинов и вирусов. В наибольшем количестве IgG- антитела вырабатываются на стадии выздоровления после инфекционного заболевания (поздние или 7S антитела), при вторичном иммунном ответе. IgG1 и IgG4 специфически (через Fab- фрагменты) связывают возбудителей (*опсонизация*), благодаря Fc- фрагментам IgG взаимодействуют с Fc- рецепторам фагоцитов, способствуя фагоцитозу и лизису микроорганизмов. IgG способны нейтрализовать бактериальные экзотоксины, связывать комплемент. Только IgG способны транспортироваться через плаценту от матери к плоду (проходить через плацентарный барьер) и обеспечивать защиту материнскими антителами плода и новорожденного. В отличие от IgM- антител, IgG- антитела относятся к категории поздних - появляются позже и более длительно выявляются в крови.

**IgM.** Молекула этого иммуноглобулина представляет собой полимерный Ig из пяти субъединиц, соединенных дисульфидными связями и дополнительной J- цепью, имеет 10 антиген- связывающих центров. Филогенетически это наиболее древний иммуноглобулин. IgM- наиболее ранний класс антител, образующихся при первичном попадании антигена в организм. Наличие IgM- антител к соответствующему возбудителю свидетельствует о свежем инфицировании (текущем инфекционном процессе). Антитела к антигенам грамотрицательных бактерий, жгутиковым антигенам- преимущественно IgM- антитела. IgM- основной класс иммуноглобулинов, синтезируемых у новорожденных и младенцев. IgM у новорожденных- это показатель внутриутробного заражения (краснуха, ЦМВ, токсоплазмоз и другие внутриутробные инфекции), поскольку материнские IgM через плаценту не проходят. Концентрация IgM в крови ниже, чем IgG- 0,5- 2,0 г/л, период полураспада- около недели. IgM способны агглютинировать бактерии, нейтрализовать вирусы, активировать комплемент, активизировать фагоцитоз, связывать эндотоксины грамотрицательных бактерий. IgM обладают большей, чем IgG авидностью (10 активных центров), аффинность (сродство к антигену) меньше, чем у IgG.

**IgA.** Выделяют сывороточные IgA (мономер) и секреторные IgA (IgAs). Сывороточные IgA составляют 1,4- 4,2 г/л. Секреторные IgAs находятся в слюне, пищеварительных соках, секрете слизистой носа, в молозиве. Они являются первой линией защиты слизистых, обеспечивая их местный иммунитет. IgAs состоят из Ig мономера, J-цепи и гликопротеина (секреторного компонента). Выделяют два изотипа- IgA1 преобладает в сыворотке, субкласс IgA2 - в экстравазкулярных секретах.

Секреторный компонент вырабатывается эпителиальными клетками слизистых оболочек и присоединяется к молекуле IgA в момент прохождения последней через эпителиальные клетки. Секреторный компонент повышает устойчивость молекул IgAs к действию протеолитических ферментов. Основная роль IgA- обеспечение местного иммунитета слизистых. Они препятствуют прикреплению бактерий к слизистым, обеспечивают транспорт полимерных иммунных комплексов с IgA, нейтрализуют энтеротоксин, активируют фагоцитоз и систему комплемента.

**IgE.** Представляет мономер, в сыворотке крови находится в низких концентрациях. Основная роль- своими Fc- фрагментами прикрепляется к тучным клеткам (мастоцитам) и базофилам и опосредует *реакции гиперчувствительности немедленного типа*. К IgE относятся “антитела аллергии”- *реагины*. Уровень IgE повышается при аллергических состояниях, гельминтозах. Антигенсвязывающие Fab- фрагменты молекулы IgE специфически взаимодействует с антигеном (аллергеном), сформировавшийся иммунный комплекс

взаимодействует с рецепторами Fc- фрагментов IgE, встроенных в клеточную мембрану базофила или тучной клетки. Это является сигналом для выделения гистамина, других биологически активных веществ и развертывания острой аллергической реакции.

**IgD.** Мономеры IgD обнаруживают на поверхности развивающихся В- лимфоцитов, в сыворотке находятся в крайне низких концентрациях. Их биологическая роль точно не установлена. Полагают, что IgD участвуют в дифференциации В-клеток, способствуют развитию антиидиотипического ответа, участвуют в аутоиммунных процессах.

С целью определения концентраций иммуноглобулинов отдельных классов применяют несколько методов, чаще используют *метод радиальной иммунодиффузии в геле (по Манчини)*- разновидность реакции преципитации и ИФА.

Определение антител различных классов имеет важное значение для диагностики инфекционных заболеваний. Обнаружение антител к антигенам микроорганизмов в сыворотках крови- важный критерий при постановке диагноза- *серологический метод диагностики*. Антитела класса IgM появляются в остром периоде заболевания и относительно быстро исчезают, антитела класса IgG выявляются в более поздние сроки и более длительно (иногда- годами) сохраняются в сыворотках крови переболевших, их в этом случае называют анамнестическими антителами.

Выделяют понятия: *титр антител, диагностический титр, исследования парных сывороток*. Наибольшее значение имеет выявление IgM- антител и четырехкратное повышение титров антител (или *сероконверсия*- антитела выявляют во второй пробе при отрицательных результатах с первой сывороткой крови) при исследовании *парных*- взятых в динамике инфекционного процесса с интервалом в несколько дней- недель проб.

Реакции взаимодействия антител с возбудителями и их антигенами (*реакция “антиген- антитело”*) проявляется в виде ряда феноменов- *агглютинации, преципитации, нейтрализации, лизиса, связывания комплемента, опсонизации, цитотоксичности* и могут быть выявлены различными **серологическими реакциями**.

Динамика выработки антител. Первичный и вторичный иммунный ответ.

Первичный ответ- при первичном контакте с возбудителем (антигеном), вторичный- при повторном контакте. Основные отличия:

- продолжительность скрытого периода (больше- при первичном);
- скорость нарастания антител (быстрее- при вторичном);
- количество синтезируемых антител (больше- при повторном контакте);
- последовательность синтеза антител различных классов (при первичном более длительно преобладают IgM, при вторичном- быстро синтезируются и преобладают IgG- ан-

титела).

Вторичный иммунный ответ обусловлен формированием *клеток иммунной памяти*.

Пример вторичного иммунного ответа- встреча с возбудителем после вакцинации.

#### Роль антител в формировании иммунитета.

Антитела имеют важное значение в формировании *приобретенного постинфекционного и поствакцинального иммунитета*.

1. Связываясь с токсинами, антитела нейтрализуют их, обеспечивая *антитоксический иммунитет*.

2. Блокируя рецепторы вирусов, антитела препятствуют адсорбции вирусов на клетках, участвуют в противовирусном иммунитете.

3. Комплекс антиген- антитело запускает классический путь активации комплемента с его эффекторными функциями (лизис бактерий, опсонизация, воспаление, стимуляция макрофагов).

4. Антитела принимают участие в опсонизации бактерий, способствуя более эффективному фагоцитозу.

5. Антитела способствуют выведению из организма (с мочой, желчью) растворимых антигенов в виде циркулирующих иммунных комплексов.

IgG принадлежит наибольшая роль в антитоксическом иммунитете, IgM- в антимикробном иммунитете (фагоцитоз корпускулярных антигенов), особенно в отношении грамотрицательных бактерий, IgA- в противовирусном иммунитете (нейтрализация вирусов), IgAs- в местном иммунитете слизистых оболочек, IgE- в реакциях гиперчувствительности немедленного типа.

### **Лекция № 13. Т- и В- лимфоциты. Рецепторы, субпопуляции. Кооперация клеток в иммунном ответе.**

К клеткам иммунной системы относят *лимфоциты, макрофаги и другие антиген-представляющие клетки* (А- клетки, от англ. accessory- вспомогательный), а также так называемую *третью популяцию клеток* (т.е. клеток, не имеющих основных поверхностных маркеров Т- и В- лимфоцитов, А- клеток).

