

ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ

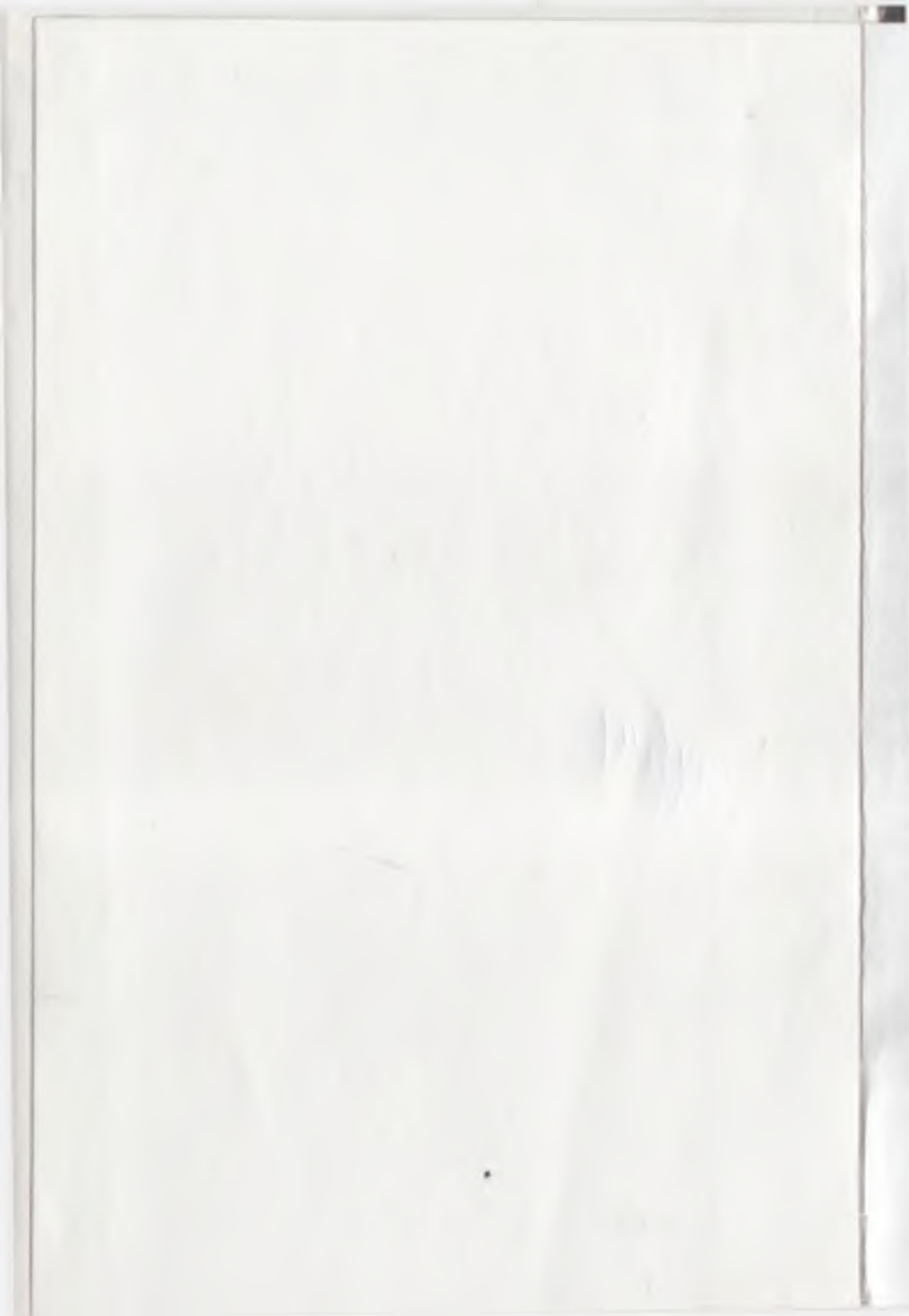
ВЕТЕРИНАРНАЯ
МЕДИЦИНА



ЛАНЬ

В. Г. СКОПИЧЕВ, Н. Н. МАКСИМЮК





В. Г. СКОПИЧЕВ, Н. Н. МАКСИМЮК

ФИЗИОЛОГО- БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ

РЕКОМЕНДОВАНО

Учебно-методическим объединением
высших учебных заведений Российской Федерации
по образованию в области зоотехнии
и ветеринарии в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по специальностям 110401 – Зоотехния
и 111201 – Ветеринария



ББК 48

С 44

Скопичев В. Г., Максимюк Н. Н.

С 44 Физиолого-биохимические основы резистентности животных: Учебное пособие. — СПб.: Издательство «Лань», 2009. — 352 с. — (Учебники для вузов. Специальная литература).

ISBN 978-5-8114-0934-1

Предлагаемая книга является первым междисциплинарным учебным пособием, максимально эффективно представляющим последние достижения физиологии и биохимии для того, чтобы обеспечить наиболее полное восприятие процессов жизнедеятельности организмов в ходе адаптации к экстремальным условиям. В книге приведены сведения по истории физиологических исследований, позволившие добиться существенных достижений в анализе механизмов естественной резистентности. Подробно рассматриваются особенности структуры иммунокомпетентных клеток, мембранных рецепторов, а также и внутриклеточные процессы реализации физиологических функций в норме, при патологии и в ходе реализации противoinфекционного действия. Особое внимание обращено на роль дефензинов при межклеточном взаимодействии, обеспечивающем высокую сопротивляемость инфекциям. Книга предназначена для студентов, последовательно изучающих физиологию, зоотехнику и технологию переработки сельскохозяйственной продукции.

ББК 48

Рецензенты:

Н. П. АЛЕКСЕЕВ — зав. лабораторией физиологии секреторных процессов ФНИИ им. А. А. Ухтомского Санкт-Петербургского государственного университета, лауреат Государственной премии РФ, доктор биологических наук, профессор и *Л. Ю. КАРПЕНКО* — профессор кафедры биохимии Санкт-Петербургской государственной Академии ветеринарной медицины, доктор биологических наук

Обложка

А. Ю. ЛАПШИН

*Охраняется Законом РФ об авторском праве.
Воспроизведение всей книги или любой ее части
запрещается без письменного разрешения издателя.*

*Любые попытки нарушения закона
будут преследоваться в судебном порядке.*

© Издательство «Лань», 2009
© В. Г. Скопичев, Н. Н. Максимюк, 2009
© Издательство «Лань»,
художественное оформление, 2009

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- α_2 М — α_2 -макроглобулин
 β -ГСВ — β -1,3-гликансвязывающий белок
АКТГ — адренокортикотропный гормон
АЛФ — аполактоферрин
АП — антибиотический пептид
АПК — антигенпредставляющая клетка
БПУ белок — бактерицидный проницаемостьувеличивающий белок
ГДФ — гуанозиндифосфат
ГТФ — гуанозинтрифосфат
ИЛ — интерлейкин
ИФН — интерферон
КДО — 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота
ЛПВП — липопротеиды высокой плотности
ЛПНП — липопротеиды низкой плотности
ЛПС — липополисахарид
ЛСВ — липополисахаридсвязывающий белок
ЛТК — липотейховые кислоты
ЛФ — лактоферрин
МО β ДГ — метил 4,6-О (1-карбоксииэтилиден)- β D-галактопиранозид
МПО — миелопероксидаза
МСЛ — маннозо(маннан)связывающий лектин
НАДФН — восстановленный никотинамиддениндинуклеотидфосфат
НГ — нейтрофильные гранулоциты
ПАМП — патогенассоциированные молекулярные паттерны
ПРР — паттернраспознающие рецепторы
ПРР(М) — паттернраспознающие рецепторы (молекулы)
ПФО — профенолоксидаза
ПФОАФ — профенолоксидазоактивирующий фермент
РЭС — ретикуло-эндотелиальная система
САП — сывороточный амилоид Р
СР — скавенджер-рецептор
СРВ — С-реактивный белок

- TLR — Толл-подобный рецептор
 TR — Толл-рецептор
 УРД — углеводраспознающий домен
 ФАД — флавинадениндинуклеотид
 ФНО α — фактор некроза опухолей α
 ФО — фенолоксидаза
 ХГБ — хроническая грануломатозная болезнь
 ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота
 ЭПО — эозинофильная пероксидаза
 ЯМР — ядерный магнитный резонанс
 Вас — bastenecin (бактеницин)
 ВCR — B cell receptors (рецепторы В-лимфоцитов)
 C3(H₂O) — активированная в водной среде форма C3-компонента комплемента
 CARD — caspase recruitment domain (каспазомобилизующий домен)
 Cif — Cecropia immune-responsiveness factor
 CpG — цитозин-фосфат-гуанин
 CR — complement receptor (рецептор комплемента)
 CRD — carbohydrate-recognition domain
 Dif — dorsal-related immunity factor
 Gal — gallinacin (галлинацин)
 GM-CSF — гранулоцит/моноцит колониестимулирующий фактор
 HBD — human beta-defensin (β -дефенсин человека)
 hCAP18 — human cationic antimicrobial protein 18 kD
 HNP — human neutrophil peptide (дефенсин человека)
 hsp — heat shock proteins (белки теплового шока)
 Ig — иммуноглобулин
 IKK — Inhibitory κ B kinase
 IL-18R — рецептор интерлейкина 18
 IL-1R — рецептор интерлейкина 1
 IRAK — IL-1 receptor-associated kinase
 ITAM — immunoreceptor tyrosine activation motif
 ITIM — immunoreceptor tyrosine inhibited motif
 κ B — ингибитор фактора NF κ B
 kD — константа диссоциации
 KLH — keyhole limpet hemocyanin
 LAP — lingual antimicrobial peptide
 LRP — low density lipoprotein receptor-related protein
 LRR — leucine-rich repeat
 MARCO — macrophage receptor with collagenous structure
 MASP — MBL associated serine proteinase
 mBD-1 — mouse beta-defensin 1 (β -дефенсин 1 мыши)
 MBL — mannose-binding lectin
 MHC — major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
 MIP-3 α — macrophage inflammatory protein — 3 α
 MyD88 — myeloid differentiation factor 88
 NACHT — domain present in neuronal apoptosis inhibitor protein — NAIP

- NALP — белки, включающие домены NACHT, LRR И PYD
 NBS — нуклеотид-связывающий сайт (nucleotide-binding site)
 NFκB — ядерный фактор (nuclear factor) транскрипции, ответственный за синтез легкой κ-цепи иммуноглобулинов в В-лимфоцитах
 NK-клетки — natural killers (естественные киллеры)
 NOD — нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен (nucleotide-binding oligomerization domain)
 PAMPs — pathogen-associated molecular patterns
 PG — protegrin (протегрин)
 pI — изоэлектрическая точка
 PLA2 — фосфолипаза A2
 PRRs — pattern recognition receptors
 PYD — pyrin domain
 RTD — θ-дефенсин макаки-резуса (rhesus theta-defensin)
 RT-PCR — reversed transcription polymerase chain reaction
 SOCS — супрессоры цитокиновой сигнализации (suppressors of cytokine signaling)
 SP-A — сурфактантный белок А
 SP-D — сурфактантный белок D
 SP-AI — скавенджер-рецептор AI
 SP-AII — скавенджер-рецептор AII
 SR-CLI — скавенджер-рецептор CLI
 TAP — trachel antimicrobial peptide
 TCR — T cell receptors (рецепторы Т-лимфоцитов)
 TIR — Toll/IL-1 Receptor homologous region
 TLR — Toll-like receptor
 TRAF6 — tumor necrosis factor reseptor-associated factor 6

ВВЕДЕНИЕ

Эволюция жизни на Земле привела к появлению большого разнообразия растительных и животных организмов, их популяций, хорошо приспособленных к условиям среды. В. И. Вернадский в 1944 г. указывал, что продолжавшаяся миллиарды лет биогеохимическая работа живого вещества в последние годы существенным образом изменилась. В биосфере, в которой биогеохимическая активность осуществлялась исторически складывавшейся в процессе эволюции совокупностью разных групп организмов, развивается ноосфера — сфера разума, в которой основным фактором, преобразующим живую в неживую природу, становится человек.

Производственная деятельность человека может оказывать мощное воздействие на живую природу, на биосферу в целом и на ее структурные единицы — биоеценозы. Человеком созданы искусственные биоеценозы с целью удовлетворения все возрастающих его потребностей в продуктах питания растительного и животного происхождения. Однако в его преобразующей деятельности имеют место непредвиденные негативные моменты, затрудняющие выполнение этой задачи. В результате интенсивного растениеводства человечество перешло к монокультурам — возделыванию одного вида растений на больших площадях, и этим не замедлили воспользоваться вредители сельского хозяйства, беспрепятственно расселяясь на всех растениях. К аналогичному результату люди пришли при концентрации на небольшой площади значительного количества животных: инфекционные агенты бактериального и вирусно-

го происхождения получили исключительно благоприятные условия для распространения.

Одним из объектов, на который направлена преобразовательная деятельность человека, является животный организм. Внешняя среда, окружающая организм животного, посылает ему различного рода раздражения, а также вызывает соответствующие изменения, нормализующие его существование. На неблагоприятные воздействия различных факторов организм отвечает выработкой специфических веществ и проявлением защитных функций. Часто в ответ на неблагоприятные факторы в нем возникает неспецифическая ответная реакция в виде адаптации к новым условиям существования.

Учение И. П. Павлова о единстве организма и среды требует признания ведущей роли факторов внешней среды как основной причины болезней. Поэтому изучение организма необходимо связывать с окружающей его средой, признавая наследование приобретенных им признаков и свойств.

В условиях растущей интенсификации животноводства возрастает роль профилактических мероприятий и ветеринарно-санитарной защиты сельскохозяйственных животных от болезней. Научно обоснованная профилактика является важным резервом повышения продуктивности животных и увеличения их сохранности. Возникновение болезней у животных в большинстве случаев связано с действием неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе и микроорганизмов. С другой стороны, большое значение имеет состояние устойчивости организма животного. Как правило, болезни инфекционного и неинфекционного характера возникают у животных с ослабленной резистентностью. Болезни, которые поражают животных, являются источником больших материальных потерь. Предупреждение болезней животных сохраняет поголовье и является важным резервом повышения продуктивности животных и рентабельности отрасли. Острота этой проблемы актуальна сейчас и потому, что в сельском хозяйстве имеется все большая тенденция к концентрации животных на ограниченных площадях — создание специализированных промышленных комплексов, в условиях которых животные имеют большой контакт между собой, и, следовательно, создается возможность быстрого

перезаражения. Содержание животных на крупных фермах значительно отличается от естественных условий их обитания — они лишены активных движений (прогулок), не подвергаются инсоляции. Поэтому увеличиваются случаи незаразных заболеваний, в том числе такие болезни обмена веществ, как кетоз, остеодистрофия, родильный парез, микроэлементозы и др. Специалисту-животноводу необходимо знать физиологические особенности животного организма в норме и в патологии, физиологию его защитных и компенсаторных механизмов и способы их включения и стимулирования.

Принципиально важно, чтобы сама технология являлась важным фактором профилактики болезней, поскольку новые технологические системы ставят животных в далеко не благоприятные условия. Кроме ограниченного моциона, недостаточной инсоляции имеют место твердое покрытие дорог и полов, двукратное доение, однообразное кормление и т. д. Повышенные нагрузки требуют повышения крепости конституции животных, их резистентности — устойчивости к болезням.

ФАТАЛЬНА ЛИ БОЛЕЗНЬ?