По функциональным свойствам все иммунокомпетентные клетки разделяют на *эффекторные и регуляторные*. Взаимодействие клеток в иммунном ответе осуществляется с помощью гуморальных медиаторов - **цитокинов**. Основные клетки иммунной системы- Т- и В- лимфоциты.

#### Лимфоциты.

В организме лимфоциты постоянно рециркулируют между зонами скопления лимфоидной ткани. Расположение лимфоцитов в лимфоидных органах и их миграция по кровеносному и лимфатическому руслу строго упорядочены и связаны с функциями различных субпопуляций.

Лимфоциты имеют общую морфологическую характеристику, однако их функции, поверхностные CD (от cluster differentiation) маркеры, индивидуальное (клональное) происхождение, различны.

По наличию поверхностных CD маркеров лимфоциты разделяют на функционально различные популяции и субпопуляции, прежде всего на **Т-** (*тимусзависимые*, прошедшие первичную дифференцировку в тимусе) лимфоциты и **В** - ( *bursa- зависимые*, прошедшие созревание в сумке Фабрициуса у птиц или его аналогах у млекопитающих) лимфоциты.

#### Т- лимфоциты.

##### *Локализация.*

Обычно локализуются в так называемых Т- зависимых зонах периферических лимфоидных органов (периартикулярно в белой пульпе селезенки и паракортикальных зонах лимфоузлов).

##### *Функции.*

Т- лимфоциты распознают процессированный и представленный на поверхности антиген- представляющих ( А ) клеток антиген. Они отвечают за *клеточный иммунитет*, иммунные реакции клеточного типа. Отдельные субпопуляции помогают В- лимфоцитам реагировать на *Т- зависимые антигены* выработкой антител.

##### *Происхождение и созревание.*

Родоначалницей всех клеток крови, в том числе лимфоцитов, является **единая**

**стволовая клетка костного мозга.** Она генерирует два типа клеток- предшественников- лимфоидную стволовую клетку и предшественника клеток красной крови, от которой происходят и клетки- предшественники лейкоцитов и макрофагов.

Образование и созревание иммунокомпетентных клеток осуществляется в центральных органах иммунитета (для Т- лимфоцитов- в тимусе). Клетки- предшественники Т- лимфоцитов попадают в тимус, где пре- Т- клетки (тимоциты) созревают, пролиферируют и проходят дифференцировку на отдельные субклассы в результате взаимодействия с эпителиальными и дендритными клетками стромы и воздействия гормоноподобных полипептидных факторов, секретируемых эпителиальными клетками тимуса ( альфа1- тимозин, тимопоэтин, тимулин и др.).

При дифференцировке Т- лимфоциты приобретают *определенный набор мембранных CD- маркеров*. Т-клетки разделяют на субпопуляции в соответствии с их функцией и профилем CD- маркеров.

Т- лимфоциты распознают антигены с помощью двух типов мембранных гликопротеинов- Т- клеточных рецепторов (семейство Ig- подобных молекул) и CD3, нековалентно связанных между собой. Их рецепторы, в отличие от антител и рецепторов В- лимфоцитов, не распознают свободно циркулирующие антигены. Они распознают пептидные фрагменты, представляемые им А- клетками через комплекс чужеродных веществ с соответствующим белком главной системы гистосовместимости 1 и 2 класса.

Выделяют три основные группы Т- лимфоцитов- помощники (активаторы), эффекторы, регуляторы.

Первая группа- помощники (активаторы), в состав которых входят *Т- хелперы1, Т- хелперы2, индукторы Т- хелперов, индукторы Т- супрессоров.*

1. *Т- хелперы1* несут рецепторы CD4 (как и Т- хелперы2) и CD44, отвечают за созревание *Т- цитотоксических лимфоцитов (Т- киллеров)*, активируют Т- хелперы2 и цитотоксическую функцию макрофагов, секретируют ИЛ-2, ИЛ-3 и другие цитокины.

2. *Т- хелперы2* имеют общий для хелперов CD4 и специфический CD28 рецепторы, обеспечивают пролиферацию и дифференцировку В- лимфоцитов в антителпродуцирующие (плазматические) клетки, синтез антител, тормозят функцию Т- хелперов1, секретируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-6.

3. *Индукторы Т- хелперов* несут CD29, отвечают за экспрессию антигенов HLA класса 2 на макрофагах и других А- клетках.

4. *Индукторы Т- супрессоров* несут CD45 специфический рецептор, отвечают за секрецию ИЛ-1 макрофагами, активацию дифференцировки предшественников Т- супрессо-

ров.

Вторая группа- Т- эффекторы. В нее входит только одна субпопуляция.

5. *Т- цитотоксические лимфоциты (Т- киллеры).* Имеют специфический рецептор CD8, лизируют клетки- мишени, несущие чужеродные антигены или измененные аутоантигены (трансплантат, опухоль, вирус и др.). ЦТЛ распознают чужеродный эпитоп вирусного или опухолевого антигена в комплексе с молекулой класса I HLA в плазматической мембране клетки- мишени.

Третья группа- Т-клетки- регуляторы. Представлена двумя основными субпопуляциями.

6. *Т- супрессоры* имеют важное значение в регуляции иммунитета, обеспечивая подавление функций Т- хелперов 1 и 2, В- лимфоцитов. Имеют рецепторы CD11, CD8. Группа функционально разнородна. Их активация происходит в результате непосредственной стимуляции антигеном без существенного участия главной системы гистосовместимости.

7. *Т- контрсупрессоры.* Не имеют CD4, CD8, имеют рецептор к особому *лейкину*. Способствуют подавлению функций Т- супрессоров, вырабатывают резистентность Т- хелперов к эффекту Т- супрессоров.

### **В- лимфоциты.**

Существует несколько подтипов В- лимфоцитов. Основная функция В- клеток- эффекторное участие в гуморальных иммунных реакциях, дифференциация в результате антигенной стимуляции в плазматические клетки, продуцирующие антитела.

Образование В- клеток у плода происходит в печени, в дальнейшем- в костном мозге. Процесс созревания В- клеток осуществляется в две стадии- *антиген - независимую и антиген - зависимую.*

*Антиген -независимая фаза.* В- лимфоцит в процессе созревания проходит стадию *пре- В- лимфоцита*- активно пролиферирующей клетки, имеющей цитоплазматические Н- цепи типа С мю (т.е. IgM). Следующая стадия- *незрелый В- лимфоцит* характеризуется появлением мембранного (рецепторного) IgM на поверхности. Конечная стадия антигеннезависимой дифференцировки- образование *зрелого В- лимфоцита*, который может иметь два мембранных рецептора с одинаковой антигенной специфичностью (изотипа) - IgM и IgD. Зрелые В- лимфоциты покидают костный мозг и заселяют селезенку, лимфоузлы и другие скопления лимфоидной ткани, где их развитие задерживается до встречи со “своим” антигеном, т.е. до осуществления антиген- зависимой дифференцировки.

*Антиген- зависимая дифференцировка* включает активацию, пролиферацию и диф-

ференцировку В- клеток в плазматические клетки и В- клетки памяти. Активация осуществляется различными путями, что зависит от свойств антигенов и участия других клеток (макрофагов, Т- хелперов). Большинство антигенов, индуцирующих синтез антител, для индукции иммунного ответа требуют участия Т- клеток- *тимус- зависимые антигены*. *Тимус- независимые антигены* (ЛПС, высокомолекулярные синтетические полимеры) способны стимулировать синтез антител без помощи Т- лимфоцитов.

В- лимфоцит с помощью своих иммуноглобулиновых рецепторов распознает и связывает антиген. Одновременно с В- клеткой антиген по представлению макрофага распознается Т- хелпером (Т- хелпером 2), который активируется и начинает синтезировать факторы роста и дифференцировки. Активированный этими факторами В- лимфоцит претерпевает ряд делений и одновременно дифференцируется в плазматические клетки, продуцирующие антитела.