Жизненный опыт показывает, что животное значительно чаще заражается, чем болеет, т. е. заражение не всегда вызывает заболевание. В организме имеются факторы и механизмы, препятствующие развитию болезни. Если заболевание возникло, то нередко наступает выздоровление даже без применения лекарственных средств. Совершенно ясно, что изучение защитных сил организма, выявление благоприятных и неблагоприятных факторов и их действие на организм животного важны в преобразующей деятельности человека, в разработке научно обоснованных диагностических и лечебно-профилактических мероприятий. Это способствует дальнейшему развитию животноводства и укреплению создаваемых искусственных биогеоценозов.

Не так уже далек от истины давно известный афоризм, что организм сам себе врач, сам себя лечит. В процессе длительной эволюции организму животных приходилось встречаться с самыми разнообразными, в том числе неблагоприятными факто-

рами внешней среды, соответствующим образом реагировать на них с тем, чтобы противостоять их вредному действию. Менее совершенные организмы, не способные парировать неблагоприятные воздействия внешней среды, оказывались неприспособленными к борьбе за существование, быстро гибли, уступая дорогу более приспособленным. Результатом такой длительной эволюции всего органического мира являются защитные силы организма.

Последнее десятилетие XX в. характеризовалось возрождением интереса к механизмам *врожденного иммунитета*. Именно эти механизмы определяют неотложное реагирование организма животных и человека на инфекцию, заключающееся в распознавании ее природы, дискриминации от «своего» и последующей элиминации патогенного начала. У позвоночных эта система иммунной защиты является также базовой, определяющей как резистентность к большинству инфекционных агентов, так и осуществляющей инструктирующую роль в реализации иммунных реакций приобретенного типа, которые протекают с участием иммуноглобулинов, В- и Т-лимфоцитов. И. И. Мечников (1903) был одним из первых, кто определил иммунитет как общую систему явлений, благодаря которым организм может выдерживать нападение болезнетворных микробов. Он осуществил сравнительное исследование одного из ключевых механизмов иммунитета — фагоцитоза (Мечников И. И., 1892), что послужило основанием фагоцитарной теории иммунитета. Мечников подчеркивал, что иммунная система возникла и развивалась как совокупность механизмов организма, обеспечивающая его защиту от инфекции. В 60-е гг. XX в., благодаря исследованиям Ф. Бернета, к функциям иммунной системы стали вполне обоснованно причислять и способность организма противостоять опухолевым заболеваниям.

Л. А. Зильбар (1958) определял иммунитет как совокупность всех наследственно полученных и индивидуально приобретенных организмом свойств, которые препятствуют проникновению и размножению микробов, вирусов и других патогенных агентов (патогенов), а также действию выделяемых ими продуктов. Блок наследуемых организмом механизмов,

обеспечивающих резистентность к инфекции и опухолевым заболеваниям, уже в середине прошлого века определялся как «врожденный иммунитет» (Зильбар Л. А., 1958; Бойд Л., 1969). Менее точным является мечниковское определение этого круга механизмов и явлений как «естественный иммунитет». В 70–80-е гг. XX в. доминировало более узкое представление об иммунитете как совокупности механизмов, морфофизиологическим носителем которых является лимфоидная система позвоночных (Петров Р. В., 1982). Механизмы «естественного иммунитета» в рамках этой парадигмы относились к доиммунным (неспецифическим) механизмам противoinфекционной резистентности. Однако в 1990-е гг. были получены новые экспериментальные данные и клинические наблюдения, которые привели к возрождению концепции врожденного иммунитета (конституционального, примордиального, естественного) уже на качественно новом уровне обобщений и построений.

Увы, в среде обитания животных существуют могущественные факторы, способные преодолеть стройную систему защиты и привести к развитию болезни. Вот почему первостепенной задачей ветеринарных работников и животноводов является оказание действенной и своевременной помощи защитным силам организма животных в борьбе с болезнетворным агентом, а также изыскание новых средств воздействия на организм с целью повышения его резистентности. С другой стороны, становится необходимостью глубокое знание механизмов защиты организма от неблагоприятных воздействий факторов внешней среды, среди которых первое место занимают микроорганизмы. Состояние резистентности животных к инфекции формируется многочисленными механизмами организма, в том числе и иммунными.

Основная функция иммунной системы заключается в распознавании и ликвидации инфекционных агентов, выделяемых ими продуктов, а также уменьшении причиняемого ими вреда (Ройт и др., 2000). *Иммунный ответ* состоит из распознавания возбудителя или иного чужеродного материала и развертывания цепи реакций, направленных на их устранение. В широком смысле все разнообразные формы иммунного ответа можно разделить на два типа — врожденные и приобре-

генные реакции. Основное различие между этими типами иммунореактивности состоит в механизмах распознавания «несвоего» (чужеродного, патогенного). *Приобретенный (адаптивный) иммунитет* специализируется на детекции индивидуальных структурных особенностей каждого конкретного инфекционного агента или вещества (антигенных детерминант, или эпитопов), несущих признаки генетической чужеродности (Петров, 1982), в то время как рекогносцировочные механизмы *врожденного иммунитета* определяют молекулы микроорганизмов, присущие одновременно большим систематическим группам микробов. Эти молекулы получили в современной иммунологической литературе название «патогенассоциированных молекулярных паттернов», а распознающие их структуры животных клеток и жидкостей — «паттернраспознающих рецепторов (молекул)». Именно в свете этой концепции будут рассматриваться далее вопросы, связанные с распознаванием «несвоего» механизмами врожденного иммунитета.

В ходе эволюции у животных возникли и прошли отбор многочисленные механизмы защиты от инфекций. Ведущими среди них следует считать иммунные, для которых характерно распознавание молекулярных структур вирусов и микробных клеток, обозначенных как патогенассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП), специализированными рецепторами. Патогенассоциированные молекулярные паттерны представляют собой типовые макромолекулы, свойственные одновременно целым группам микроорганизмов. Это, как правило, консервативные в эволюции в структурном отношении молекулы, выполняющие стереотипные жизненно важные функции микроорганизмов и вирусов. В силу этого возможные изменения в этих структурах резко снижают жизнеспособность микробов, а поэтому не закрепляются в эволюции естественным отбором. Необходимо также подчеркнуть, что большинство рассматриваемых ПАМП свойственны миру микроорганизмов (бактерии, низшие грибы, простейшие) и вирусов. По их избирательному узнаванию паттернраспознающими рецепторами (ПРР) осуществляется одноактная точная дискриминация инфекционного «несвоего» от неинфекционного «своего». Как это ни кажется, на первый взгляд, парадоксальным, рассматриваемая

система различения «несвоего» (чужеродного) от «своего» механизмами врожденного иммунитета является часто не менее эффективной, чем система, основанная на детекции антигенов рецепторами В- и Т-лимфоцитов позвоночных животных. Взаимодействие ПАМП с ПРР однозначно детектирует инфекционную (патогенную) природу первых, что далеко не всегда имеет место при более аффинных взаимодействиях рецепторов В- и Т-лимфоцитов (BCR, TCR) с антигенами.

ПАМП являются инвариантными (консервативными) макромолекулами различной химической природы, как то: липид А липополисахаридов грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, пептидогликаны, терминально локализованные в гликолипидах, полисахаридах и гликопротеинах остатки D-маннозы и L-фукозы, формилметиониловые пептиды, флагеллин, неметилированные по цитозину CpG пары ДНК бактерий, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов. Они детектируются ПРР (молекулами) клеток иммунной системы животных, что обеспечивает запуск эффекторных (нейтрализующих и элиминирующих патогены) механизмов врожденного иммунитета. ПРР (молекулы) могут быть представлены как гуморальными (маннозосвязывающий лектин, липополисахаридсвязывающий белок, пептидогликанраспознающие белки, компоненты системы комплемента, антибиотические пептиды и белки), так и клеточносвязанными молекулами (рецепторы комплемента, макрофагальный маннозный рецептор, Толл-подобные рецепторы, NOD-белки, сквенджер рецепторы). Рассматривая эволюционное происхождение этих молекул, необходимо отметить, что многие из них или их предковые формы имеют отношение к морфогенетическим процессам (резорбция, метаморфоз, апоптоз), а их участие в иммунных реакциях формируется в результате межмолекулярных взаимодействий в каждой конкретной ситуации, связанной с необходимостью обеспечения стерильности внутренней среды животного организма. Наряду с этим ряд эффекторных механизмов иммунной системы осуществляет поддержание оптимального развития микробиоты (нормальной микрофлоры) на уровне слизистых оболочек и покровов животных. Все эти моменты важно учитывать при анализе функ-

циональных проявлений системы врожденного иммунитета в онтогенезе и эволюции животного мира. Эта древняя, но далеко не примитивная система детектирования патогенного («не-своего» и измененного «своего», например, при апоптозе) является базовой и в противоинфекционном иммунитете позвоночных. Она обеспечивает как эффективность элиминационных механизмов врожденного иммунитета, так и адекватную (протективную) направленность реакций приобретенного (адаптивного) иммунитета. Параллельно системе ПРР в организме животных развивалась система межклеточных взаимодействий, базирующаяся на адгезионных молекулах. Последние играют важную роль не только в морфогенетических процессах многоклеточных животных, но и в становлении у них ряда реакций иммунной защиты.

Принципиально важно отметить, что при выращивании животных вне контактов с микроорганизмами, так называемыми *гнотобионтами*, обнаружены существенные нарушения в их росте и развитии. Сложная технология получения плодов методом кесарева сечения, выращивание в стерильной среде и кормление стерильными кормами показали лишь одно — организму нужен контакт с микроорганизмами, продуктами их жизнедеятельности, нужна «тренировка» иммунной системы.

Для того чтобы предвидеть возможность возникновения болезней у животного, необходимо оценить степень защиты его организма, т. е. определить меру здоровья животного, его биологические возможности. Профилактические мероприятия будут научно обоснованными в том случае, если они основываются на результатах оценки иммунобиологического состояния стада и условий существования животных. Раннее прогнозирование способности животных противостоять неблагоприятным условиям, возникающим в результате несовершенной технологии, различным заболеваниям в разные периоды производственного процесса составляет важный этап профилактики. Так как естественная резистентность относится к числу слабо исследуемых качеств, следует особо тщательно изучить все защитные механизмы, чтобы найти правильные пути к их усилению в передаче по наследству.

Защитные механизмы живого организма можно представить по следующей схеме. К факторам неспецифической физиологической резистентности следует отнести явление фагоцитоза — свойство, присущее клеткам ретикулярной соединительной ткани поглощать микроорганизмы и другие инородные для организма тела и обезвреживать их. Фагоцитарные элементы, фиксированные в тканях, являются важнейшей составной частью ретикулоэндотелиальной системы, так же как и не фиксированные в тканях блуждающие клетки соединительной ткани — гистиоциты и клетки крови — фагоциты. Гуморальными факторами резистентности являются лизоцим, опсонин, комплемент, пропердин, термолабильные и термостабильные ингибиторы. Большую роль в защите организма играют и такие важные факторы, как щелочная буферная система и ферменты. Между неспецифическими и специфическими защитными факторами в механизме их образования может быть много общего, еще не раскрытого. Естественная резистентность даже в пределах одной породы может значительно колебаться в зависимости от изменения природно-климатических условий, от типа и полноценности кормления, от качества кормов, от их питательной и биологической ценности, от воздействия на животный организм различных групп бактерий и их токсинов.

Все это надо иметь в виду при разведении животных. Интересы племенной работы требуют ввоза извне и перемещения животных из одних зон страны в другие, самые различные по условиям. Поэтому при завозе импортных и перемещенных внутри страны животных крайне важно знать, в каких экологических условиях они находились в местах их многолетнего пребывания и уровень их физиологической резистентности до перемены места, сравнить их с условиями нового района размещения, изменениями обмена веществ и резистентности в их организме. Перемещение животных не всегда дает положительный эффект. Так, например, скрещивание красного степного рогатого скота с мясными шортгорнами в Аскании-Нова не дало у полученного потомства значительного повышения мясной продуктивности из-за плохой акклиматизации. Исследование показателей естественной ре-

антентности в процессе акклиматизации должны проводиться через определенные промежутки времени, примерно раз в квартал или через каждые 6 месяцев и сравниваться с показателями местных пород животных. При этом важно учитывать не только характер приспособительных реакций у самих завезенных животных, но и их потомков, как чистопородных, так и помесных.

Связывая реакцию адаптации с действием стрессовых раздражителей, Г. Селье (1982) различал две формы стрессового раздражения: физиологическую и патологическую. Ответную реакцию в значительной мере он учитывал в зависимости от возраста организма.

Адаптация — это, прежде всего, сохранение жизненно важных параметров внутренней среды в условиях стрессовых воздействий, обеспечивающих организму благоприятное существование. Можно охарактеризовать адаптацию как изменение скорости протекания биологических реакций, поскольку компенсаторно-приспособительные реакции обеспечивают постоянство внутренней среды организма путем разнообразных комбинаций его физиологических функций, развертывающихся с большей, чем обычно, скоростью. Учение о гомеостазе, по мнению ученых, свидетельствует о том, что любые структурно-функциональные изменения по своей сущности являются реактивными, т. е. обусловленными не только закономерностями течения процесса жизнедеятельности, но и ответом организма на влияние окружающей среды в данный момент. Таким образом, под гомеостазом понимают способность организма поддерживать постоянство внутренней среды даже в тех случаях, когда внешние условия существенно отклоняются от нормы. В определенном интервале создающихся неблагоприятных условий организму удается компенсировать изменения и нарушения физиологического равновесия и поддерживать оптимальное физиологическое состояние.

В современном представлении под гомеостазом понимают не только постоянство химических и физико-химических свойств внутренней среды, сколько физиологические механизмы, обеспечивающие такое состояние и постоянство, а также

устойчивость живых организмов. Гомеостаз является не чем иным, как эволюционно выработавшимся и наследственно закрепленным адаптационным свойством организма к условиям существования. При кратковременном или длительном отклонении этих условий за пределы нормы процесс адаптации сводится не только к восстановлению нормальных параметров внутренней среды, но и часто вызывает при этом изменения функциональной активности различных органов и систем организма.

Среди различных систем организма, обеспечивающих постоянство его внутренней среды, важная роль принадлежит неспецифическим факторам защиты, обуславливающим естественную резистентность организма. Естественную резистентность определяют как интегральный показатель устойчивости организма, которая базируется на способности как всего организма, так и отдельных его частей (систем, органов, тканей, клеток) реагировать на различные факторы внешней среды и противостоять этим воздействиям.

Резистентность организма животных зависит от условий их содержания, кормления, физиологического состояния и других факторов. Механизмы, обеспечивающие естественную резистентность, тонко реагируют на внешние воздействия и поэтому могут служить объективными показателями общего физиологического состояния организма. Устойчивость животных к заразным и незаразным болезням зависит от многих факторов внешней среды, наследственного иммунитета и проводимых специфических прививок. Реактивность организма животных при патологии значительно отличается от таковой у здоровых особей.

Исследуя обмен веществ и устойчивость животных к заболеваниям, установили, что естественная резистентность живых организмов изменяется в связи с возрастом, применением биологических веществ и медикаментозных средств. Следовательно, постоянство внутренней среды организма животных находится в неразрывной связи как с воздействием на него неблагоприятных факторов внешней среды, так и с проведением различных мероприятий в виде вакцинаций, введением различных биопрепаратов и медикаментов.