Пути активации В- клеток и кооперации клеток в иммунном ответе на различные антигены и с участием популяций имеющих и не имеющих антиген Lyb5 популяций В- клеток отличаются. Активация В- лимфоцитов может осуществляться:

- Т- зависимым антигеном при участии белков МНС класса 2 Т- хелпера;
- Т- независимым антигеном, имеющим в составе митогенные компоненты;
- поликлональным активатором (ЛПС);
- анти- мю иммуноглобулинами;
- Т- независимым антигеном, не имеющим митогенного компонента.

#### Кооперация клеток в иммунном ответе.

В формировании иммунного ответа включаются все звенья иммунной системы- системы макрофагов, Т- и В- лимфоцитов, комплемента, интерферонов и главная система гистосовместимости.

В кратком виде можно выделить следующие этапы.

1. Поглощение и процессинг антигена макрофагом.
2. Представление процессированного антигена макрофагом с помощью белка главной системы гистосовместимости класса 2 Т- хелперам.
3. Узнавание антигена Т- хелперами и их активация.
4. Узнавание антигена и активация В- лимфоцитов.
5. Дифференциация В- лимфоцитов в плазматические клетки, синтез антител.
6. Взаимодействие антител с антигеном, активация систем комплемента и макрофагов, интерферонов.
7. Представление при участии белков МНС класса 1 чужеродных антигенов Т- кил-

лерам, разрушение инфицированных чужеродными антигенами клеток Т- киллерами.

8. Индукция Т- и В- клеток иммунной памяти, способных специфически распознать антиген и участвовать во вторичном иммунном ответе ( антигенстимулированные лимфоциты).

*Клетки иммунной памяти.* Поддержание долгоживущих и метаболически малоактивных клеток памяти, рециркулирующих в организме, является основой длительного сохранения приобретенного иммунитета. Состояние иммунной памяти обусловлено не только длительностью жизни Т- и В- клеток памяти, но и их антигенной стимуляцией. Длительное сохранение антигенов в организме обеспечивается дендритными клетками (депо антигенов), сохраняющими их на своей поверхности.

*Дендритные клетки* - популяции отростчатых клеток лимфоидной ткани костномозгового (моноцитарного) генеза, представляющая антигенные пептиды Т- лимфоцитам и сохраняющая антигены на своей поверхности. К ним относятся фолликулярные отростчатые клетки лимфоузлов и селезенки, клетки Лангерханса кожи и дыхательных путей, М-клетки лимфатических фолликулов пищеварительного тракта, дендритные эпителиальные клетки тимуса.

#### CD антигены.

Кластерная дифференциация поверхностных молекул (антигенов) клеток, прежде всего лейкоцитов, шагает далеко вперед. К настоящему времени CD антигены- не абстрактные маркеры, а функционально значимые для клетки рецепторы, домены и детерминанты, в том числе исходно не являющиеся специфическими для лейкоцитов.

Важнейшими дифференцировочными антигенами Т- лимфоцитов человека являются следующие.

1. CD2 - антиген, характерный для Т- лимфоцитов, тимоцитов, НК клеток. Он идентичен рецептору эритроцитов барана и обеспечивает образование розеток с ними (методика определения Т- клеток).

2. CD3 - необходимы для функционирования любых Т- клеточных рецепторов (ТКР). Молекулы CD3 имеют все субклассы Т- лимфоцитов. Взаимодействие ТКР- CD3 (она состоит из 5 субъединиц) с представляющей антиген молекулой МНС класса 1 или 2 определяет характер и реализацию иммунного ответа.

3. CD4. Эти рецепторы имеют Т- хелперы 1 и 2 и Т- индукторы. Являются корцептором (местом связывания) детерминант белковых молекул МНС класса 2. Является специфическим рецептором для оболочечных белков вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 (gp120) и ВИЧ- 2.

4. CD8. Популяция CD8<sup>+</sup> Т- лимфоцитов включает цитотоксические и супрессорные клетки. При контакте с клеткой- мишенью CD8 выступает в роли корцептора для белков HLA класса 1.

#### Дифференцировочные рецепторы В- лимфоцитов.

На поверхности В- лимфоцитов может находиться до 150 тысяч рецепторов, среди которых описано более 40 типов с различными функциями. Среди них - рецепторы к Fc- компоненту иммуноглобулинов, к С3 компоненту комплемента, антигенспецифические Ig рецепторы, рецепторы к различным факторам роста и дифференцировки.

#### Краткая характеристика методов оценки Т- и В- лимфоцитов.

Для выявления В- лимфоцитов используют метод розеткообразования с эритроцитами, обработанными антителами и комплементом (ЕАС- РОК), спонтанного розеткообразования с эритроцитами мыши, метод флюоресцирующих антител с моноклональными антителами (МКА) к рецепторам В- клеток (CD78, CD79a,b, мембранные Ig).

Для количественной оценки Т- лимфоцитов используют метод спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е- РОК), для выявления субпопуляций ( например, Т- хелперов и Т- супрессоров) - иммунофлюоресцентный метод с МКА к CD рецепторам, для определения Т- киллеров- тесты цитотоксичности.

Функциональную активность Т- и В- клеток можно оценить в реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) на различные Т- и В- митогены.

Сенсибилизированные Т- лимфоциты, участвующие в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) можно определить по выделению одного из цитокинов - MIF (миграцию ингибирующего фактора) в реакции торможения миграции лейкоцитов (лимфоцитов) - РТМЛ. *Подробнее о методах оценки иммунной системы- в лекциях по клинической иммунологии.*

Одной из особенностей иммунокомпетентных клеток, особенно Т- лимфоцитов, является способность продуцировать большое количество растворимых веществ - **цитокинов (интерлейкинов)**, осуществляющих регуляторные функции. Они обеспечивают согласованную работу всех систем и факторов иммунной системы, благодаря прямым и обратным связям между различными системами и субпопуляциями клеток обеспечивают устойчивую саморегуляцию иммунной системы. Их определение дает дополнительное представление о состоянии иммунной системы.

В целом гомеостаз организма обеспечивается согласованной работой (взаимодействием) иммунной, эндокринной и нервной систем.

## **Лекция № 14. Аллергия. ГНТ, ГЗТ. Особенности развития, методы диагностики. Иммунологическая толерантность.**

**Аллергические заболевания** широко распространены, что связано с рядом отягчающих факторов - ухудшением экологической обстановки и широким распространением *аллергенов*, усилением антигенного давления на организм (в том числе- вакцинация), искусственным вскармливанием, наследственной предрасположенностью.

*Аллергия* ( allos + ergon, в переводе- другое действие) - *состояние патологически повышенной чувствительности организма к повторному введению антигена*. Антигены, вызывающие аллергические состояния, называют аллергенами. Аллергическими свойствами обладают различные чужеродные растительные и животные белки, а также гаптены в комплексе с белковым носителем.

*Аллергические реакции* - иммунопатологические реакции, связанные с высокой активностью клеточных и гуморальных факторов иммунной системы (иммунологической гиперреактивностью). Иммунные механизмы, обеспечивающие защиту организма, могут приводить к *повреждению тканей, реализуясь в виде реакций гиперчувствительности*.

Классификация Джелла и Кумбса выделяет 4 основных типа гиперчувствительности в зависимости от преобладающих механизмов, участвующих в их реализации.

По скорости проявления и механизму аллергические реакции можно разделить на две группы - *аллергические реакции (или гиперчувствительность) немедленного типа (ГНТ) и замедленного типа (ГЗТ)*.

Аллергические реакции гуморального (немедленного) типа обусловлены главным образом функцией антител классов IgG и особенно IgE (реагинов). В них принимают участие тучные клетки, эозинофилы, базофилы, тромбоциты. ГНТ делят на три типа. По классификации Джелла и Кумбса к ГНТ относятся реакции гиперчувствительности 1, 2 и 3 типов, т.е. анафилактическая (атопическая), цитотоксическая и иммунных комплексов.

ГНТ характеризуется быстрым развитием после контакта с аллергеном (минуты), в ней участвуют антитела.

Тип 1. *Анафилактические реакции* - немедленного типа, atopические, реагиновые. Они вызываются взаимодействием поступающих извне аллергенов с антителами класса IgE, фиксированными на поверхности тучных клеток и базофилов. Реакция сопровождается активацией и дегрануляцией клеток- мишеней с высвобождением медиаторов аллергии (главным образом гистамина). Примеры реакций типа 1 - анафилактический шок, atopическая бронхиальная астма, поллиноз.

Тип 2. *Цитотоксические реакции*. В них участвуют цитотоксические антитела (IgM

и IgG), которые связывают антиген на поверхности клеток, активируют систему комплемента и фагоцитоз, приводят к развитию антитело-зависимого клеточно-опосредованного цитолиза и повреждения тканей. Пример- аутоиммунная гемолитическая анемия.

Тип 3. *Реакции иммунных комплексов*. Комплексы антиген-антитела откладываются в тканях (*фиксированные иммунные комплексы*), активируют систему комплемента, привлекают к месту фиксации иммунных комплексов полиморфноядерные лейкоциты, приводят к развитию воспалительной реакции. Примеры- острый гломерулонефрит, феномен Артюса.

Гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) - клеточно-опосредованная гиперчувствительность или гиперчувствительность типа 4, связанная с наличием *сенсibilизированных лимфоцитов*. Эффекторными клетками являются **Т-клетки ГЗТ**, имеющие CD4 рецепторы в отличие от CD8+ цитотоксических лимфоцитов. Сенсibilизацию Т-клеток ГЗТ могут вызывать агенты контактной аллергии (гаптены), антигены бактерий, вирусов, грибов, простейших. Близкие механизмы в организме вызывают антигены опухолей в противоопухолевом иммунитете, генетически чужеродные антигены донора-при трансплантационном иммунитете.

Т-клетки ГЗТ распознают чужеродные антигены и секретируют гамма-интерферон и различные лимфокины, стимулируя цитотоксичность макрофагов, усиливая Т- и В-иммунный ответ, вызывая возникновение воспалительного процесса.

Исторически ГЗТ выявлялась в кожных аллергических пробах (с туберкулином-туберкулиновая проба), выявляемых через 24 - 48 часов после внутрикожного введения антигена. Развитием ГЗТ на вводимый антиген отвечают только организмы с предшествующей сенсibilизацией этим антигеном.

Классический пример инфекционной ГЗТ - образование *инфекционной гранулемы* (при бруцеллезе, туберкулезе, брюшном тифе и др.). Гистологически ГЗТ характеризуется инфильтрацией очага вначале нейтрофилами, затем лимфоцитами и макрофагами. Сенсibilизированные Т-клетки ГЗТ распознают гомологичные эпитопы, представленные на мембране дендритных клеток, а также секретируют медиаторы, активирующие макрофаги и привлекающие в очаг другие клетки воспаления. Активированные макрофаги и другие участвующие в ГЗТ клетки выделяют ряд биологически активных веществ, вызывающих воспаление и уничтожающих бактерии, опухолевые и другие чужеродные клетки - *цитокины* (ИЛ-1, ИЛ-6, альфа-фактор некроза опухолей), активные метаболиты кислорода, протеазы, лизоцим и лактоферрин.

Методы лабораторной диагностики аллергии : выявление уровня сывороточных IgE,

фиксированных на базофилах и тучных клетках антител класса Е (реагинов), циркулирующих и фиксированных (тканевых) иммунных комплексов, провокационные и кожные пробы с предполагаемыми аллергенами, выявление сенсibilизированных клеток тестами *in vitro* - реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ), реакция торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ), цитотоксические тесты.

#### Иммунологическая толерантность.

*Иммунологическая толерантность* - специфическое подавление иммунного ответа, вызванное предварительным введением антигена. Иммунологическая толерантность как форма иммунного ответа специфична.

Толерантность может проявляться в подавлении синтеза антител и гиперчувствительности замедленного типа (специфического гуморального и клеточного ответа) или отдельных видов и типов иммунного ответа. Толерантность может быть полной (нет иммунного ответа) или частичной (существенное снижение ответа).

Если на введение антигена организм отвечает подавлением только отдельных компонентов иммунного ответа, то это - *иммунологическое отклонение (расщепленная толерантность)*. Наиболее часто выявляется специфическая ареактивность Т- клеток (обычно Т- хелперов) при сохранении функциональной активности В- клеток.

*Естественная иммунологическая толерантность* - иммунологическая ареактивность к собственным антигенам (аутоиммунная толерантность) возникает в эмбриональном периоде. Она предотвращает выработку антител и Т- лимфоцитов, способных разрушать собственные ткани.

*Приобретенная иммунологическая толерантность* - отсутствие специфической иммунной реакции к чужеродному антигену.

*Иммунологическая толерантность представляет особую форму иммунного ответа, характеризующуюся запретом, налагаемым Т- и В- супрессорами на образование клеток- эффекторов против данного, в том числе собственного, антигена (А.И.Коротяев, С.А.Бабичев, 1998).*

В основе индуцированной иммунологической толерантности лежат различные механизмы, среди которых принято выделять *центральные и периферические*.

*Центральные механизмы* связаны с непосредственным воздействием на иммунокомпетентные клетки. Основные механизмы:

- элиминация антигеном иммунокомпетентных клеток в тимусе и костном мозге (Т- и В- клеток соответственно);
- повышение активности супрессорных Т- и В- клеток, недостаточность контрсупрессорных Т- и В- клеток;

прессоров;

- блокада эффекторных клеток;
- дефектность презентации антигенов, дисбаланс процессов пролиферации и дифференциации, кооперации клеток в иммунном ответе.

*Периферические механизмы* связаны с перегрузкой (истощением) иммунной системы антигеном, пассивным введением высокоаффинных антител, действием антиидиотипических антител, блокадой рецепторов антигеном, комплексом “антиген- антитела”, антиидиопатическими антителами.

Исторически *иммунологическую толерантность рассматривают как защиту против аутоиммунных заболеваний*. При нарушении толерантности к собственным антигенам могут развиваться аутоиммунные реакции, в том числе возникать такие аутоиммунные заболевания как ревматоидный артрит, системная красная волчанка и другие.

#### Основные механизмы отмены толерантности и развития аутоиммунных реакций

1. Изменения химической структуры аутоантигенов (например- изменение нормальной структуры антигенов клеточных мембран при вирусных инфекциях, появление ожоговых антигенов).
2. Отмена толерантности на перекрестно- реагирующие антигены микроорганизмов и эпитопы аутоантигена.
3. Появление новых антигенных детерминант в результате связывания чужеродных антигенных детерминант с клетками хозяина.
4. Нарушение гисто- гематических барьеров.
5. Действие суперантигенов.
6. Нарушения регуляции иммунной системы ( уменьшение количества или функциональная недостаточность супрессирующих лимфоцитов, экспрессия молекул МНС класса 2 на клетках, в норме их не экспрессирующих- тиреоциты при аутоиммунном тиреоидите).

## **Лекция № 15. Иммунный статус макроорганизма. Методы оценки.**

Состояние иммунной системы имеет важнейшее значение в обеспечении гомеостаза организма, защите от всего генетически чужеродного.

Иммунный статус определяет эффективность и согласованность работы всех систем и звеньев иммунитета - макрофагов, комплемента, интерферонов, Т- и В- лимфоцитов, главной системы гистосовместимости. Раздел медицины, изучающий патологию человека в аспекте нарушений функций иммунной системы, называется *клинической иммунологией*.

Для постановки диагноза иммунопатологического состояния проводят сбор иммунологического анамнеза и постановку иммунологических тестов. Могут также осуществляться тесты *in vivo* (кожные тесты), ретгенологическое исследование лимфоидных органов (тимуса).

При опросе определяют наиболее вероятный *иммунопатологический синдром*, среди которых основными являются шесть:

- инфекционный синдром;
- аллергический синдром;
- аутоиммунный синдром;
- первичный иммунодефицит;
- вторичный иммунодефицит;
- иммунопролиферативный синдром.