ЗНАЧЕНИЕ ИЗУЧЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Понятия о резистентности и реактивности организма встречаются уже в древнекитайской и древнеиндийской медицине. Более четко основные факторы иммунитета сформулированы в древнегреческой медицине. Уже в то время знали, что люди по-разному переносят болезни и обладают неодинаковой устойчивостью к ним. Гиппократ и Эмпирикус ввели понятие «идиосинкразия». И. И. Мечников и Л. Пастер создали учение об иммунитете, или невосприимчивости живых организмов к болезням и воздействию неблагоприятных факторов внешней среды, т. е. о приобретенной резистентности. Работы И. И. Мечникова 1892 и 1903 гг. можно назвать основополагающими в учении об иммунологической реактивности. Он убедительно доказал, что организм со всем его многообразным аппаратом сил и средств защиты определяет течение и исход инфекционного заболевания. Л. Пастер с учениками при рассмотрении методов профилактики инфекционных заболеваний подчеркивал огромную роль защитных сил самого организма в инфекционном процессе.

Реактивность организма не всегда совпадает с резистентностью. Так, во время зимней спячки у животных резистентность к различным инфекциям возрастает, а общая реактивность снижается. Пастер отмечал, что вторичная (приобретенная) иммунологическая реактивность формируется на фоне первичной (физиологической). Большую роль в формировании понятия реактивности организма сыграли работы И. П. Павлова, Л. А. Орбели, Г. Селье.

Таким образом, резистентность (от лат. *resisto* — противостоять, сопротивляться) — свойство организма противостоять различным заболеваниям, способность определенным образом реагировать на воздействие окружающей среды. В отличие от резистентности, реактивность всегда характеризует ответ живого организма. Резистентность охватывает более широкий круг плений сопротивляемости, чем иммунитет. Это конституционально обусловленная сила сопротивления и защиты против действий живых агентов. Резистентность снижается при голодании и дистрофии. Наиболее сильно ее снижает белковое голодание.

Важным звеном в исследованиях подобного рода являются основные положения И. П. Павлова о единстве животного организма с окружающей средой. Развивая учение об иммунитете, П. Ф. Здрадовский (1969), а несколько позже А. Е. Гурвич, Р. С. Незлин и другие показали, что в возникновении инфекционного процесса недостаточно знать микробиологическую сторону явлений, необходимо выяснить степень предрасположенности организма к инфекционному заболеванию.

Знание особенностей биологии животных, их потребностей и условий среды позволяет создавать оптимальный режим функционирования, что способствует реализации потенциальных возможностей животного и получению высокой продуктивности. По существу, следует профилактировать не болезни, а несоответствие между потребностями организма и условиями внешней среды. В связи с этим более совершенной следует считать технологию, которая в большей мере соответствует физиологическим потребностям животного с учетом вида, возраста, особенностей обмена веществ и продуктивности.

Защита от вредных воздействий внешней среды и создание высокого уровня ветеринарно-санитарной культуры хозяйств промышленного типа рассматривается как важное направление в профилактике заболеваний. Не менее важным следует считать направление, связанное с формированием устойчивых к болезням пород и линий животных. Совершенствование технологии ведения животноводства обуславливает необходимость совершенствования качеств животного организма, характеризующих его устойчивость и приспособленность к новым условиям. Что касается специфической профилактики, то она, по нашему мнению, должна совершенствоваться, однако не рассматриваться как главная мера. Приобретенный иммунитет в организме животного формируется на основе наследственного и под влиянием факторов внешней среды (реализации в фенотипе генотипической информации).

ПРИРОДА И КАТЕГОРИИ УСТОЙЧИВОСТИ ЖИВОТНЫХ К ЗАБОЛЕВАНИЯМ

Животные подвергаются воздействию целого ряда факторов среды. Эти факторы условно можно разделить на физические, химические, биологические, а также связанные с условиями содержания животных. Названные факторы, как правило, оказывают комплексное влияние. В ответ на меняющиеся факторы среды организм в процессе длительной эволюции выстроил систему защитных свойств, ограждающих его от происходящих изменений. Причем у более совершенных в эволюционном отношении организмов наблюдаются более сложные и разнообразные структурные и функциональные защитные приспособления.

ЗАЩИТНЫЕ СИЛЫ ОРГАНИЗМА

В лимфатических сосудах, лимфатических узлах и в кровеносных сосудах существует зависимость эффективности создаваемого иммунитета от длительности пути продвижения возбудителя от места внедрения до чувствительных клеток. Чем он длительней, тем больше препятствий ему необходимо преодолеть, следовательно, тем больше эффективность иммунитета. Наоборот, если входные ворота и чувствительные к возбудителю клетки локализованы в одном месте, то, очевидно, организму труднее выработать иммунитет. На второй линии защиты организма от возбудителя продолжают действовать, но в значительно более активной форме, специфические факторы, а также клеточная защита.

Из стволовых клеток в зависимости от их местоположения образуются клетки белой и красной крови. Клетки красного костного мозга находятся во всех лимфоидных органах и являются предшественниками всех клеток лимфоидного, миелоидного и ретикуло-эндотелиального участков. *Тимус* — главный орган иммунной системы. Он формируется в процессе эмбрионального развития раньше, чем селезенка и лимфатические узлы и регулирует развитие лимфоидной ткани в периферических органах иммунной системы. Среди лейкоцитов есть особый тип клеток — лимфоциты, которые являются основными солдатами армии иммунологического надзора за постоянством внутренней среды организма. В зависимости от того, где они образуются — в тимусе или другом органе, различают Т- и В-лимфоциты. Благодаря тимусу происходит преобразование стволовых клеток костного мозга в лимфоидные клетки — так называемые *тимусзависимые лимфоциты (Т-лимфоциты)*. Последние, мигрируя в периферические органы, становятся иммунокомпетентными (способными реагировать с антигенами). Тимусзависимые лимфоциты обеспечивают иммунный ответ клеточного типа, основными действующими единицами которого являются сами клетки, а не растворимые субстанции.

Лимфоидные органы пищеварительного тракта у животных (пейеровы бляшки) также выполняют важную роль. Предполагают, что стволовые клетки в лимфоидных образованиях пищеварительного тракта преобразуются в В-лимфоциты, которые в последующем становятся предшественниками плазматических клеток. У птиц эту функцию выполняет Фабрициева сумка (бурса). В-лимфоциты, возникающие у млекопитающих, по всей вероятности, в костном мозге, ответственны за гуморальный иммунный ответ, который характеризуется выработкой антител — специальных белков, нейтрализующих попадающие в организм чужеродные вещества. Таким образом, *костный мозг* — не только поставщик стволовых клеток, предшественник всех ростков кроветворения, но служит еще и источником лимфоцитов, обеспечивающих защиту организма от микробов, микробных ядов и других чужеродных веществ. Т- и В-лимфоциты встречаются в периферических лимфоидных органах — селезенке, лимфатических узлах и

врии. Здесь осуществляется их кооперация и совместная работа. Т-лимфоциты и макрофаги как бы помогают В-лимфоцитам реагировать на чужеродный антиген и начать подготовку к антителопродукции. Оказалось, что, помимо функции поставщика клеток-предшественников, костный мозг в иммунной реакции выполняет еще роль регулятора. Он содержит в себе клетки, контролирующие выработку антител в зрелых антителопродукентах.

В защите организма велика роль от инфекции клеток *лимфатических узлов*. Они обладают весьма активной способностью вырабатывать антитела и интерферон, благодаря которому иммунными становятся не только многие локализованные здесь клетки, но и клетки на более далеких рубежах получают сигналы к перестройке. Лимфатические узлы — это скопления лимфоидной ткани, расположенные в большом количестве (в организме животного около 1000) в различных частях тела и соединенные между собой сосудами. Известно, что в лимфатических узлах задерживаются различные возбудители, белки и токсины с большой молекулярной массой. Лимфатические узлы всегда наполнены лимфой, здесь и происходит ее очищение. Это осуществляют неподвижные клетки ретикулоциты, а также клетки эндотелия лимфатических «карманов» за счет фагоцитоза инородных веществ, попавших в лимфу.

Лимфа представляет собой тканевую жидкость, окружающую клетки, она собирается в межклеточных щелях, затем через капилляры, крупные лимфатические сосуды, попадает в лимфатические узлы. Защитная функция лимфатических узлов, сосудов и лимфы состоит в том, что там происходит обезвреживание инородных веществ, и очищенная тканевая жидкость вновь возвращается в кровяной ток. Лимфатические узлы, эндотелий сосудов и ретикулярные клетки нормальных животных задерживают Т-ряд возбудителей в иммунном организме. Здесь они фагоцитируются, а в случае воспаления погибают. Лимфатические узлы фиксируют возбудителей дизентерии, холеры, бруцеллеза, туберкулеза и препятствуют проникновению их внутрь организма. В иммунном организме к указанному процессу присоединяется губительное действие здесь же вырабатываемых антител. В лимфатических узлах сосредоточены

в значительном количестве клетки фагоцитирующие и клетки, образующие антитела (плазматические), т. е. элементы, наиболее активные в иммунологическом отношении. Здесь зачастую создаются для микробов непроходимые защитные барьеры, в результате инфекция приостанавливается. Благодаря лимфе и лимфатическим сосудам в организме осуществляется дренаж всех органов и тканей.

Селезенка — это орган кроветворения и своеобразное «депо» крови (содержит около 16% всей крови организма). До рождения она поставляет эритроциты, а в послезародышевый период в ней обнаруживаются макрофаги и лимфоциты. По строению и функции она имеет много общего с лимфатическим узлом. Считают, что лимфоциты в селезенку попадают из пейеровых бляшек, где их предшественники, вышедшие из красного костного мозга, преобразуются в В-лимфоциты. В селезенке синтезируется большинство антител в крови. Ретикуло-эндотелиальная система диффузна, ее клетки составляют основу селезенки и костного мозга. Они могут превращаться в подвижные макрофаги. Макрофаги могут также формироваться из клеток рыхлой соединительной ткани, моноцитов крови, клеток эндотелия капилляров надпочечников, купперовских клеток печени.

В ответ на вторжение в организм чужеродных тел — различных клеток, микробов, токсинов и т. д., которые получили общее название *антигенов*, — образуются защитные вещества, нейтрализующие их вредное действие и называемые антителами. Они-то и составляют третью линию защиты организма животного.

Таким образом, клеточные и гуморальные, специфические и неспецифические факторы защиты организма объединены в гармоническое целое, обеспечивающее как естественный, так и приобретенный иммунитет. Система защиты животного организма представлена комплексом механизмов. Одни выполняют как бы профилактическую роль и могут обнаруживаться вне непосредственной связи с микроорганизмом; другие обуславливают борьбу с внедрившимся в ткани и органы микроорганизмом и проявляются при первичном взаимодействии с ним; третьи проявляются в результате повторного проникновения микроба в ткани животного организма.

Несмотря на то, что в организме имеется множество защитных факторов иммунитета, механизм их проявления можно свести к нескольким основным реакциям биологического, патофизиологического и физико-химического порядка; эти реакции протекают либо последовательно, либо параллельно и представляют собой звенья единого процесса, направленного на сохранение постоянства внутренней среды организма, на нейтрализацию или удаление патогенного начала либо до попадания его во внутреннюю среду организма (лизисим, другие ферменты, секреторные антитела, реакции среды), либо после проникновения его тем или иным путем в кровь и лимфу (фагоцитоз, гуморальные факторы, воспалительная реакция). Если же названные механизмы не могут воспрепятствовать распространению и действию патогенного агента, включается система антителообразования, роль которой заключается в выработке иммуноглобулинов, способных связывать циркулирующие в жидкостях организма и даже попавшие в клетки молекулы антигена или его фрагменты.

Существующие факторы защиты животного организма классифицируются по их происхождению и характеру защитного действия. Наиболее удобным является деление свойств и способностей организма по устойчивости к заболеваниям на врожденные (наследственные) и приобретенные. Врожденная устойчивость передается по наследству так же, как и любой другой биологический признак. В том случае, когда устойчивость создается организмом в процессе онтогенеза, она называется приобретенной. Эта устойчивость при инфицировании организма обусловлена наличием специфических антител. Приобретенные формы иммунитета (активного и пассивного) не наследуются и рано или поздно утрачиваются. Наследственная (врожденная) устойчивость проявляется у представительной всех биологических видов, причем у большинства из них она обеспечивается конституциональными механизмами. Только у позвоночных животных (они составляют менее 1% биологических видов, населяющих нашу планету) врожденные механизмы дополняются факторами, приобретенными в процессе онтогенеза. Механизмы врожденной и приобретенной

устойчивости тесно взаимосвязаны. Если механизмы наследственной устойчивости не обеспечивают эффективной защиты, включаются механизмы приобретенной устойчивости. Причем приобретенные свойства животного развиваются на основе наследственных. При внедрении патогенного микроорганизма в ткани животного организма имеет место комплексное взаимодействие всех его систем и механизмов, а характер этого взаимодействия обуславливается не только особенностями микроорганизма, но и факторами патогенности микроорганизма.

Благодаря этим защитным приспособлениям организм, реагируя на изменения внешней среды и воздействия неблагоприятных факторов, поддерживает относительное постоянство внутренней среды, что является основным условием жизни животных и растений. Однако воздействия неблагоприятных факторов могут обуславливать у животных различного рода патологические процессы с проявлением клинических симптомов того или иного заболевания. Возникновение патологического процесса — это крайняя форма проявления защитной реакции, свидетельствующая о декомпенсации, о том, что структурные изменения в организме вышли за пределы «запаса прочности». Эта форма проявления защитной реакции на повреждающие факторы сопряжена со значительным повышением энергетических затрат и повреждениями структурных образований. Возникновение патологического процесса зависит от степени воздействия повреждающего фактора и способности животного приспособляться, определенными механизмами противостоять этим воздействиям.

Механизм проявления устойчивости организма к внешним воздействиям, в том числе и микроорганизмам, сложный и характеризуется мобилизацией всех защитных приспособлений и формированием так называемого структурного следа в системах, ответственных за реакцию к конкретному фактору внешней среды. При продолжительном или повторяющемся действии неблагоприятного фактора, по Н. Е. Введенскому, вслед за нормальной ответной реакцией, адекватной силе воздействия, развивается усиленная реакция, сменяющаяся парадоксальной стадией, которая характеризуется

отсутствием ответа на воздействие прежней силы. Заключительной стадией ответной реакции является ультрапарадоксальный ответ, при котором даже незначительное дополнительное действие раздражителя вызывает ответную реакцию чрезвычайной силы, явно превосходящую степень воздействия.

Под устойчивостью принято понимать способность животного противостоять факторам внешней среды, что связано с видовыми, породными и индивидуальными анатомо-морфологическими и физиолого-биохимическими особенностями животного организма и зависит от природы действующего фактора.

Каждый фактор обладает неспецифическим и специфическим действием, в свою очередь ответная реакция организма также зависит от реактивности организма, изменяющейся в зависимости от внутренних и внешних условий. Один и тот же фактор (раздражитель) неодинаково действует на разных животных ввиду неповторимости внутренних и внешних условий, определяющих реактивность каждого. Защитные реакции организма при действии патогенных микроорганизмов осуществляются иммунокомпетентными клетками, которые находятся в центральных (красный костный мозг, вилочковая железа, лимфоидная ткань пищеварительного тракта) и периферических (лимфатические узлы, селезенка, скопление лимфоидных клеток, разбросанных по различным органам) органах иммунитета. Основная функция органов иммунной системы — контроль и обеспечение генетического постоянства внутренней среды организма, а также защита организма от действия микроорганизмов и других генетически чужеродных факторов. Характер проявления защитных реакций может быть различным даже при воздействии идентичного фактора на один вид или индивидуум животных, что зависит от породных и индивидуальных особенностей. В ветеринарии явление неодинаковой чувствительности к возникновению инфекций разных видов животных известно давно. Так, крупный рогатый скот в естественных условиях не болеет сапом, инфекционной анемией, а лошади — чумой и ящуром. Для свиней являются специфическими заболевания рожей, чумой,

другие животные этими болезнями практически не болеют. Считают, что специфичность в отношении хозяина объясняется биологическими особенностями данного вида животных, она передается по наследству, а также обусловлена присутствием важных подавляющих инфекцию факторов у одних животных или отсутствием у других.

ПОНЯТИЕ ОБ ИММУНИТЕТЕ И ИММУННОЙ СИСТЕМЕ

Иммунитет — это защита организма от любых агрессивных факторов: физических, химических или биологических. В более узком смысле *иммунитет* (лат. *immunities* — освобождение от чего-то) — способность организма распознавать и уничтожать любые субстанции, несущие чуждую генетическую информацию.

Таковыми могут быть другие организмы (паразиты, микробы, вирусы), трансплантаты, чужеродные сложные органические вещества, а также собственные измененные клетки, подвергающиеся регенерации или ставшие излишними.

В иммунитете участвуют две системы.

1. Неспецифические факторы защиты от любого патогенного или чужеродного начала. Неспецифические факторы защиты, или факторы естественной резистентности (устойчивости) организма — врожденные, имеют видовые особенности, передаются по наследству. Когда на бытовом уровне говорят о снижении иммунитета у животного, то обычно имеют в виду именно эти факторы. Животные с пониженной резистентностью плохо адаптируются к любым изменениям окружающей среды и подвержены как инфекционным, так и неинфекционным болезням.

2. Высокоспециализированная иммунная система, реагирующая на конкретный антиген клеточными и гуморальными реакциями, направленными на его обезвреживание и выведение из организма.

Иммунная система сохраняет генетический гомеостаз организма, его индивидуальность, защищает от конкретных возбудителей болезней. В этом смысле иммунитет индивидуален и по наследству не передается.

ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЗАЩИТЫ, ИЛИ ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА

Ниже названные факторы защищают организм от любого чужеродного агента.

1. Естественные биологические барьеры — кожа, слизистые оболочки, гистогематические барьеры.

Кожа осуществляет механическую защиту; с постоянно слущивающимся ороговевшим эпидермисом удаляются проникшие между клетками микробы; выделяющийся пот обладает высокой бактерицидной активностью за счет содержащихся в нем кислот и бактерицидных веществ.

Слизистые оболочки дыхательных, мочеполовых и пищеварительных путей непроницаемы для большинства макромолекул, паразитов, бактерий и вирусов. Вместе со слизью и отмирающими клетками удаляются, смываются и посторонние частицы. В секретах слизистых оболочек содержатся антибактериальные вещества, например лизоцим. Бактерицидным действием обладают слюна, желудочный сок, желчь, слезная жидкость, сперма.

Гистогематические барьеры — это барьеры, образованные рядом биологических мембран между кровью и тканями. К ним относятся: гематоэнцефалический барьер (между кровью и мозгом), гематотимический (между кровью и тимусом), плацентарный (между матерью и плодом) и др. Они защищают органы от тех агентов, которые все же проникли в кровь через кожу или слизистые оболочки.

2. Фагоцитоз — процесс поглощения клетками инородных частиц и их переваривание. К фагоцитам относятся микрофаги и макрофаги.

Микрофаги — это гранулоциты, наиболее активными фагоцитами являются нейтрофилы. Легкие и подвижные, нейтрофилы первыми устремляются навстречу раздражителю, поглощают и своими ферментами расщепляют инородные частицы независимо от их происхождения и свойств. Эозинофилы и базофилы обладают слабо выраженной фагоцитарной активностью.

К *макрофагам* относятся моноциты крови и тканевые макрофаги — блуждающие или фиксированные в определенных участках.

Фагоцитоз протекает в 5 фаз.

1. Положительный хемотаксис — активное движение фагоцитов навстречу химическим раздражителям.

2. Адгезия — прилипание чужеродной частицы к поверхности фагоцита. Происходит перестройка рецепторных молекул, они сближаются и концентрируются, затем запускаются сократительные механизмы цитоскелета, и мембрана фагоцита как бы наплывает на объект.

3. Образование фагосомы — втягивание внутрь фагоцита частицы, окруженной мембраной.

4. Образование фаголизосомы — слияние лизосомы фагоцита с фагосомой.

5. Переваривание чужеродной частицы, т. е. ее ферментативное расщепление и удаление ненужных продуктов из клетки.

3. *Лизоцим, β -лизин* — ферменты, повреждающие мембраны микроорганизмов: через поврежденные участки вода проникает внутрь микробной клетки и вызывает ее лизис (растворение).

Лизоцим синтезируется нейтрофилами и моноцитами, он содержится в сыворотке крови, в секретах экзокринных желез. Очень высокая концентрация лизоцима в слюне, особенно у собак, и в слезной жидкости.

4. *Система комплемента*. В систему комплемента входят пропердин, комплемент и ионы магния. *Пропердин* (лат. *perdere* — разрушать) — это белковый комплекс, обладающий противомикробной и противовирусной активностью, но он действует не изолированно, а в комплексе с магнием и комплементом, активируя и усиливая его действие.

Комплемент («дополнение») — это группа белков крови, обладающих ферментативной активностью и взаимодействующих между собой по типу каскадной реакции, первые активированные ферменты активируют ферменты следующего ряда путем расщепления их на фрагменты, эти фрагменты также обладают ферментативной активностью, поэтому число участников реакции лавинообразно (каскадно) возрастает.

Компоненты комплемента синтезируются тканевыми макрофагами в печени, коже, слизистой кишки, а также эндотели-

им сосудов, нейтрофилами. Они постоянно находятся в крови, но в неактивном состоянии, и их содержание не зависит от внедрения антигена.

Активация системы комплемента заканчивается образованием мембраноатакующего комплекса — группы ферментов, обеспечивающих лизис объекта ферментативной атаки и привлекающих к месту реакции других участников — нейтрофилов, базофилов и тучных клеток.

Значение системы комплемента:

— усиливает соединение антигена с антителом, адгезию и фагоцитарную активность фагоцитов, т. е. способствует опсонизации клеток, подготавливает их к последующему лизису;

— способствует лизису иммунных комплексов и выведению их из организма;

— участвует в воспалительных процессах (освобождение гистамина из тучных клеток, местная гиперемия, повышение проницаемости сосудов), в процессах свертывания крови (разрушение тромбоцитов и освобождение тромбоцитарных факторов свертывания крови).

Б. Интерфероны — вещества противовирусной защиты. Они не уничтожают вирусы, но, образуясь в зараженных клетках, связываются с рецепторами рядом расположенных, здоровых клеток. Далее включаются внутриклеточные ферментные системы, блокирующие синтез белков и собственных клеток и вирусов. Тем самым очаг инфекции локализуется и не распространяется на здоровую ткань.

Таким образом, факторы неспецифической резистентности имеются в организме постоянно, они действуют независимо от конкретных свойств антигенов, они не усиливаются при контакте организма с чужеродными клетками или веществами. Это — самый древний способ защиты организма от чужеродных веществ. Он не «запоминается» организмом. Хотя многие из названных факторов участвуют и при иммунном ответе организма, но механизмы активации комплемента или фагоцитов неспецифичны. Так, механизм фагоцитоза является неспецифическим, он не зависит от индивидуальных свойств агента, а осуществляется против любой чужеродной частицы — будь то клетка, или частица коллоидного серебра, или зерно чертежной

туши. Это не исключает того, что фагоцитоз осуществляется и в процессе иммунной защиты против конкретного антигена.

Также и лизоцим: его физиологическое значение заключается в регуляции проницаемости клеток организма путем разрушения полисахаридных комплексов клеточных мембран, а не в реакции на микробы.

В системе профилактических мероприятий в ветеринарии существенное место занимают меры по повышению естественной резистентности животных. Они включают в себя правильное, сбалансированное питание, достаточное количество в кормах белков, липидов, минеральных веществ и витаминов. Большое значение в содержании животных отводится солнечной инсоляции, дозированной физической нагрузке, обеспечению хорошим санитарным состоянием, снятию стрессовых ситуаций.

При стойловом содержании сельскохозяйственных животных следует наиболее полно использовать для повышения естественной резистентности летние месяцы, уделять больше внимания пастбищному периоду. При круглогодичном стойловом содержании ответственность ветеринарных и зоотехнических специалистов по созданию оптимальных условий содержания и кормления животных во много раз возрастает.

ФУНКЦИИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ. ВИДЫ ИММУНИТЕТА

В настоящее время иммунная система рассматривается как система надзора за морфогенезом, физиологическими и биохимическими процессами, назначение которых сводится к поддержанию гомеостаза и охране организма от всего генетически чужеродного как экзогенного, так и эндогенного происхождения. В организме животного существует две системы защиты от инфекций. Одна из них представлена постоянно существующими в готовом виде клетками или молекулами с широким противомикробным и противовирусным действием (бактерицидные субстанции тканей, гидролитические ферменты, лизоцим, бета-лизины, пропердин, интерфероны, лимфокины), которые называют факторами естествен-

ной резистентности. Механизмы естественной резистентности не обладают специфичностью. Вторая система, характеризующаяся высокой специфичностью и связанная с предварительным антигенным воздействием на организм, получила название иммунной системы. Уникальность ее состоит прежде всего в том, что клетки, входящие в ее структуру, постоянно циркулируют в различных тканях и органах и она теснее остальных связана с другими системами.

Факторы естественной резистентности и иммунологической реактивности самостоятельно или в сочетании участвуют в противомикробной и противовирусной защите организма. При этом между ними существует тесная взаимосвязь. Так, удаление тимуса на разных стадиях онтогенеза отражается на клеточных (фагоцитоз) и гуморальных (комплемента, лизоцим, бета-лизины) факторах неспецифической резистентности организма. В то же время такие факторы неспецифической резистентности, как фагоциты и система комплемента, принимают участие в специфических формах реагирования на антигенный раздражитель. Фагоциты, главным образом макрофаги, принимают участие в подготовке антигенов и переработке их в иммуногенную форму. Кроме того, они участвуют в кооперации Т- и В-лимфоцитов, необходимой для инициации иммунного ответа. Один из компонентов комплемента присоединяется к антителам и обеспечивает лизис клеток, содержащих антигены, против которых эти антитела вырабатаны.

Накопились многочисленные факты, свидетельствующие, что иммунная система функционирует в организме не обособленно, а находится под сложным влиянием эндокринной и центральной нервной систем и наоборот.

Иммунная система — это система органов, тканей и клеток организма, сохраняющая его генетическую индивидуальность. Иммунитет не бывает неспецифическим, это высокоспециализированная система, благодаря которой организм распознает чужеродные субстанции и уничтожает их, сохраняя иммунологическую память о произошедшем в пределах жизни индивидуума.

Главными функциями иммунной системы являются:

1. Уничтожение собственных клеток и тканей, закончивших свой жизненный путь. Благодаря этому процессу происходит физиологическая регенерация или перестройка тканей — костной, мышечной, эпителиальной.

2. Обнаружение и уничтожение мутантных клеток, в том числе опухолевых.

3. Отторжение пересаженных тканей и органов (трансплантатов).

4. Распознавание инфекционных, вирусных и паразитарных агентов, проникших в организм, и их токсинов, их обезвреживание и уничтожение.

Все клетки организма, кроме ранних эмбриональных, несут на поверхностных мембранах особые белковые молекулы — рецепторы, называемые *главным комплексом гистосовместимости* — ГКГС (англ. *Major Histocompatibility Complex*, или МНС). Точнее, ГКГС — комплекс генов, под контролем которого вырабатываются, а затем встраиваются в клеточные мембраны данные молекулы. ГКГС — код клеток данного индивидуума, которого нет у клеток других организмов. Этого кода нет у большинства собственных мутантных клеток, он исчезает у клеток, не нужных организму.

Благодаря распознаванию рецепторов главного комплекса гистосовместимости лейкоциты не реагируют на собственные ткани и антигены. Если на мембране какой-либо клетки этот рецептор отсутствует или его конфигурация хотя бы немного изменится, тогда лимфоцит отличает эту клетку от своих. Обнаружение лейкоцитами «чужого» начала запускает развитие клеточных и гуморальных механизмов иммунной реакции.

Клеточные механизмы иммунитета — это распознавание и уничтожение чужеродной субстанции с помощью цитотоксических механизмов и последующего лизиса (растворения) или фагоцитоза. За клеточные реакции ответственны главным образом Т-лимфоциты.

Гуморальные механизмы заключаются в синтезе антител (иммуноглобулинов) и образовании иммунного комплекса (антиген + антитело) с последующим его уничтожением. Продуцентами антител являются В-лимфоциты и образующиеся из них плазмочиты (плазматические клетки).

Различают активный и пассивный иммунитеты. *Активный иммунитет* развивается в организме при внедрении антигена. В ответ на агрессию инициируется (запускается) иммунный ответ, в процессе которого нарастает количество иммуноглобулинов и формируется иммунологическая память. Активный иммунитет развивается как в ходе инфекционного заболевания, так и при вакцинации животных — т. е. после искусственного введения в организм ослабленных или убитых патогенных культур. В последнем случае после легкого переболевания возникает кратковременный или долговременный (иногда — пожизненный) иммунитет, защищающий организм от повторного заболевания.

Пассивный иммунитет — это введение в организм «готовых» иммуноглобулинов, содержащихся в сыворотке крови животных, перенесших данное заболевание. В организме иммуноглобулины могут функционировать в течение 2–3 недель, после чего они разрушаются, как чужеродные белки. Такие сыворотки называются иммунными, а их введение в организм — иммунизацией. Иммунизация является способом не только профилактики, но и лечения инфекционных болезней.

Разновидностью пассивного иммунитета является *колостральный иммунитет* (колострум — молокозиво). В молозиве содержится большое количество материнских иммуноглобулинов, обеспечивающих защиту новорожденных на протяжении 1–2 недель жизни, пока иммунная система детеныша еще не сформировалась.

ПОНЯТИЕ ОБ АНТИГЕНАХ И АНТИТЕЛАХ

Антигенами называют сложные органические вещества, на которые организм отвечает специфической иммунной реакцией, в результате чего это вещество обезвреживается и удаляется (элиминируется).

Антигенами являются белковые молекулы с большой молекулярной массой (более 5000). Они могут быть в растворенной форме или встроенными в мембраны клеток, в том числе вирусных, микробных или паразитарных. Вещества небелковой

природы также могут иметь антигенные свойства, но только после присоединения к белковой молекуле. Так, липиды, в том числе холестерин, нуклеиновые кислоты, полипептиды, некоторые гормоны, лекарственные вещества, многие продукты химического синтеза после попадания в организм и соединения с белками сыворотки крови становятся антигенами, хотя сами по себе антигенами не являются. Такие вещества называются *гаптенами*.

Антигенами могут быть частицы пуха и перьев, споры и пыльца цветущих растений, микроскопические клещи и продукты их жизнедеятельности, многие лекарственные препараты и самые разнообразные химические вещества, содержащиеся в искусственных коврах, мебельных материалах, парфюмерных изделиях и пр.

Антигены попадают в организм с вдыхаемым воздухом, через желудочно-кишечный тракт, через поврежденные покровы организма. Пересаженные органы и ткани также являются чужеродными, они подлежат отторжению, как и любые другие антигены. Антигенами становятся мутантные или отмершие клетки собственного организма, а также макромолекулы, проникшие из клеток в кровь или тканевую жидкость.