Для оценки *общего иммунного статуса* используют наиболее простые и достоверные показатели, отражающие суммарную эффективность работы всех систем иммунитета, для изучения *уязвимого звена* - специфичные для каждой системы дифференциальные тесты. Следовательно, изучение иммунного статуса проводится не менее чем в два этапа. Р.П.Петров с соавторами в 1984г. создали двухэтапный подход к оценке иммунного статуса, в соответствии с которым лабораторные иммунологические тесты разделены на тесты *первого и второго уровня*.

*На первом этапе* с помощью простых *ориентировочных методов* выявляют “грубые” дефекты фагоцитоза, клеточного и гуморального иммунитета. К тестам первого уровня относят :

- определение абсолютного и относительного содержания лимфоцитов в периферической крови;
- определение количества Т- и В- лимфоцитов;
- определение уровня иммуноглобулинов основных классов (IgG, IgM, IgA);
- определение фагоцитарной активности лейкоцитов;

- определение титра комплемента (не обязательно).

С учетом анализа результатов тестов 1 уровня определяют дальнейшую тактику иммунологического исследования.

Более тщательный и глубокий анализ состояния иммунной системы проводят с помощью тестов второго уровня - аналитических методов. К ним можно отнести методы оценки функциональной активности Т- и В- лимфоцитов, фагоцитов, вспомогательных клеток, естественных киллеров, компонентов системы комплемента и многих других.

Методы исследования главных компонентов иммунной системы принято делить также на *скрининговые и развернутые*.

*При оценке В- системы иммунитета* к скрининговым тестам относятся : определение количества CD19+ и CD20+ клеток, IgG, IgM и IgA, а также IgG1,2,3,4, к развернутым- бласттрансформацию на митоген лаконоса и S.aureus, поверхностных маркеров В-лимфоцитов.

*При оценке Т- системы иммунитета* к скрининговым методам можно отнести кожные тесты на бактериальные антигены, определение поверхностных маркеров Т- лимфоцитов CD3, CD4, CD8, бласттрансформацию на фитогемагглютинин, к развернутым- изучение продукции цитокинов, активационных маркеров, Т- клеточных рецепторов.

*При оценке фагоцитоза* к скрининговым тестам относят определение количества нейтрофилов, изучение их морфологии и образования активных форм кислорода, к развернутым- определение киллинга микробов, лизосомальных ферментов, цитокинов.

Существующие методы оценки иммунного статуса постоянно совершенствуются, однако есть ряд общих правил, которых необходимо придерживаться при оценке *иммунограмм* :

- комплексный анализ, а не оценка одного показателя;
- анализ в комплексе с клиническими и анамнестическими данными;
- оценка резких сдвигов показателей (не менее 20% от нормы);
- анализ в динамике;
- анализ не только (и не столько) абсолютных данных, а соотношений показателей (особо- индекс Th/Ts);
- учет возможных индивидуальных особенностей (возраст, сопутствующие заболевания) и колебаний показателей (физиологических и патологических- прием пищи, физические нагрузки, время суток, действие стрессоров и т.д.);
- учет региональных норм;
- учет материально- технической базы лаборатории. На вооружении современной

лаборатории- проточные цитометры и другое оборудование, которое позволяет наиболее точно и подробно определить иммунный статус (лазерная проточная цитофлюориметрия).

Методы исследования лимфоцитов можно разделить на *изучение поверхностных маркеров и функциональные тесты*.

*Изучение поверхностных СД антигенов* основывается на :

- методах розеткообразования;
- методах иммунофлюоресценции;
- иммуноферментном анализе.

Для определения *количества Т- клеток* чаще используют метод розеткообразования с эритроцитами барана. Метод основан на родстве рецептора CD2 с белками мембраны эритроцитов барана. При смешивании лимфоцитов с эритроцитами барана образуются фигуры в виде розеток. Количество розеткообразующих клеток (Е- РОК) соответствует количеству Т- лимфоцитов (CD2+ клеток).

Для определения *количества В- клеток* используют ЕАС- розетки. Лимфоциты смешивают с эритроцитами быка, обработанными комплементом и антителами к эритроцитам.

Важнейшее значение имеет вычисление индекса CD4/CD8 (хелперно- супрессорного отношения). Необходимо учитывать, что нет единого метода для оценки Т- хелперов и Т- супрессоров.

CD8+ несут Т- супрессоры и Т- киллеры, часть NK- клеток.

CD4+ несут Т- хелперы и Т- индукторы, моноциты, эффекторы- Т- клетки ГЗТ.

Поэтому оценку Ts и Th осуществляют также в теофиллиновом тесте. Т- супрессоры в присутствии теофиллина теряют способность к Е- розеткообразованию (теофиллин-чувствительные Т- лимфоциты), Т- хелперы теофиллин- резистентны. Оценивают также субпопуляции Т- лимфоцитов с рецепторами для Fc фрагмента : IgM (Т мю) и IgG (Т гамма). Т- гамма это преимущественно хелперы, Т мю - супрессоры.

*К функциональным тестам* относят методы оценки пролиферативной активности лимфоцитов на Т- и В- митогены (РБТЛ- реакция бластной трансформации лимфоцитов), продукции антител, синтеза мононуклеарами *цитокинов (особо!)*.

## **Лекция № 16. Иммунодефициты.**

Иммунная система обладает особыми физиологическими механизмами функционирования (распознавание антигена, активация иммунокомпетентных клеток, их пролиферация, дифференцировка и иммунорегуляция). Если в одном или нескольких звеньях иммунной системы возникают дефекты, это приводит к иммунодефицитным состояниям.

По происхождению различают *первичные (генетически обусловленные)* и *вторичные* (возникающие в связи с инфекциями, инвазиями, опухолями, старением, ожогами, травмами и др.) иммунодефициты.

В зависимости от уровня дефекта выделяют :

- иммунодефициты, обусловленные преимущественным поражением В- звена;
- иммунодефициты, обусловленные преимущественным поражением Т- звена;
- комбинированные иммунодефициты.

Различают также *гуморальные* (самые частые), *клеточные* и *клеточно- гуморальные* иммунодефициты.

Дефицит лимфоцитов, макрофагов, плазматиков, гранулоцитов - это *клеточная форма иммунодефицита*. Дефицит иммуноглобулинов (антител) - это гуморальный иммунодефицит.

### **Первичные (врожденные) иммунодефициты.**

В основе *первичных (врожденных) иммунодефицитов* - генетический дефект, который может реализоваться на разных стадиях развития иммунокомпетентных клеток - стволовой клетки, этапах дифференциации Т- и В- клеток, при созревании плазматических клеток. Спектр хромосомных дефектов иммунитета достаточно широк - мутации, нарушения транскрипции и трансляции, генетически детерминированные дефекты мембран клеток. Особое значение придается аномалиям короткого плеча X - хромосомы, с которыми связан механизм иммунорегуляции. С областью HLA-D сцеплены гены Ig (силы иммунного ответа) и Is (супрессии иммунного ответа). Около трети первичных иммунодефицитов сцеплены с полом и передаются по наследству.

Проблема врожденных иммунодефицитов- это преимущественно проблема педиатрии, только в последние десятилетия после разработки методов диагностики и лечения первичных иммунодефицитов стало возможным продлевать жизнь этим больным (проблема оппортунистических инфекций, опухолей и т.д.). Иммунодефициты могут быть связаны с нарушением любого из звеньев иммунитета (т.е. не только Т- и В- лимфоцитов, но и макрофагов, комплемента, главной системы гистосовместимости, интерлейкинов и др. *Наиболее часто выделяют иммунодефициты, обусловленные:*

- нарушениями гуморального звена иммунитета (гипо- и агаммаглобулинемии и др.;

- нарушениями функций тимуса и клеточного иммунитета;
- нарушениями в системе фагоцитоза;
- дефектами системы комплемента;
- тяжелыми комбинированными нарушениями.

Из числа первичных иммунодефицитов приведем наиболее яркие примеры.

1. *Болезнь Брутона* - наследственная, сцепленная с полом гипогаммаглобулинемия, обусловленная дефектом В- клеток. Болеют мальчики от клинически здоровой матери (рецессивный тип наследственности, сцепленный с полом). Не вырабатываются антитела против бактериальных инфекций, необходима защита иммуноглобулинами и антибиотиками.

2. *Швейцарская агаммаглобулинемия* - тяжелый комбинированный Т- и В- иммунодефицит, связанный с нарушениями на уровне стволовой клетки. Снижено количество Т-клеток и иммуноглобулинов основных классов. Наследование аутосомно-рецессивное (болеют и мальчики и девочки) или рецессивное, сцепленное с полом. Отмечается гипоплазия тимуса и лимфоузлов, экзантемы, желудочно-кишечные расстройства и пневмонии. Дети редко доживают до трех лет, лечение - пересадкой костного мозга.

3. Синдром Луи-Бар (атаксия-телеангиэктазия). Связан с дефектом тимуса и мутациями в 7 и 14 хромосомах. Уменьшено количество Т-клеток (преимущественно Т-хелперов) и В-клеток. Клинически - нарушение координации движений, дебильность, телеангиэктазии, инфекции дыхательных путей (отсутствие IgA), опухоли лимфоидной ткани.

4. Синдром третьего и четвертого глоточных мешков (синдром Ди Джорджи). Наблюдается аплазия тимуса и паращитовидных желез. Синтез иммуноглобулинов осуществляется нормально. Клеточный иммунитет отсутствует, что делает таких больных восприимчивыми к вирусным инфекциям и грибковым поражениям. Ранний признак болезни - тетания, обусловленная дефицитом кальция.

5. *Хронический гранулематоз* - заболевание, связанное с нарушениями лизосомальных ферментов. Фагоцитоз осуществляется, однако киллинг и переваривание микроорганизмов не происходит, отсутствует способность восстанавливать нитросиний тетразолий (НСТ). У больных выявляют рецидивирующие стафилококковые абсцессы, отиты и другие гнойно-воспалительные заболевания. Болезнь обусловлена наследственным X-сцепленным аутосомным дефектом кислородного взрыва в нейтрофилах и моноцитах (макрофагах).

*При всех формах первичных иммунодефицитов повышена частота злокачественных новообразований, особенно лимфоретикулярной системы. Опухоли иммунной системы*

подразделяются на В- клеточные, Т- клеточные и связанные с усиленной пролиферацией “нулевых” лимфоцитов (третьей популяции). Возникая в результате нарушения “надзорной” функции иммунитета, злокачественные опухоли сами становятся основой развития тяжелого вторичного иммунодефицита.

К общим проявлениям иммунодефицитов относятся:

- *инфекционный синдром* (гнойно- септические процессы связаны с нарушениями преимущественно гуморального иммунитета, оппортунистические вирусные, грибковые и протозойные заболевания - с дефектами клеточного иммунитета);

- *желудочно- кишечные расстройства* (нарушения всасывания, дефицит IgA, инфекции желудочно- кишечного тракта);

- *опухоли иммунной системы;*

- *аллергический и аутоиммунный синдромы* (атопии, аутоиммунные гемолитические анемии);

- *частое сочетание с пороками развития* (при врожденных иммунодефицитах);

- *гематологические изменения* (снижение количества лимфоцитов и нейтрофилов, эозинофилия, анемия, тромбоцитопения).

**Вторичные (приобретенные) иммунодефициты.**

*Вторичные или приобретенные иммунодефициты* возникают вследствие какого- либо тяжелого заболевания (т.е. как правило при ранее нормальном иммунном статусе). К основным причинам возникновения вторичных иммунодефицитов можно отнести следующие.

1. Паразитарные и протозойные болезни (описторхоз, малярия, шисто- и трипаносомозы, трихинеллез и др.).

2. Вирусные инфекции - наиболее крупная группа инфекционных агентов, вызывающих иммунодефициты:

- внутриутробные инфекции (цитомегаловирусная инфекция, краснуха);

- острые инфекции (корь, грипп, краснуха, паротит, ветряная оспа, вирусные гепатиты);

- персистирующие (гепатит В и С, герпес);

- инфекции иммунной системы (ВИЧ, ЦМВ, вирус Эпштейн - Барр).

3. Бактериальные инфекции (туберкулез, сифилис, лепра).

4. Хирургические вмешательства, травмы.

5. Ожоги.

6. Нарушения обмена веществ (сахарный диабет) и истощение (голодание).

7. Заболевания органов выделения (уремия).
8. Опухоли.
9. Хронические соматические заболевания.
10. Действие лекарств, экологических и производственных факторов, радиации.

Кратко дадим характеристику основных видов вторичных иммунодефицитов.

*Дефекты иммунного статуса при паразитарных и протозойных заболеваниях* связаны с рядом механизмов :

- угнетением функции макрофагов (малярия);
- выработкой лимфоцитотоксинов (описторхоз, трихинеллез);
- выработкой супрессивно действующих факторов (трипано- и шистосомозы);
- различными нарушениями иммунорегуляции.

*Имунодефициты при бактериальных инфекциях.* Часто наблюдается снижение Т-лимфоцитов и митогенной активности на фитогемагглютинин (ФГА)- лепра, туберкулез, сифилис, пневмококковые инфекции, коклюш, бруцеллез, скарлатина). При стрепто- и стафилококковых инфекциях подавление Т- звена иммунитета часто сочетается с повышением функции В- системы и формированием инфекционно- аллергических и аутоиммунных осложнений (заболеваний).

*Имунодефициты при вирусных инфекциях.* Многие вирусы вызывают резкое угнетение Т- звена иммунитета ( вирусы кори, краснухи, гриппа, паротита). При кори и гриппе это нарушение сочетается с дефектами фагоцитоза, что еще более угнетает противомикробную защиту и способствует присоединению бактериальных осложнений. Однако наиболее существенные нарушения иммунной системы вызывают вирусы, *непосредственно поражающие иммунную систему.*

1. *Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)* вызывает заболевание, которое называют “синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД)”. Этот вирус относится к ретровирусам и имеет тропизм к клеткам иммунной системы и некоторым другим клеткам, несущим CD4+ рецептор. CD4 является фактически рецептором для ВИЧ, благодаря которому РНК вируса попадает (инфицирует) клетки, формирует ДНК- копию, которая встраивается в ДНК (геном) клетки хозяина и получает возможность реплицироваться. Вирус оказывает на клетки цитопатический эффект, вызывая поражение Т- хелперов и других CD4+ клеток, снижение индекса CD4/CD8, глобальный дефект гуморального и клеточного иммунитета в сочетании с поликлональной активацией В- лимфоцитов, резкое ослабление противoinфекционной и противоопухолевой защиты. Парадокс- прогрессирование болезни (иммунодефицита) на фоне активного антительного ответа и ГЗТ на ВИЧ. На этом фоне присое-

диняются оппортунистические (СПИД- ассоциированные) вторичные инфекции и инвазии (ЦМВ, герпес, пневмоцистоз, токсоплазмоз, микоплазмоз и др.).

2. *Цитомегаловирус.* ЦМВ инфекция приводит к резкому снижению CD4+ Т- лимфоцитов и гиперактивности CD8+ Т- клеток, угнетению клеточного иммунитета. ЦМВ относится к семейству герпес- вирусов , часто вызывающих персистентные инфекции и развитие вторичных иммунодефицитов.

3. *Вирус Эпштейн- Барр* вызывает инфекционный мононуклеоз. Рецептором для этого вируса является CD21- рецептор, поэтому поражаются преимущественно В- клетки. Эти же рецепторы имеются на дендритных клетках лимфоидных фолликулов, цервикальном эпителии. CD21 рецептор является местом присоединения C3d- компонента комплекса. Присоединение к рецептору вируса Эпштейн- Барр вызывает экспрессию на мембране В- лимфоцитов особого антигена, распознаваемого CD8+ лимфоцитами как чужеродного. В результате В- клетки становятся мишенью для собственных Т- клеток. В крови определяется атипичный Т- лимфоцитоз, бласттрансформация В- клеток, выработка гетерофильных антител. Формируется сложный иммунодефицит с элементами аутоагрессии.