Антитела (иммуноглобулины, Ig) синтезируются В-лимфоцитами и плазмоцитами. На каждый антиген, существующий или когда-то существовавший в природе, лимфоцитами выделяется один-единственный вариант иммуноглобулина, сходный по структуре с антигенной детерминантой. Иммуноглобулины синтезируются аппаратом Гольджи, встраиваются в поверхностную мембрану, а затем отрываются от клетки и оказываются в плазме крови или внеклеточной жидкости — это так называемые сывороточные антитела. Некоторые иммуноглобулины проходят из крови в различные секреты (слюна, молоко и др.), они называются секреторными.

Основное значение антител заключается во взаимодействии с антигенами, образовании иммунных комплексов (антиген + антитело), их нейтрализации или уничтожении.

По характеру взаимодействия с антигенами все иммуноглобулины, независимо от своего класса и структуры, можно разделить на следующие группы.

Агглютинины вызывают склеивание антигенов, в том числе микробных клеток.

Опсонины (буквально — «подготовка к обеду»), подготавливают чужеродные клетки к последующему фагоцитозу и усиливают фагоцитарную активность макрофагов и микрофагов. Опсонины связываются одной стороной молекулы с антигеном (микробной клеткой), а другой стороной — с рецептором фагоцита.

Преципитины осаждают, т. е. переводят антигенные структуры в нерастворимое состояние, что облегчает последующую ферментацию.

Антитоксины нейтрализуют токсины (яды) паразитарного, бактериального или вирусного происхождения, а также облегающиеся в самом организме.

Лизины растворяют антигены.

Иммуноглобулинам принадлежит центральное место среди защитных белков. Все классы иммуноглобулинов могут обладать свойствами антител и иметь сходную с ними химическую структуру. По строению и происхождению иммуноглобулины делятся на пять классов: М, G, A, E и D. В каждом классе содержится огромное число вариантов, соответствующее количеству в природе антигенов (по принципу: один антиген — один иммуноглобулин).

Иммуноглобулины М — самый «древний» в филогенетическом отношении класс иммуноглобулинов. Вырабатывается в лимфоцитами еще во внутриутробный период. Из красного спинного мозга недифференцированные лимфоциты выходят, несли на мембранах именно этот тип антител. В ходе реакции организма на антиген (иммунном ответе) IgM образуются раньше других антител. В сыворотке крови содержание IgM составляет около 6%.

Иммуноглобулины G — основной класс антител, в сыворотке крови составляет до 80% от всех иммуноглобулинов. IgG активизируют систему комплемента, связываются с рецепторами нейтрофилов и макрофагов, усиливая их фагоцитарную активность. Эти антитела могут проходить через плацентарный барьер, а также попадать в организм новорожденных с молозивом, обеспечивая их пассивным иммунитетом.

Иммуноглобулины А могут быть в двух формах: в сыворотке крови (до 13% от всех иммуноглобулинов) и в секретах экзокринных желез, например в молозиве.

Иммуноглобулины Е у здоровых животных в крови содержатся в следовых количествах (0,002% от всех антител). IgE выполняют важную роль в развитии воспалительных реакций и в защите слизистых оболочек от антигена. IgE взаимодействуют с рецепторами тучных клеток и циркулирующих базофилов, что приводит к освобождению этими клетками гистамина — медиатора воспалительной реакции и хемотаксических факторов, привлекающих новых участников иммунного ответа (нейтрофилы, эозинофилы, комплементы, IgG).

Иммуноглобулины D — короткоживущие антитела, составляют менее 1% всех иммуноглобулинов крови. Контролируют активацию лимфоцитов, однако их функции еще не изучены.

Характеристика иммунокомпетентных клеток.

Главными иммунокомпетентными клетками являются агранулоциты — лимфоциты и макрофаги. Гранулоциты тоже участвуют в иммунных реакциях, но неспецифическими механизмами, т. е. независимыми от свойств конкретного антигена.

Лимфоциты. Все лимфоциты разделяют на три класса: Т, В и 0 (нулевые).

Класс Т-лимфоцитов неоднороден, среди Т-лимфоцитов различают несколько субпопуляций по механизму их действия: Т-индукторы (Т-хелперы и Т-супрессоры) и Т-эффекторы (Т-киллеры и Т-клетки памяти).

Индукторные, или регуляторные, клетки регулируют иммунный ответ. Т-хелперы (Т_h) стимулируют активность других лимфоцитов, особенно В-лимфоцитов, а Т-супрессоры (Т_s) подавляют или ограничивают силу иммунного ответа. Эффекторные клетки непосредственно взаимодействуют с антигенами. Это Т-киллеры (Т_k), они уничтожают (убивают) чужие клетки (но не фагоцитируют!). Другими эффекторными Т-лимфоцитами являются Т-клетки памяти, они образуются в процессе иммунного ответа, хранят информацию о встрече с данным антигеном и инициируют иммунный ответ при повторной встрече с ним.

К классу Т-лимфоцитов относятся также НК-клетки (естественные киллеры) — это главные клетки, осуществляющие противоопухолевую защиту. В отличие от T_h , НК-клетки не требуют предварительной активации, они уничтожают чужеродные клетки независимо от присутствия на них антител или комплемента.

Т-лимфоциты секретируют большую группу веществ, которые называются лимфокинами, или интерлейкинами. Это полипептиды, или белки, они обладают широким спектром действия, часто дублируя друг друга. Их обозначают буквами ИЛ с добавлением порядкового номера (ИЛ1, ИЛ2 и т. д.). Интерлейкины осуществляют гуморальный контакт между лейкоцитами, регулируют активацию стволовых клеток костного мозга (выполняют функции гемопоэтинов), участвуют в разворачивании иммунного ответа, привлекают в реакции другие клеточные элементы, являются медиаторами воспалительных реакций и регенерации тканей.

В лимфоциты осуществляют гуморальные механизмы иммунных реакций. Превращаясь в плазматические клетки, они являются продуцентами антител, поэтому называются эффекторными клетками.

В лимфоциты не имеют признаков Т- или В-лимфоцитов, т. е. подобных им маркеров на своей поверхности. К В-лимфоцитам относятся К-клетки. В отличие от естественных (натуральных) киллеров, К-лимфоциты оказывают цитотоксическое действие на клетки, покрытые IgG, т. е. реагируют не на сам антиген, а на антитела, покрывающие чужую клетку.

Моноциты из костного мозга сначала поступают в кровь, где их содержание составляет 1–6% от всех лейкоцитов. Через несколько суток они покидают кровяное русло и дальнейшую жизнь проводят в тканях, либо перемещаясь по межклеточным пространствам, либо оседая в определенных местах (Купферовские клетки в печени, клетки Лангерганса в коже, остеокласты в костной ткани и др.).

Микрофаги выполняют три главные функции: 1 — фагоцитоз, 2 — представление (презентация) антигена лимфоцитам и 3 — секреция интерлейкинов, интерферонов, лизоцима, компонентов комплемента.

ОРГАНЫ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Органы иммунной системы подразделяют на центральные и периферические. Связь между ними обеспечивается нервной, эндокринной, кровеносной и лимфатической системами. Важной особенностью иммунной системы является непрерывная циркуляция лимфоцитов между центральными и периферическими органами.

К центральным органам иммунной системы относятся красный костный мозг и тимус, а у птиц, кроме того, Фабрициева сумка (бурса). *В центральных органах происходит первая фаза дифференцировки лимфоцитов, независимая от присутствия антигенов.* Здесь образуются достаточно зрелые лимфоциты, имеющие ряд рецепторов и маркеров на мембране, но еще физиологически неактивные, не способные выполнять свои специфические функции.

В красном костном мозге из полипотентных стволовых клеток начинают развиваться все форменные элементы крови. На ранней стадии развития лимфоциты дифференцируются на предшественников Т- и В-клеток, они еще незрелые и морфологически неотличимые, но снабжены соответствующими маркерами.

Будущие или пре-Т-лимфоциты выходят из красного костного мозга и через кровь попадают в тимус — вилочковую железу. Здесь они заселяют корковую зону, где активно размножаются и созревают, обучаются распознавать свои клетки, приобретают различные рецепторы и маркеры на мембранах. В этих процессах участвуют гормоны тимуса. Постепенно зрелые Т-лимфоциты переходят в мозговую зону тимуса, а оттуда — в кровеносные сосуды. *Т-лимфоциты, не обладающие свойством распознавать свои и чужие клетки, подлежат уничтожению макрофагами до выхода их из тимуса в кровоток.* Поэтому около 95% Т-лимфоцитов погибают в тимусе, и только малая их часть попадает в кровоток. Этим предотвращается развертывание иммунной реакции против собственных клеток и тканей.

Характерной особенностью тимуса является его возрастная инволюция. Уже после подсосного периода тимус начинает

уменьшиться в размерах, особенно значительная атрофия наблюдается в период полового созревания. Хотя полностью, по-видимому, тимус не исчезает, его значение теряется. К этому времени в организме накопилось уже достаточное количество долгоживущих клеток памяти, а регуляторные и эффекторные Т-лимфоциты пролиферируют (размножаются) в периферических иммунных органах.

У птиц пре-В-лимфоциты после выхода из красного костного мозга заселяют Фабрициеву сумку, где превращаются в В-лимфоциты. У млекопитающих В-лимфоциты все стадии антигеннезависимой дифференцировки проходят в красном костном мозге. Отсюда они выходят в кровяной поток, имея на поверхности антигены класса IgM, и заселяют периферические иммунные органы.

Периферическими органами иммунной системы являются селезенка, лимфатические узлы, лимфатические фолликулы, вилочковая железа. Здесь происходит антигензависимая дифференцировка В-лимфоцитов, т. е. их активация и пролиферация в результате встречи с антигенами, здесь вырабатываются и накапливаются антитела и разыгрываются иммунные реакции.

Лимфатические узлы. В корковой части лимфатических узлов находятся первичные фолликулы, содержащие центры размножения лимфоцитов и ретикулярных клеток. Корковый слой лимфатических узлов называется тимуснезависимым, так как активация и пролиферация В-лимфоцитов при введении антигена происходит здесь без участия Т-лимфоцитов.

Ниже кортикального (коркового) слоя расположен паракортикальный слой, или глубокая кора. Это — тимусзависимая зона, она атрофируется после удаления тимуса и значительно увеличивается в размере во время иммунного ответа по клеточному типу, т. е. с участием Т-лимфоцитов.

В мозговой зоне лимфоузлов в процессе иммунного ответа размножаются плазматические клетки.

Селезенка. Лимфоидная ткань селезенки участвует преимущественно в иммунных реакциях гуморального типа. В ней происходит обмен лимфоцитами между кровью и лимфоидной тканью, а во время иммунного ответа накапливаются плазматические

клетки. Поскольку в селезенке нет лимфатической системы, циркуляция лимфоцитов осуществляется только через кровеносные сосуды и красную пульпу.

Селезенка осуществляет контроль за цитологическим составом крови, в ней разрушаются и удаляются из крови утратившие функциональную активность эритроциты и лейкоциты («кладбище эритроцитов»).

Лимфоидная ткань расположена вдоль пищеварительного тракта, дыхательных и мочеполовых путей, т. е. в местах проникновения антигенов из внешней среды. По своим функциям она сходна с лимфатическими узлами и селезенкой.

Кожа не является лимфоидным органом, но в коже имеется много лимфоидной ткани, скопления лимфоцитов, клетки Лангерганса и дендритные (ретикулярные) клетки. Указанные структуры обеспечивают защиту организма от патогенных микробов, проникших через кожный барьер, от опухолей, кожного трансплантата.

При внутрикожном введении антигена вначале развивается местная иммунная реакция. Такую местную иммунизацию в медицине и ветеринарии применяют для прижизненной диагностики ряда болезней — например, туберкулеза, а сама процедура называется туберкулинизацией. Если животное не заражено туберкулезом, в его крови отсутствуют специфические антитела и реакция на туберкулин не дает клинических признаков (отрицательная проба). Если животное больное и в крови имеется высокий уровень антител, появляется ограниченный отек кожи, покраснение, местное повышение температуры и болезненность, а иногда развивается и общая реакция организма (положительная проба).

Миграция (рециркуляция) лимфоцитов. В организме происходит постоянная рециркуляция лимфоцитов между центральными и периферическими органами. Из костного мозга пре-Т-лимфоциты переходят по кровеносным сосудам в тимус, затем мигрируют в лимфатические узлы и селезенку, где заселяют тимусзависимые зоны. Оттуда они поступают в кровь или лимфу. В области капилляров и венул Т-лимфоциты проходят по межклеточным щелям через эпителиальный барьер, проникают в ткани, а затем — в лимфатические капилляры и с током

периферической лимфы заносятся в лимфатические узлы. Выйдя из лимфоузлов, лимфоциты через грудной лимфатический проток снова оказываются в крови.

Пре-В-лимфоциты из красного костного мозга через кровеносную систему переходят в селезенку, групповые лимфатические фолликулы и лимфатические узлы, где заселяют тимус-независимые зоны. Эти клетки мигрируют значительно в меньшей степени, чем Т-лимфоциты, но при антигенной стимуляции их подвижность усиливается в тысячи раз.

Выйдя в кровоток, часть В-лимфоцитов мигрирует в красный костный мозг, где участвует в дифференцировке стволовых клеток и отбору тех клонов, которые будут синтезировать специфические антитела.

Миграция лимфоцитов по кровеносным и лимфатическим сосудам позволяет осуществлять иммунный надзор над всеми регионами организма, его органами и тканями, создает возможность генерализации иммунного ответа и обеспечивает функционирование иммунной системы как единого целого.

МЕХАНИЗМЫ ИММУННОГО ОТВЕТА

Иммунный ответ включает в себя распознавание антигена, активацию лимфоцитов и выполнение ими клеточных и гуморальных реакций, направленных на обезвреживание или уничтожение чужеродного материала.

Распознавание антигена осуществляют Т-лимфоциты, причем только на поверхностях клеток — или «чужих» клеток, в том числе микробных, или фагоцитов. Более эффективной для последующей активации лимфоцитов представляется (презентация) антигена на поверхности макрофагов.

Под антигенпрезентацией понимают процесс поглощения антигена особыми клетками (их называют антигенпрезентирующие, А-презентирующие клетки, или А-клетки), переработку антигена и выведение наиболее значимой части антигена в соединении с ГКГС на поверхность мембраны. Только в таком виде антиген может быть распознан лимфоцитами.

Одновременно А-презентирующая клетка секретирует интерлейкин-1. Эти процессы в макрофагах начинаются в месте встречи их с антигеном и продолжаются по пути миграции макрофага к ближайшему региональному лимфатическому узлу.

Активация лимфоцитов. Т-лимфоциты распознают на мембране А-клетки измененный антигеном участок ГЖГС, признают его чужеродным и в присутствии ИЛ1 сближаются с А-клеткой.

В результате Т-лимфоцит приобретает новое качество — он становится активным киллером, хелпером, супрессором или клеткой памяти. Активированные T_h секретируют ряд лимфокинов, активирующих В-лимфоциты и вызывающих пролиферацию определенного клона В-лимфоцитов. Кроме того, лимфокины стимулируют секрецию В-лимфоцитами IgM, а затем переключение синтеза на IgG.

Активированные T_h угнетают превращение В-лимфоцитов в плазматические клетки, синтез ими антител. В результате иммунный ответ прекращается или снижается его интенсивность, тем самым регулируется адекватность иммунной реактивности.

Для активации В-лимфоцитов также необходимы кооперативные отношения с А-презентирующей клеткой, несущей антигенную детерминанту, контакт с T_h и интерлейкином.

Клеточные реакции иммунитета. T_k реагируют на клеточные рецепторы главного комплекса гистосовместимости, измененные мутацией, химическими веществами, старением или присоединением к ним чужеродного антигена. Таким образом, даже небольшие изменения ГЖГС могут быть причиной превращения собственных клеток в мишени для Т-лимфоцитов. Получив помощь от T_h , активированные Т-лимфоциты превращаются в клетки-убийцы.

Способов уничтожения мишеней у T_k много, они весьма изощренные. В одних случаях необходимо межклеточное взаимодействие: Т-киллер сближается с клеткой-мишенью, межклеточные щели сужаются, в это пространство T_k выделяет лизины, проделывающие в мембране отверстия. Через бреши в мембране в клетку поступает вода, и клетка разрушается.

В других случаях Т-лимфоцит выпускает отростки, образующие высокопроницаемые контакты с мембраной измененной клетки — «поцелуй смерти». Через них в жертву вводятся лимфотоксины — вещества, повреждающие внутриклеточные компоненты клетки: монооксид азота, активный кислород, переносчик водорода, свободные галогены, различные ферменты. Еще один способ уничтожения чужой клетки — введение в нее веществ, включающих апоптоз — запрограммированную в геноме клетки программу ее гибели.

После такой атаки T_k не погибает, он может поразить несколько клеток.

Гуморальные механизмы иммунной реакции осуществляются антителами, продуцируемыми плазматическими клетками. В результате межклеточного взаимодействия и участия интерлейкинов происходит отбор тех В-клеток, которые несут на мембране иммуноглобулиновые рецепторы того же строения, что и антигенная детерминанта. Далее происходит размножение (пролиферация) клона В-лимфоцитов, трансформация их в плазматические клетки (последняя фаза клеточного цикла) и нарастание скорости секреции антител.

Если неактивированный В-лимфоцит синтезирует за час до 400 молекул иммуноглобулинов, причем только класса М, то одна плазматическая клетка образует за такое же время более 10 миллионов молекул иммуноглобулинов, причем различных классов, больше всего — IgG.

Уникальной особенностью антителогенеза является выработка именно того единственного типа иммуноглобулина, одного из многих миллионов вариантов, который может образовать комплекс с данным антигеном. Поскольку чужеродные клетки (например, бактериальные) несут на своей поверхности не одну, а множество антигенных детерминант, то в иммунный ответ вовлекаются многие клоны лимфоцитов и синтезируется не один вариант иммуноглобулина, а столько, сколько имелось антигенов.

Синтезированные в результате гуморального иммунного ответа антитела (иммуноглобулины) образуют комплексы с антигенами, их называют *иммунными комплексами*. Дальнейшая судьба иммунных комплексов различна, она зависит

от вида антител, их размера и количества. Иммуные комплексы могут присоединять к себе компоненты комплемента и растворяться, могут выпадать в осадок (преципитация), они могут быть захвачены фагоцитами и подвергнуться полному уничтожению. В любом случае антиген в комплексе с антителом должен быть уничтожен и элиминирован (выведен) из организма.

Таким образом, в организме возможен синтез многих миллиардов разновидностей антител, т. е. человек или животное хорошо подготовлены к встрече с любым возможным антигеном. Такое разнообразие достигается многими, еще недостаточно изученными механизмами, например, путем рекомбинации генов, а также их наследственной неоднородностью в хромосомах. Антитела вырабатываются даже к таким антигенам, которые никогда еще не существовали в природе.

В течение индивидуальной жизни используется очень небольшая часть антител. В организме образуется большое число клонов лимфоцитов, и только некоторые из них будут когда-либо участвовать в иммунной защите. Однако такая «расточительность» позволяет сохранять высокую степень готовности к возможному появлению новых инфекционных болезней, мутировавшим микроорганизмам и вирусам и новым (искусственным) антигенам.

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ

Иммунологическая память — это способность лимфоидных клеток сохранять информацию об антигене и отвечать ускоренной и усиленной реакцией на повторную встречу с тем же антигеном. Это явление основано на том, что во время первой встречи с антигеном (в процессе болезни или иммунизации) в ходе иммунного ответа образуются Т- и В-клетки памяти.

Низкие дозы антигена обычно не вызывают гуморального иммунного ответа, т. е. не сопровождаются выработкой антител, но приводят к образованию Т-клеток памяти. Большие дозы антигена формируют В-клетки памяти. По сравнению с

пре-В-лимфоцитами эти клетки имеют большую плотность иммуноглобулиновых рецепторов на мембране.

Клетки памяти могут сохраняться в организме достаточно длительное время в покое (неактивном) состоянии. Приобретенный иммунитет сохраняется от нескольких месяцев до многих лет, а при некоторых болезнях — всю жизнь.

При повторной встрече с антигеном клетки иммунологической памяти активируются, пролиферируют и образуют множество лимфоцитов одного клона, превращающихся в плазматические клетки. В таком случае повторное заболевание протекает легче, быстрее, с меньшими клиническими признаками или вообще не развивается. Это объясняется достаточной выработкой иммуноглобулинов, связывающих антигены в иммунные комплексы с последующим выведением (элиминацией) их из организма.

Экспериментально доказано, что защита организма животного от инфекции происходит на трех уровнях: молекулярном, клеточном и на уровне целостного организма. На *молекулярном уровне* происходит взаимодействие молекул иммунного гамма-глобулина с молекулами токсинов, молекулярными группами вирусов и бактерий. Благодаря этому бактерии и вирусы их токсинов нейтрализуются, что приводит к тому, что токсины и вирусы из активной формы переходят в неактивную, становятся неспособными соединяться с клетками, к которым они имеют сродство (тропизм). Токсины благодаря этому не могут оказывать на клетки своего ядовитого действия, а вирусы утрачивают способность присоединяться к клеткам, проникать в них и размножаться.

Молекулы специфического иммунного гамма-глобулина, соединяясь с соответствующими молекулярными группами бактерий, изменяют их физико-химические свойства, вследствие чего бактерии агглютинируются (склеиваются) в более крупные массы (агломераты). В силу этого они легче задерживаются в лимфатических узлах и быстрее фагоцитируются. Некоторые же микробы подвергаются растворению (лизису), что приводит при участии комплемента.

На *клеточном уровне* защита от бактерий осуществляется посредством фагоцитоза — активного захвата микробов

и их переваривания. И. И. Мечникову, основоположнику учения о защитных силах организма, принадлежит заслуга в доказательстве роли фагоцитов в естественной защите организма от инфекции. Он различал две группы фагоцитирующих клеток: макрофаги (нейтрофилы и эозинофилы) и макрофаги — клетки системы мононуклеарных фагоцитов (гистиоциты, купферовские клетки, альвеолярные макрофаги, свободные и фиксированные макрофаги, макрофаги костного мозга, плевральные и перитонеальные макрофаги, остеокласты, макроглиальные клетки). Именно макрофаги, по И. И. Мечникову, и создают естественную резистентность. Фагоцитозу предшествует воздействие на бактерии антител и опсоинов.

Восприимчивые к вирусу клетки защищаются путем особой перестройки и образования интерферона. Последний предохраняет от вируса не только эти клетки — продуценты интерферона, но и другие, к которым поступает интерферон. Таким образом, защитные реакции на молекулярном и клеточном уровне развиваются в тесном взаимодействии друг с другом. Однако первенство остается за клеткой (клетка — исходное начало не только клеточных реакций, но и продуцент антител, интерферона, опсоинов, комплемента, вирусных ингибиторов). Гуморальные факторы начинают осуществлять самостоятельную первичную функцию — нейтрализацию ядов, вирусов и бактерий на молекулярном уровне. В дальнейшем клетки снова берут на себя функцию окончательного разрушения нейтрализованных антителами чужеродных агентов.

Молекулярные и клеточные механизмы защиты находятся под регулирующим влиянием систем целостного организма. Резистентность может быть свойственна всему организму или его отдельным системам, тканям и органам. Связана она с анатомо-физиологическими и генетическими особенностями организма, с его механизмами, гуморальными и клеточными неспецифическими факторами защиты, с антителами. Механизмы защиты многообразны. Они хорошо развиты и надежно функционируют у хорошо развитых здоровых животных.

ИНСТРУКТИРУЮЩАЯ РОЛЬ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА В СТАНОВЛЕНИИ НЕКОТОРЫХ РЕАКЦИЙ ПРИБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Распознавание антигенов, особенно белковой природы, осуществляется специфическими рецепторами В- и Т-лимфоцитов, разнообразие которых формируется благодаря механизмам генетической рекомбинации генных сегментов (V-, J-, D- для тяжелых цепей иммуноглобулинов; V-, J- для легких цепей иммуноглобулинов и для α -, β -, γ -, δ -цепей Т-клеточных рецепторов) и гипермутагенеза. Однако сам по себе акт детекции антигенов (антигенных детерминант, эпитопов) рецепторами В- или Т-лимфоцитов не определяет биологический источник антигена, его чужеродность и потенциальную патогенность. Бактериальные и собственные антигены белковой природы организма хозяина хорошо распознаются рецепторной системой В- и Т-лимфоцитов. Адаптивный (защитный, протективный) характер антителообразования и (или) формирования специфически реагирующего на антиген клона Т-лимфоцитов возможен только при условии *реагирования* на чужеродные антигены (ксеноантигены), носителями которых, в частности, являются микробные клетки, вирусы, трансформированные и вирусинфицированные клетки. Какие взаимодействия в иммунной системе человека определяют биологическую природу источника антигена и адекватную направленность иммунного ответа организма после его внедрения?

В последние годы накапливаются экспериментальные данные и клинические наблюдения, свидетельствующие о том, что система врожденного иммунитета формирует сигналы, инструктирующие систему приобретенного (адаптивного) иммунитета. Основной сигнал исходит от *фагоцитирующих и антигенпрезентирующих клеток*, которые одновременно представляют антиген и секретируют цитокины (IFN α , IFN β , TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12) в ответ на распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов. Наряду с взаимодействием антигена с его рецептором этот сигнал является необходимым для адекватного реагирования клеток системы приобретенного иммунитета на патогены. Например, Т-лимфоциты с помощью

Т-клеточных рецепторов распознают антигены в комплексе с белками МНСII или МНСI, но на основе только лишь этого взаимодействия они не могут отличать «свое» от «несвоего», поэтому представление антигена само по себе еще недостаточно для активации Т-лимфоцитов. Для этого Т-лимфоциты должны получить второй стимулирующий сигнал. Таким сигналом могут быть, например, экспрессированные на поверхности антигенпредставляющих клеток (АПК) молекулы CD40-, CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2), а также целый спектр секретируемых ими цитокинов. Распознавание представляемого Т-лимфоцитам антигена в отсутствие CD80 или CD86 на поверхности антигенпредставляющих клеток приводит, как правило, либо к стойкой инактивации (анергии), либо к апоптозу Т-лимфоцитов.

Таким образом, реактивный или толерантный ответ Т-клеток в ходе распознавания антигенов зависит от уровня экспрессии на поверхности АПК CD40-, CD80- и CD86-молекул, который в свою очередь контролируется сигналами, исходящими от системы врожденного иммунитета. Когда Толл-подобные рецепторы АПК распознают ПАМП, клетки начинают экспрессировать CD80- и CD86-молекулы, т. е. их экспрессия происходит только в присутствии инфекционных (патогенных) агентов или продуцируемых ими соединений, которые детектируются ПРР. Аутоантигены не распознаются рецепторами врожденной иммунной системы, а потому они не индуцируют экспрессию CD80- и CD86-молекул на поверхности АПК, и, следовательно, при возможном контакте дендритных клеток или В-лимфоцитов с Т-хелперами последние не активируются или даже вступают на путь апоптоза. Благодаря этому механизму, организм не подвергается аутоиммунному поражению.

После активации Т-хелперы осуществляют контроль за активностью других звеньев приобретенного иммунитета: цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов. Таким образом, распознавание ПАМП, осуществляемое системой врожденного иммунитета, создает морфофизиологические предпосылки для формирования второго регулирующего сигнала, который при условии взаимодействия двух клеток, опосредованном рецепторами Т-лимфоцитов, является достаточным для активации последних. Таково одно из установленных в настоя-

щее время межклеточных взаимодействий между системами врожденного и приобретенного иммунитета.

При всей логичности рассматриваемой схемы многое в ней еще остается неясным. Так, взаимодействие ПАМП с антигенпредставляющими клетками (кроме В-лимфоцитов) происходит вне периферических лимфоидных органов, в которых осуществляется представление антигена Т- и В-лимфоцитам. Встает вопрос: что направляет проактивированные на периферии АПК в ближайшие лимфоузлы, где они осуществляют представление антигена Т-лимфоцитам? Это только один из вопросов, которые возникают при анализе рассматриваемых взаимодействий.

Во взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета важную роль играет *система комплемента*. По мнению ряда специалистов, иммунный ответ приобретенного иммунитета может быть адекватен (протективен) только при условии сопряженной активации некоторых механизмов врожденного иммунитета. В последние годы эта идея получила экспериментальное обоснование. И это, в частности, связано с изучением ДНК-вакцин, которые в перспективе, по-видимому, будут конкурировать в медицинской и ветеринарной практике с белковыми вакцинами. При исследовании модифицированных ковалентным связыванием с C3d-компонентом комплемента белковых антигенов было установлено, что последние становятся более иммуногенными по сравнению с неопсонированными антигенами. Адъювантный эффект C3d объясняют тем, что для этого производного комплемента на В-лимфоцитах и фолликулярных дендритных клетках есть рецептор CR2 (CD21). На В-лимфоцитах CR2 (CD21) комплексируется с CD19-молекулой, что обеспечивает более эффективное связывание антигена в комплексе с C3d и активацию иммунокомпетентных клеток. CD21 на фолликулярных дендритных клетках способствует развитию и поддержанию В-лимфоцитов памяти. Если в составе ДНК-вакцины против гриппа наряду с геммаглютинином есть три копии C3d, то это заметно усиливает ее протективные свойства, что было установлено на экспериментальной модели у мышей.

В молекулярно-генетических исследованиях на мышах показано, что дефицит рецепторов комплемента CD21 (CR2) и

CD35 (CR1), а также C3- и C4-компонентов комплемента ведет к заметному снижению гуморального иммунного ответа к Т-зависимым антигенам. Эти факты свидетельствуют о критической значимости системы комплемента и ее рецепторов в реализации некоторых иммунных реакций приобретенного типа, осуществляемых популяцией В1-лимфоцитов. Активация комплемента естественными антителами, маннозосвязывающим лектином и С-реактивным белком приводит к генерации анафилатоксинов (C5a, C4a, C3a), сборке на поверхности микробной клетки или вириона мембраноатакующего комплекса и к ковалентному связыванию производных C3-компонента комплемента (C3b, iC3d) с антигенами.

Ковалентное связывание C3d с антигенами играет ключевую роль в инициации реакций приобретенного иммунитета, так как такие антигены эффективно распознаются CD19/CD21/ТАРА-1 комплексом В-лимфоцитов, что является одним из необходимых условий для антителообразования. Важные в распознавании C3d-маркированных антигенов CR1 (CD35) и CR2 (CD21) экспрессируются как на В-лимфоцитах, так и на фолликулярных дендритных клетках. Благодаря этим рецепторам система комплемента является медиаторной между врожденным и приобретенным иммунитетом. Увеличение копий C3d, связанных с антигеном (яичный лизоцим кур), до 3 раз снижает иммуногенную дозу белка в 1000 раз. Кроме того, выяснено, что мыши, дефицитные по CD21 (CR2) и CD35 (CR1), имеют резко сниженное количество CD5⁺В1-лимфоцитов, которые продуцируют естественные (нормальные) антитела IgM.