*Иммунодефициты при ожогах* усугубляют опасность инфекционных осложнений. В первые дни преобладает снижение иммуноглобулинов основных классов (особенно IgG). В дальнейшем действие ожоговых антигенов приводит к В- клеточной стимуляции. Отмечено снижение ряда показателей Т- клеточного иммунитета в результате действия ожоговых токсинов- CD3+ и CD4+ клеток, ингибируется фагоцитоз, снижается активность комплекса. Прогностически неблагоприятен дисбаланс соотношения CD4/CD8.

*Иммунодефициты, связанные с недостаточностью питания, голоданием, нарушениями обмена веществ.*

*При сахарном диабете* возникает предрасположенность к бактериальным инфекциям, связанная с нарушением функций лейкоцитов- хемотаксиса, адгезивных и бактерицидных свойств.

*Дефицит белка в организме* также повышает восприимчивость к инфекциям. Угнетается первичный иммунный ответ (синтез IgM), фагоцитарная активность клеток, митогенная активность (по данным РБТЛ с ФГА).

*Дефицит микроэлементов* существенно сказывается на иммунной системе. Дефицит железа ведет к снижению активности железосодержащих ферментов, Т- звена, уровня миелопероксидазы и АФК. Дефицит цинка ведет к гипофункции тимуса со снижением CD4+ Т- лимфоцитов, ответа на митогены, активности НК клеток, фагоцитарного звена. Дефицит лития ведет к недостаточности Т- лимфоцитов, особенно CD8+ клеток. Существ-

венно сказывается на иммунную систему дефицит меди, селена, кальция, магния. С дефицитом магния связаны нарушения синтеза антител, активации системы комплемента.

*Лекарственные иммунодефициты* связаны преимущественно с их иммунотоксическим действием. Достаточно часто отмечается активация Т- супрессоров, уменьшение количества В- клеток, снижение IgA. Существенное влияние на иммунный статус оказывают антибиотики, даже при коротких циклах применения, прежде всего - пенициллины, тетрациклины, стрептомицин, противотуберкулезные и антигрибковые препараты. Они вызывают :

- дефекты формирования первичного иммунного ответа (скорости образования клонов плазматических клеток и антителообразования);
- снижение противовирусной защиты;
- снижение цитотоксической активности Т- лимфоцитов;
- уменьшение фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов.

Около 70 тысяч химических соединений, связанных с *производственной деятельностью и нарушениями экологической обстановки* относятся к разряду токсических и оказывают разнообразное действие на иммунную систему.

Существенное влияние на иммунную систему оказывает *стресс*. Начальный период острого стресса характеризуется снижением противоопухолевого и противои инфекционного иммунитета, в дальнейшем могут присоединяться аутоиммунные и аллергические реакции. Хронический стресс неизбежно приводит к формированию вторичного иммунодефицита.

Существенно меняется иммунный статус *при старении*. Отмечается инволюция тимуса, снижается уровень тимического фактора. С возрастом снижается активность клеточного иммунитета, страдают этапы распознавания антигена, пролиферативная активность Т- клеток, изменяется CD4/CD8 индекс в сторону супрессорной активности, страдают надзорные функции противоопухолевой защиты.

В отличие от первичных иммунодефицитов, вторичные иммунодефициты в большинстве случаев не носят необратимого характера и функции иммунной системы могут восстанавливаться, если прекращается действие факторов, обусловивших иммунодефицит.

## **Лекция № 17. Основы иммунотерапии и иммунопрофилактики.**

*Иммунотерапия* - метод лечения, при котором осуществляется воздействие на иммунную систему : подавление иммунного ответа (иммуносупрессия), стимуляция ответа (иммуностимуляция), восстановление иммунодефицитов (иммунокоррекция). В прикладном, более узком смысле иммунотерапия использует специфические методы *серотерапии* (применение иммунных сывороток, иммуноглобулинов), *вакцинотерапии* (лечебные вакцины), *иммунокоррекции* (десенсибилизация и др.).

*Иммунопрофилактика* - способ предупреждения инфекционных заболеваний путем создания искусственного специфического иммунитета. Выделяют *вакцинопрофилактику* (создание активного иммунитета за счет вакцин, антигенов) и *серопрфилактику* (пассивный иммунитет за счет введения в организм специфических антител - иммуноглобулинов).

Основную роль в специфической профилактике инфекционных заболеваний имеет вакцинопрофилактика.

*Вариоляция* - ранее применявшийся способ защиты от натуральной оспы с помощью втирания в кожу небольшого количества заразного материала от выздоравливающих от оспы людей известен с незапамятных времен. В России одной из первых этой процедуре подверглась Екатерина II. Однако способ вариоляции был очень опасным.

*Вакцинация*. Вакцинацией человечество обязано Э.Дженнеру, который в 1796г. показал, что прививка коровьей оспы - *вакцинация* (vaccinum - с лат. коровий) эффективна для профилактики натуральной оспы. С тех пор препараты, используемые для создания специфического активного иммунитета, называют *вакцинами*.

Существует ряд типов вакцин - живые, убитые, компонентные и субъединичные, рекомбинантные, синтетические олигопептидные, антиидиотипические и др.

1. *Убитые (инактивированные) вакцины* - это вакцинные препараты, не содержащие живых микроорганизмов. Вакцины могут содержать цельные микробы (корпускулы) - вакцины против чумы, гриппа, полиомиелитная вакцина Солка, а также отдельные компоненты (полисахаридная пневмококковая вакцина) или иммунологически активные фракции (вакцина против вируса гепатита В).

Различают вакцины, содержащие антигены одного возбудителя (*моновалентные*) или нескольких возбудителей (*поливалентные*). Убитые вакцины как правило менее иммуногенны, чем живые, реактогенны, могут вызывать сенсibilизацию организма.

2. *Ослабленные (аттенуированные) вакцины*. Эти вакцины имеют некоторые преимущества перед убитыми. Они полностью сохраняют антигенный набор микроорганизма и обеспечивают более длительное состояние специфической невосприимчивости. Живые

вакцины применяют для профилактики полиомиелита, туляремии, бруцеллеза, кори, желтой лихорадки, эпидемического паротита. Недостатки - наличие не только нужных (протективных), но и вредных для организма антигенных комплексов ( в том числе перекрестно реагирующих с тканями человека), сенсibilизация организма, большая антигенная нагрузка на иммунную систему и др.

3. *Компонентные (субъединичные) вакцины* состоят из главных (мажорных) антигенных компонентов, способных обеспечить протективный иммунитет. Ими могут быть :

- *компоненты структур клетки* ( антигены клеточной стенки, H - и Vi - антигены, рибосомальные антигены);

- *анатоксины* - препараты, содержащие модифицированные химическим путем экзотоксины, лишенные токсических свойств, но сохранившие высокую антигенность и иммуногенность. Эти препараты обеспечивают выработку антитоксического иммунитета (антитоксических антител - антитоксинов). Наиболее широко используются дифтерийный и столбнячный анатоксины. АКДС - ассоциированная коклюшно- дифтерийно- столбнячная вакцина. Полученные химическим путем вакцинные препараты (пример- анатоксины, получаемые обработкой экзотоксинов формалином) называют *химическими вакцинами*;

- *конъюгированные вакцины*- комплекс малоиммуногенных полисахаридов и высокоиммуногенных анатоксинов- например, сочетание антигенов *Haemophilus influenzae* и обеспечивающего иммуногенность вакцины дифтерийного анатоксина;

- *субъединичные вакцины*. Вакцину против вируса гепатита В готовят из поверхностных белков (субъединиц) вирусных частиц (HBs антиген). В настоящее время эту вакцину получают на рекомбинантной основе- с помощью дрожжевых клеток с плазмидой, кодирующей HBs антиген.

4. *Рекомбинантные вакцины*. С помощью методов генной инженерии гены, контролирующие синтез наиболее значимых иммуногенных детерминант, встраивают в самореплицирующиеся генетические структуры (плазмиды, вирусы). Если носителем (вектором) является вирус осповакцины, то данная вакцина будет в организме индуцировать иммунитет не только против оспы, но и против того возбудителя, чей ген был встроен в его геном (если ген HBs антигена - против вируса гепатита В).

Если вектором является плазида, то при размножении рекомбинантного клона микроорганизма (дрожжей, например) нарабатывается необходимый антиген, который и используется в дальнейшем для производства вакцин.

5. *Синтетические олигопептидные вакцины*. Принципы их конструирования включают синтез пептидных последовательностей, образующих эпитопы, распознаваемые ней-

трализирующими антителами.

6. *Кассетные или экспозиционные вакцины.* В качестве носителя используют белковую структуру, на поверхности которой экспонируют (располагают) введенные химическим или генно- инженерным путем соответствующие определенные антигенные детерминанты. В качестве носителей при создании искусственных вакцин могут использовать синтетические полимеры- полиэлектролиты.

7. *Липосомальные вакцины.* Они представляют собой комплексы, состоящие из антигенов и липофильных носителей (пример- фосфолипиды). Иммуногенные липосомы более эффективно стимулируют выработку антител, пролиферацию Т- лимфоцитов и секрецию ими ИЛ- 2.

8. *Антиидиотипические вакцины.* Антиидиотипические антитела содержат “внутренний” специфический портрет антигенной детерминанты. Получают моноклональные антиидиотипические антитела, содержащие “внутренний образ” протективного антигена. Для оптимальных результатов (защиты в отношении возбудителя) необходимо иметь набор МКА против различных антигенных детерминант возбудителя.

В настоящее время в нашей стране производится 7 анатоксинов, около 20 противовирусных и более 20 антибактериальных вакцин. Часть из них является *ассоциированными* - т.е. содержащими антигены различных возбудителей, или одного, но в различных вариантах (корпускулярные и химические).

#### Иммуномодулирующая терапия.

Способы иммуномодуляции условно можно разделить на методы иммуностимуляции и иммунодепрессии.

Большинство иммунотропных препаратов подробно описано в фармацевтических справочниках. Однако при их применении необходимо придерживаться некоторых общих правил.

1. Решение о применении препаратов должно базироваться как на клинических проявлениях иммунодефицита, так и на данных лабораторных исследований.

2. Даже при положительном клиническом эффекте обязательно должно проводиться оценка иммунного статуса в динамике.

3. Необходимо строго придерживаться принятых схем и дозировок.

4. Результат действия может зависеть как от исходного состояния, так и от дозы препарата, т.е. на один и тот же препарат может быть как стимуляция, так и супрессия.

*Иммуностимуляторы.* Иммуностимулирующей активностью обладают препараты тимуса и их синтетические аналоги, левамизол (декарис), цитокины, препараты адаманта-

нового ряда, некоторые соли, природные соединения, полиэлектролиты.

К *стимуляторам Т- лимфоцитов* относятся тактивин, тималин, тимоген, тимоптин, вилозен, декарис, диуцифон, нуклеинат натрия, цинка ацетат, спленин, к *стимуляторам В- лимфоцитов* - лиелопид, продигиозан, пирогенал. *Стимуляторами фагоцитоза* являются нуклеинат натрия, метилурацил (последний стимулирует также Т- и В- лимфоциты). К *стимуляторам эндогенного интерферона* относят дибазол и арбинол. Для *заместительной терапии* применяют иммуноглобулин для внутривенного введения, пентаглобулин (препарат IgM).

Синтезирован ряд новых препаратов - различные цитокины, иммунофан, полиоксидоний.

Определенным иммуностимулирующим действием обладают *биогенные стимуляторы (адаптогены)*- экстракт алоэ, ФИБС, стекловидное тело, сок каланхоэ, препараты женьшеня, пантокрина, радиолы розовой, элеутерококка, чабреца, чаги.

#### *Иммунодепрессанты.*

К препаратам с противовоспалительным и иммунодепрессивным действием относятся глюкокортикоидные гормоны.

Большинство иммунодепрессантов является цитостатиками и часто применяются для химиотерапии злокачественных новообразований. Среди них выделяют антимаболиты, алкилирующие препараты, антибиотики, алкалоиды и ингибиторы ферментов.

*Антиметаболиты* чаще всего влияют на обмен нуклеиновых кислот. К антогонистам пурина относятся меркаптопурин и азатиоприн (имуран).

К *алкилирующим препаратам* относят циклофосфамид, хлорбутин. Основной их мишенью являются белки и нуклеиновые кислоты, с которыми они ковалентно связываются. Нарушаются процессы репликации и трансляции, нарушаются процессы митоза клеток.

*Антибиотики.* Многие антибиотики оказывают влияние на обмен ДНК и РНК. В наибольшей степени это относится к продуктам деятельности актиномицет- актиномицинам С и Д, а также продукту жизнедеятельности грибов *Trichoderma polysporium* - циклоспорину. Актиномицин Д тормозит деление клеток и ДНК- зависимый синтез РНК. Актиномицин С является алкилирующим препаратом. Циклоспорин является активным иммунодепрессантом, подавляющим клеточные иммунные реакции, в т.ч. реакции трансплантационного иммунитета, ГЗТ, Т- зависимое антителообразование. Механизм его действия связан с подавлением продукции Т- хелперами ИЛ- 2.

Применение иммунодепрессантов, особенно цитостатиков, вызывает много осложне-

ний, в том числе угнетение гемопоэза, снижение противоинфекционной и противоопухолевой защиты.

Несмотря на обширный спектр иммуномодуляторов (особенно иммуностимуляторов), подавляющее число из них на практике используется редко. Причины- недостаточная эффективность, побочные эффекты, токсичность, высокая стоимость, недостаточная изученность и др.

#### **Рекомендуемая литература.**

1. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология.- Санкт- Петербург : Специальная литература ,1998.
2. Медицинская микробиология / Под ред. В.И.Покровского, О.К.Поздеева.- М.: ГЭОТАР Медицина , 1999.
3. А.Н.Маянский Микробиология для врачей.- Нижний Новгород : изд - во НГМА, 1999.
4. Проблемы инфектологии / Под ред. С.В.Прозоровского.- М., 1991.
5. Клиническая иммунология / Под ред.Е.И.Соколова.- М., 1998.
6. Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Под ред. Л.Б. Борисова.- М., 1984.
7. Вирусология / Под ред. Б.Филсца, Д.Найпа.- М.,1989.
8. Ярилин А.А. Основы иммунологии.- М.: Медицина, 1999.
9. Галактионов В.Г. Иммунология .- М.: Изд-во МГУ, 1998.

Лекция №1. История развития микробиологии, вирусологии и иммунологии. Предмет, задачи, методы.	3
Лекция №2. Систематика и морфология микроорганизмов.	11
Лекция №3. Химическая структура, биохимические свойства, ферменты бактерий.	23
Лекция №4. Физиология и принципы культивирования микроорганизмов.	28
Лекция №5. Общая вирусология. Классификация, структура и особенности биологии вирусов. Бактериофаги.	33
Лекция №6. Генетика бактерий и вирусов.	39
Лекция №7. Медицинская биотехнология и генная инженерия. Микробиологические основы антимикробной профилактики и терапии.	44
Лекция №8. Экология микроорганизмов.	50
Лекция №9. Учение об инфекции.	55
Лекция №10. Иммунитет, виды и формы. Структура иммунной системы. Факторы неспецифической защиты.	60
Лекция №11. Антигены, основные свойства. Антигены гистосовместимости. Процессинг антигенов.	66
Лекция №12. Гуморальный иммунитет. Иммуноглобулины. Роль антител в иммунном ответе. Реакция “антиген- антитела”, ее применение.	71
Лекция №13. Т- и В- лимфоциты. Рецепторы, субпопуляции. Кооперация клеток в иммунном ответе.	77
Лекция №14. Аллергия. Гиперчувствительность немедленного и замедленного типа. Особенности развития, методы диагностики. Иммунологическая толерантность.	83
Лекция №15. Иммунный статус макроорганизма. Методы оценки.	87
Лекция №16. Иммунодефициты.	90
Лекция №17. Основы иммунотерапии и иммунопрофилактики.	96