Таким образом, система комплемента является фактором, регулирующим антителообразование, продукцию естественных антител IgM и формирование В-лимфоцитов памяти. Особенность C3d модифицированного антигена заключается в том, что он может взаимодействовать одновременно с рецептором антигена (BCR) и комплексом CD21/CD19/ТАРА-1 на поверхности В-лимфоцитов.

В опытах *in vitro* показано, что C3d-маркированные антигены снижают В-лимфоцитстимулирующую дозу в 10–100 раз. Ковалентное конъюгирование антигена с C3d является необходимым условием для активации и клонообразования узнающих

ство лимфоцитов популяции В-1, являющихся основным источником естественных (нормальных) IgM. С последними связывают эффективность защиты мышей от эндотоксического шока, поскольку они избирательно лигируют липополисахариды и способствуют их удалению из организма. Таким образом, между системой комплемента, активируемой по классическому пути либо нормальными (естественными) антителами IgM, либо менизосвязывающим лектином или С-реактивным белком и популяцией В1-лимфоцитов, являющейся основным продуцентом нормальных антител, существует двусторонняя связь, которая обеспечивает эффективность иммунной защиты от микробной инфекции и эндотоксического шока. Именно поэтому организмы, дефицитные по компонентам комплемента С3 и С4 или рецепторной системе В1-лимфоцитов (CD21/CD19/ТАРА-1), уязвимы в противостоянии микробной агрессии, вызываемой грамотрицательными бактериями.

Иммунная система человека и позвоночных животных состоит из двух взаимодействующих блоков — врожденного и приобретенного. *Морфологическим субстратом (носителем) приобретенного иммунитета являются Т- и В-клетки лимфоидной системы, которые несут структурно уникальные для каждого клона В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов рецепторы к антигенам.* Набор этих рецепторов исчисляется по оценкам разных специалистов от 10^9 до 10^{14} для рецепторов В-лимфоцитов (ВСН) и в диапазоне 10^7 – 10^8 для рецепторов Т-лимфоцитов (ТСН). В основе формирования столь огромного разнообразия специфических рецепторов к антигенам лежат молекулярно-генетические механизмы соматической рекомбинации генных сегментов и гипермутагенеза, происходящие в онтогенезе индивидуальной особи в ее центральных и периферических лимфоидных органах.

Образование рекомбинантов и мутантов носит стохастический (случайный) характер. Ежедневно возникают тысячи новых вариантов лимфоидных клеток, каждая из которых имеет только по одной, характерной для нее, специфически распознающей антигены варибельной области рецептора. В случае обилия во внутренней среде макроорганизма антигенов популяция являются факторами отбора тех лимфоидных клеток,

на поверхности которых к ним есть рецепторы. После взаимодействия антигена с рецептором возникает необходимое условие для последующих морфоиммунофизиологических реакций, которые приводят либо к иммунному реагированию, либо к иммунной толерантности. В первом случае из одной материнской лимфоцитарной клетки возникает популяция клеток, несущая рецептор к антигену (антигенной детерминанте) только одной специфичности. Эта совокупность клеток, избирательно реагирующая на индивидуальный антиген, получила наименование *клона*. Поэтому очень часто рассматриваемая форма иммунитета носит название клонального. Именно клональный отбор, инициируемый антигенами, является одним из базовых механизмов формирования приобретенного (адаптивного, клонального, антигенспецифического) иммунитета.

Становление клона лимфоцитов является необходимым условием для формирования резистентности к инфекции. Однако этот процесс требует для своего завершения минимум 3–5 дней, что, несомненно, является ахиллесовой пятой приобретенного иммунитета. При средней скорости размножения микробов в течение суток одна бактериальная клетка может дать около 10^8 потомков. Ясно, что при отсутствии механизмов защиты от инфекции, определяемых как механизмы врожденного иммунитета, выживание животных в среде, изобилующей потенциально патогенными микроорганизмами, было бы невозможным.

Начиная с простейших и примитивных многоклеточных животных (губки, кишечнополостные), в эволюции возникали и получили дальнейшее развитие механизмы защиты от инфекции, включающиеся экстренно (неотложно). Это в первую очередь механизмы неспецифической резистентности, как то: структурная целостность покровов и слизистых животных, кислая среда желудочного сока и пота, жирные кислоты, липиды сурфактанта.

Но наряду с этими факторами в организме животных существуют механизмы защиты от инфекции, составляющие блок *врожденного иммунитета*. Иммунные реакции врожденного типа формируются благодаря наличию у клеток этой системы специализированного распознающего патогены рецепторного

аппарата, отличного по химической природе и принципам формирования от рецепторов В- и Т-лимфоцитов. Компоненты микробных клеток вирионов, которые распознаются этими рецепторами, получили название патогенассоциированных молекулярных паттернов — ПАМП, а сами рецепторы — паттернраспознающих рецепторов — ПРР. Многие составляющие ПРР(М) известны достаточно давно. Это, в частности, рецепторы формилметиониловых пептидов, обеспечивающие эффективность инициальных стадий фагоцитарного процесса как основного клеточного механизма врожденного иммунитета. Другие представители ПРР(М) открыты относительно недавно, как то: некоторые сквенджер-рецепторы (СР), маннозный рецептор макрофагов, маннозо(маннан)связывающий белок, липополисахридсвязывающий белок, рецептор CR14, Толл-подобные рецепторы. Механизмы врожденного иммунитета включаются немедленно после инфицирования макроорганизма, а подчас и предупредительно (альвеолярные макрофаги) на поверхности слизистых и покровов, совместно с факторами неспецифической резистентности обеспечивая инактивацию патогенов.

В последние десятилетия достигнуты большие успехи в расшифровке эффекторных механизмов врожденного иммунитета, ответственных за нейтрализацию и элиминацию ПАМП и их носителей. В этих исследованиях доказана ведущая роль в инактивации микроорганизмов и оболочечных вирусов группы разнообразных по химической структуре пептидов (дефензины, протегрины, бактенецины, цекропины и др.) и белков (лизоцим, серпроцидины, бактерицидный проникаемостьувеличивающий белок, лактоферрин, пероксидазы и др.), продуцируемых фагоцитами и эпителиальными клетками. После длительного периода (50–80-е гг. XX в.) недооценки рассматриваемых механизмов иммунной защиты против инфекции в наши дни наблюдается формирование современной иммунологической парадигмы, неотъемлемым и базовым элементом которой является концепция о врожденном (естественном по И. И. Мечникову) иммунитете.

Как было подчеркнуто ранее, основное различие между системами врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета заключается в механизмах распознавания патогенов,

осуществляемого этими блоками иммунной системы. Активация приобретенного иммунитета инициируется в результате антиген-специфического реагирования, а врожденного иммунитета — в результате взаимодействия с патогенассоциированными молекулярными паттернами.

В то же самое время не случайно, что в ходе эволюции у животных возникли и совершенствовались механизмы детекции инфекционных агентов именно по этим патогенассоциированным молекулярным паттернам. Это очень точный механизм обнаружения «несвоего», к тому же, с генетической точки зрения, экономичный, так как для его реализации необходимо всего несколько десятков генов (20–40), ответственных за синтез рецепторных белков (ППР). В дополнение к этому, передача этих генов по наследству через половые клетки стабильно сохраняет в эволюции систему эффективной дискриминации «свое»/«несвое».

Передача по наследству генов, ответственных за синтез белков системы распознавания ПАМП, является необходимым условием выживания того или иного вида животных. Специфичность рецепторов, распознающих ПАМП, генетически детерминирована, поскольку гены, в которых заложена информация об их структуре, передаются из поколения в поколение половым путем. В связи с этим следует подчеркнуть, что все разнообразие рецепторов В- и Т-лимфоцитов, распознающих антигены, формируется в онтогенезе позвоночных и, несомненно, благоприятствует их выживанию. Но единожды приобретенный организмом спектр рецепторов В- и Т-лимфоцитов не передается по наследству. В онтогенезе позвоночных каждый раз заново должен формироваться реестр адаптивных рецепторов, распознающих антигены патогенных микроорганизмов и вирусов.

Таким образом, стратегия иммунного распознавания системой врожденного иммунитета базируется не на детекции тонких различий антигенов (например, 0-антигенов), а на избирательном связывании микробных макромолекул с консервативной структурой — патогенассоциированных молекулярных паттернов (молекулярных матриц, шаблонов), свойственных одновременно большим группам микроорганизмов. Это обес-

получает эффективное фокусирование элиминационных механизмов (фагоцитоз, продукция антимикробных пептидов и белков, система комплемента) врожденного иммунитета на носителях ПАМП и протективный характер защитных реакций, осуществляемых рассматриваемой иммунной системой. Структурно паттернраспознающие рецепторы разнообразны и принадлежат к нескольким семействам белков.

Часто в распознавании ПАМП участвуют домены СР, лектинов С-типа и структуры с лейцинобогатыми повторами (Толл-подобные рецепторы, NOD-белки). Функционально ПРР могут быть подразделены на три группы: *секреторные, эндцитирующие и сигнальные*. Наиболее охарактеризованным рецептором ПАМП первого типа является маннозо(маннан)связывающий лектин (белок) (МСЛ, МСВ), который распознает ПАМП, формирующийся терминально расположенными в углеводных цепях олигосахарами, пептидогликанами, гликолипидами и гликопротеидами и остатками D-маннозы, L-фукозы, D-N-ацетил глюкозамина. Высокоаффинно фиксируясь на поверхности микробных клеток-мишеней и некоторых вирусов, МСЛ опосредует их для рецептор-опосредованного (через С1qR) фагоцитоза нейтрофилами и моноцитами/макрофагами и/или активирует систему комплемента по лектиновому пути, сочетающему признаки классического и альтернативного путей активации комплемента. Эндцитирующие ПРР расположены на цитоплазматической мембране фагоцитов, они распознают ПАМП, локализованные на поверхности микробных клеток и вирусов. Это СР и маннозный рецептор макрофагов. Последний является рецептором С-лектинового типа. Распознавание ПАМП сигнальными рецепторами инициирует продукцию клетками иммунной системы комплекса цитокиновых молекул и антибиотических пептидов. Наиболее известными рецепторами этой группы являются Толл-рецепторы беспозвоночных и Толл-подобные рецепторы млекопитающих и человека.

Все большее подтверждение получает концепция Джензак о важности системы врожденного иммунитета в реализации начальных стадий некоторых реакций приобретенного иммунитета. Активация ряда механизмов врожденного иммунитета, ведущая к продукции противовоспалительных

цитокинов и антибиотических пептидов, обеспечивает инструктирующими сигналами иммунные реакции приобретенного типа. Привлекает внимание то обстоятельство, что по данным иммунологических исследований, образование антител на растворимые Т-зависимые антигены невозможно без использования адъювантов. Компонентами полного адъюванта Фрейнда, традиционно используемого для получения антител, являются вещества клеточной стенки микобактерий. Именно микробные вещества распознаются системой рецепторов врожденного иммунитета, реагирование которой в форме продукции цитокинов, антимикробных пептидов и ряда острофазовых белков обеспечивает последующее формирование протективного (адекватного) иммунного ответа приобретенного типа. Цитокины (ИЛ-1, ИЛ-12, ФНО α и др.) обеспечивают необходимые дополнительные молекулярно-клеточные взаимодействия, определяющие эффективность клонообразования лимфоцитов и клеточный или гуморальный иммунный ответ приобретенного типа.

Кроме продукции и секреции цитокинов макрофагами и естественными киллерами, присоединение некоторых компонентов комплемента к антигену, вовлечение микробными антигенами лектиновых рецепторов антигенпредставляющих клеток, поддержка антиген-реактивных Т-лимфоцитов, индукция экспрессии В7.1 и В7 на антигенпрезентирующих клетках являются взаимодополняющими путями реализации воздействий системы врожденного иммунитета на иммунные реакции приобретенного типа. Так, например, В7.1- и В7.2-белки на поверхности антигенпредставляющих клеток (активация экспрессии которых имеет место под воздействием липополисахаридов), взаимодействуя с рецепторами Т-лимфоцитов, обеспечивают формирование «второго сигнала» (первым является взаимодействие антиген-рецептор антигена), необходимого для последующего клонообразования и формирования протективного иммунного ответа. Синтез белка макрофагами и дендритными клетками инициируется через активацию Толл-подобных рецепторов. Так возникают сети коммуникаций между врожденным и приобретенным блоками иммунной системы у млекопитающих.

Этот «второй сигнал», обеспечивающий связь двух блоков системы, является результатом распознавания «несвоего» рекогносцировочной системой врожденного иммунитета и реагирования на него клеток иммунной системы. Возможно, что в ходе расшифровки этих связей мы будем продвигаться от предположений о «несвоем—своем» к классификации «инфекционное—неинфекционное», «вредное—безвредное», «патогенное—свое».

Значимость системы врожденного иммунитета позвоночных определяется ее незаменимой, осознаваемой только в настоящее время ролью в процессе дискриминации «свое—несвое». Именно этот процесс в значительной степени определяет реактивный или толерогенный характер ответа на антигены со стороны системы механизмов приобретенного иммунитета. При этом ключевую позицию в рецепторном аппарате системы врожденного иммунитета, детектирующим «несвое», занимают Толл-подобные рецепторы, взаимодействие лигандов с которыми запускает путь трансдукции сигнала, завершающийся транслокацией транскрипционного фактора NF κ B в ядро и активацией группы генов, которые ответственны за синтез антимикробных пептидов, цитокинов и ряда белков острой фазы. Одни из этих веществ ответственны за информирование блока механизмов приобретенного иммунитета о необходимости реализации своей физиологической защитной функции, другие осуществляют эффекторную функцию по нейтрализации и элиминации патогенов.

Многообразие рецепторов системы приобретенного иммунитета является несомненным достоинством, обеспечивающим точное распознавание антигенных детерминант (эпитопов, сигнатур).

Узнаваемость этой рекогносцировочной системы состоит в том, что сама по себе, без инструкций от системы врожденного иммунитета, она далеко не всегда способна детектировать биологическую природу источника антигена, т. е. дискриминировать «свое» от «несвоего» (чужеродного). Процесс дискриминации является многоступенчатым (многоактным), в котором обязательно участие в нем определенных механизмов врожденного иммунитета. Рецепторный аппарат

системы врожденного иммунитета при относительной ограниченности составляющих его молекул (всего несколько десятков) в состоянии более однозначно осуществлять распознавание «несвоего» (чужеродного).

Таким образом, система механизмов врожденного иммунитета обеспечивает неотложное иммунное реагирование организма на инфекцию. Она осуществляет эффективное распознавание инфекционных агентов и их элиминацию у преобладающего числа видов живого мира на протяжении его длительной эволюции, включая и растения. Часто в качестве довода, характеризующего несовершенство этой системы защиты от инфекции, говорят об отсутствии у нее феномена «памяти» (усиленного иммунного ответа при реинфицировании). Однако это представление является не совсем обоснованным, так как рассматриваемая система защиты реализует механизмы видовой, а не онтогенетической генетической памяти в полной мере и практически без латентного периода уже при первичном инфицировании. В реагировании животных организмов на инфекцию задействованы сотни генов, передающихся неизменными из поколения в поколение через половые клетки. Эти гены ответственны за синтез рецепторных (паттернраспознающие рецепторы) и эффекторных (антимикробные пептиды и белки, комплемент) молекул, и в отличие от генов иммуноглобулинов, рецепторов В- и Т-клеток экспрессируются конститутивно либо в первые же минуты/часы после инфицирования. Именно эти особенности формирования иммунитета позволяют его характеризовать как врожденный, т. е. присутствующий от рождения и независимый от сложного процесса соматической рекомбинации генных сегментов, ответственной за реализацию механизмов приобретенного иммунитета.

ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ

Система факторов наследственной устойчивости животного организма представлена: а) механическими и физико-химическими барьерами; б) сывороточными белками и ферментами; в) фагоцитарной реакцией клеточных элементов; г) воспалительной реакцией; д) реакцией лимфоидной системы, связанной с синтезом иммуноглобулинов, повышенной чувствительностью замедленного или немедленного типа и иммунологической толерантностью; е) реакцией антиген-антитело.

Механические и физико-химические барьеры. Механическую защитную функцию выполняют покровы тела, т. е. кожа, слизистые оболочки, эпителий дыхательных путей. Многие микроорганизмы, попадая на поверхность тела животного, не находят благоприятных условий для роста и размножения и отторгаются вместе с эпидермисом — поверхностным слоем эпителия. Существенным препятствием для микробов является *респираторный эпителий*, выстилающий дыхательные пути. Находясь в непрерывном движении, реснички эпителия удаляют и удаляют наружу инородные частицы и микроорганизмы. Функция эпителия — препятствовать проникновению микробов в нижележащие ткани — дополняется рядом других антибактериальных агентов, способных убивать или задерживать развитие многих организмов. Кислая среда секрета, выделяемого потовыми и сальными железами на поверхность кожи, неблагоприятно действует на многие виды микроорганизмов. Кроме того, в выделениях сальных желез содержатся насыщенные жирные кислоты, а также много солей. Кожа

через поры выделяет вещества, бактерицидные для гемолитических стрептококков, кишечной и паратифозной бактерий. Интересно, что бактерицидные свойства кожи тем выше, чем чище кожа — через загрязненную кожу проникает меньше убивающих микробы веществ. Соли на поверхности кожи обуславливают высокое осмотическое давление, губительно действующее на микроорганизмы.

Слизистые оболочки являются менее надежной защитой, чем кожа, это может объяснить тот факт, что большинство микроорганизмов и вирусов проникает в организм через слизистые покровы. Их защитными средствами являются: слизь и реснички мерцательного эпителия на слизистых верхних дыхательных путей и бронхов, механически удаляющие бактерий; лизоцим, убивающий микрококков, гемолитических стрептококков, менингококков; ингибин — белковый субстрат, бактерицидный для ряда бактерий. Сообщающиеся со слизистыми железы вырабатывают и различные бактерицидные и противовирусные вещества, губительно действующие на микробов. Известно, что слюна бактерицидна для ряда микроорганизмов. Факторами бактерицидности в слюне является лизоцим, ингибин, перекись водорода, выделяемая некоторыми представителями микрофлоры полости рта. Пищеварительные ферменты желудочного и кишечного сока убивают возбудителей бруцеллеза, дизентерии, паратифа, задерживают рост туберкулезных бактерий. В секрете слезных желез имеется большое количество лизоцима и, весьма возможно, другие бактерицидные вещества. Кроме того, поверхности слизистых оболочек омываются выделяющимися из крови и лимфы противобактериальными и противовирусными веществами, в том числе и антителами, что до известной степени также защищает организм от инфекции. Наконец, в слизистых оболочках много белых кровяных телец, лейкоцитов, основная функция которых — защищать организм животного от возбудителей различных болезней.

Важную роль в защите организма выполняет лимфоидная ткань, которой богат желудочно-кишечный тракт. Наличие слизи на поверхности оболочек дыхательных путей, генитального тракта препятствует проникновению микроорганизмов,

так как в слизи содержится много веществ, ингибирующих жизнедеятельность микроорганизмов.

В *желудочно-кишечном тракте* в связи с высокой кислотностью содержимого желудка создаются неблагоприятные условия для попадающих туда микроорганизмов. Часть тонкого и толстого отделов кишечника, наоборот, содержит большое количество микроорганизмов. Однако это в основном комменсальные организмы. Благодаря большой численности, способности эффективно усваивать питательные вещества, усиленно расти и размножаться, они препятствуют размножению болезнетворных видов.

Что происходит, когда какая-то часть тканей организма животного становится объектом инвазии (нападения) бактерий, преодолевает поврежденную кожу или слизистую оболочку, т. е. внешне линию защиты, проникая в подкожную клетчатку или подслизистые ткани? Состояние резистентности животных к инфекции формируется многочисленными механизмами организмами, в том числе и иммунными. Основная функция иммунной системы заключается в распознавании и ликвидации инвазионных агентов, выделяемых ими продуктов, а также в уменьшении причиняемого ими вреда (Ройт и др., 2000).

Иммунный ответ состоит из распознавания возбудителя или иного чужеродного материала и в разветвлении цепи реакций, направленных на их устранение. В широком смысле все разнообразие форм иммунного ответа можно разделить на два типа — врожденные и приобретенные реакции. Основное различие между этими типами иммунореактивности состоит в механизмах распознавания «несвоего» (чужеродного, патогенного). Приобретенный (адаптивный) иммунитет специализируется на детекции индивидуальных структурных особенностей каждого конкретного инфекционного агента или вещества (антигенных детерминант, или эпитопов), несущих признаки генетической чужеродности (Петров, 1982), в то время как врожденные механизмы врожденного иммунитета определяют стереотипные и консервативные в эволюции молекулы микроорганизмов, присущие одновременно большим систематическим группам микробов. Эти молекулы получили в современной иммунологической литературе название

«патогенассоциированных молекулярных паттернов» (ПАМП), а распознающие их структуры животных клеток и жидкостей — «паттернраспознающих рецепторов (молекул)» (ПРР). Именно в свете этой концепции будут рассматриваться далее вопросы, связанные с распознаванием «несвоего» механизмами врожденного иммунитета.

В ходе эволюции у животных возникли и прошли отбор многочисленные механизмы защиты от инфекций. Ведущими среди них следует считать иммунные, для которых характерно распознавание молекулярных структур вирусов и микробных клеток, обозначенных как патогенассоциированные молекулярные паттерны, специализированными рецепторами. Патогенассоциированные молекулярные паттерны представляют собой типовые макромолекулы, свойственные одновременно целым группам микроорганизмов (липид А липополисахаридов грамотрицательных бактерий, пептидогликаны клеточной стенки бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, формилметиониловые пептиды как N-концевые фрагменты синтезируемых бактериями белков, белок бактериальных жгутиков флагеллин, неметилованные по цитозину CpG пары ДНК микроорганизмов, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов). Это, как правило, консервативные в эволюции в структурном отношении молекулы, выполняющие стереотипные жизненно важные функции микроорганизмов и вирусов. В силу этого возможные изменения в этих структурах резко снижают жизнеспособность микробов, а поэтому не закрепляются в эволюции естественным отбором. Необходимо также подчеркнуть, что большинство рассматриваемых ПАМП свойственны миру микроорганизмов (бактерии, низшие грибы, простейшие) и вирусов. По их избирательному узнаванию паттернраспознающими рецепторами (ПРР) осуществляется одноактная точная дискриминация инфекционного «несвоего» от неинфекционного «своего». Как это ни кажется на первый взгляд парадоксальным, рассматриваемая система различения «несвоего» (чужеродного) от «своего» механизмами врожденного иммунитета является часто не менее эффективной, чем основанная на детекции антигенов рецепторами В- и Т-лимфоцитов позвоночных животных. Взаимодействие

ПАМП с ПРР однозначно детектирует инфекционную (патогенную) природу первых, что далеко не всегда имеет место при более аффинных взаимодействиях рецепторов В- и Т-лимфоцитов (BCR, TCR) с антигенами.

ПАМП являются инвариантными (консервативными) макромолекулами различной химической природы, как то: липид А липополисахаридов, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны, терминально локализованные в гликолипидах, полисахаридах и гликопротеинах остатки D-маннозы и L-фукозы, N-ацетилметиониловые пептиды, флагеллин, неметилированные по цитозину CpG пары ДНК бактерий, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов. Они детектируются ПРР (молекулами) клеток иммунной системы животных, что обеспечивает запуск эффекторных (нейтрализующих и элиминирующих патогены) механизмов врожденного иммунитета. ПРР (молекулы) могут быть представлены как гуморальными (маннозосвязывающий лектин, липополисахаридсвязывающий белок, пептидогликанраспознающие белки, компоненты системы комплемента, антибиотические пептиды и белки), так и клеточными (связанными молекулами (рецепторы комплемента, макрофагальный маннозный рецептор, Толл-подобные рецепторы, NOD белки, сквенджер-рецепторы). Рассматривая эволюционное происхождение этих молекул, необходимо отметить, что многие из них или их предковые формы имеют отношение к мезоэволюционным процессам (резорбция, метаморфоз, апоптоз), и их участие в иммунных реакциях формируется в результате межмолекулярных взаимодействий в каждой конкретной ситуации, связанной с необходимостью обеспечения стерильности внутренней среды животного организма. Наряду с этим ряд эффекторных механизмов иммунной системы осуществляет поддержание оптимального развития микробиоты (нормальной микрофлоры) на уровне слизистых оболочек и покровов животного. Все эти моменты важно учитывать при анализе функциональных проявлений системы врожденного иммунитета в филогенезе и эволюции животного мира. Эта древняя, но далеко не примитивная система детектирования патогенного «чуждого» и измененного «своего», например, при апоптозе является базовой и в противои инфекционном иммунитете

позвоночных. Она обеспечивает как эффективность элиминационных механизмов врожденного иммунитета, так и адекватную (протективную) направленность реакций приобретенного (адаптивного) иммунитета. Параллельно системе ПРР в организме животных развивалась система межклеточных взаимодействий, базирующаяся на адгезионных молекулах. Последние играют не только важную роль в морфогенетических процессах многоклеточных животных, но и в становлении у них ряда реакций иммунной защиты.

МОЛЕКУЛЫ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ В ИММУНИТЕТЕ ЖИВОТНЫХ

Межклеточная и клеточно-субстратная формы адгезии лежат в основе формирования тканей (морфогенеза) и обеспечивают отдельные стороны иммунных реакций животного организма. Адгезия, или прилипание, определяет организацию эпителиев и их взаимодействие с базальной мембраной. Это примеры стабильных клеточно-клеточных и клеточно-субстратных форм адгезии соответственно. В иммунной системе подобные взаимодействия часто носят преходящий характер. Межклеточная адгезия клеток крови, а также клеток крови к другим клеткам, инфекционным организмам и межклеточному матриксу имеет место при фагоцитозе и воспалении в заметных масштабах. У беспозвоночных клетки крови благодаря адгезии формируют капсулы вокруг крупных паразитов и узелки в областях скопления микроорганизмов. Рецепторы и лиганды, участвующие в адгезии, интенсивно изучаются.

Есть основания рассматривать интегрины в качестве наиболее древней в эволюции группы адгезионных молекул; некоторые из них обеспечивают отдельные стороны клеточно-клеточных и клеточно-эндотелиальных взаимодействий, важных в реализации иммунных реакций организма. Интегрины являются двусубъединичными белками, ассоциированными с цитоплазматической мембраной эукариотических клеток. Интегрины $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ участвуют в фагоцитозе патогенов и клеточного дебриса, опсонизированных фибронектином и (или) витронектином. Как правило, поглощение этих объектов важ-

но при поступлении второго сигнала, формируемого в экспериментальных условиях при активации протеинкиназы фторболовыми эфирами. Лигирование интегрина в нейтрофилах активирует опосредованный фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода клеткой. Необходимо отметить, что лиганды интегринов, несмотря на свое структурное разнообразие, часто содержат последовательность из 3 аминокислот — аргинин, глицин, аспарагиновая кислота (RGD), или мотив адгезии, который распознается интегринами. В связи с этим в экспериментальных условиях очень часто синтетические RGD-содержащие пептиды проявляют в зависимости от постановки опытов либо свойства агонистов, либо ингибиторов лигандов интегринов.

У беспозвоночных роль адгезионных молекул наиболее обстоятельно изучена при исследовании развития нервной системы дрозофилы и морфогенеза нематоды. У них выявлено большинство представленных у позвоночных адгезионных рецепторов и их лигандов, за исключением селектинов. Все эти молекулы в той или иной степени участвуют в процессах адгезии, которые обеспечивают и иммунные реакции беспозвоночных. Наряду с ними у некоторых беспозвоночных выявлены также молекулы, как пероксинектин и пептид расплывания (spreading) плазмочитов, которые также участвуют в адгезионных процессах.

У раков достаточно хорошо изучена система адгезионных молекул и их роль в иммунитете. Речь, в частности, идет о белках клеток крови раков. У них открыт белок пероксинектин, являющийся одним из лигандов адгезионных взаимодействий. Его молекулярная масса составляет около 76 кДа, и он ответствен за адгезию и расплывание клеток крови рака. В составе этого белка есть существенный по размерам домен, гомологичный по структуре и функции миелопероксидазе позвоночных. Таким образом, молекула пероксинектина сочетает в себе свойства адгезионных и пероксидазных белков. В С-концевой области пероксинектина, в составе его пероксидазного домена, известен KGD (лизин, глицин, аспарагиновая кислота) последовательность, которая предположительно участвует в адгезии и в связывании с интегринами. Пероксинектин стимулирует процессы инкапсуляции и фагоцитоза. Как адгезионная, так и

пероксидазная активности пропероксинектина после его секреции из клеток активируются в присутствии липополисахаридов или β -1,3-гликанов, что связывают с действием сериновых протеиназ на пропероксинектин. Интегрин является, по-видимому, рецептором пероксинектина. Кроме интегрина, пероксинектин может связываться еще и с другими белками клеточной поверхности. К последним принадлежит, в частности, (Cu, Zn)-супероксиддисмутаза, являющаяся поверхностным, нетрансмембранным белком цитоплазматической мембраны. Взаимодействие двух белков может быть особенно важным в случае продукции антимикробных производных.

Сахара осуществляют стабильную тканеспецифическую межклеточную адгезию, обеспечивают клеточно-эндотелиальную адгезию, клеточно-клеточную адгезию, активацию синтеза острофазовых белков, лежат в основе клеточно-матриксной адгезии, лейкоцитарно-эндотелиальной адгезии, агрегации тромбоцитов, хоминга лимфоцитов, движения (перемещение, роллинг) лейкоцитов по эндотелиальной поверхности.

Пероксинектин-подобные белки выявлены и у других членистоногих. Из клеток крови креветки выделена кДНК, на 78% идентичная ДНК пероксинектина рака. В ее составе есть последовательность нуклеотидов, кодирующая последовательность, полностью гомологичную в сравниваемых белках. 80 кДа-белок из клеток берегового краба и 90 кДа-белок таракана также сходны с пероксинектином структурно и функционально, стимулируя адгезию и фагоцитоз. Из клеток дрозофилы также выделена кДНК, ответственная за синтез предполагаемой пероксидазы. Кроме того, у нее известен 170 кДа-белок внеклеточного матрикса, имеющий пероксидазный, Ig-подобный, лейцин-богатый и проколлаген-богатый домены. У круглого червя также обнаружены гомологичные пероксидазные последовательности. Для миелопероксидазы (МПО) человека также продемонстрирована способность поддерживать клеточно-молекулярную адгезию моноцитов и нейтрофилов, но не недифференцированных клеток линии HL-60. Адгезивным рецептором для МПО предположительно является интегрин или рецептор комплемента третьего порядка. Предполагается, что за рассматриваемые свойства МПО ответственна последователь-

ность, гомологичная соответствующему фрагменту молекулы пероксинектина. Есть основания предполагать, что секретировавшая нейтрофилами МПО является эндогенным лигандом его $\alpha\text{v}\beta_2$ -интегрина. Это предположение поддерживается наблюдением, в котором установлена способность антител к МПО человека подавлять адгезию цитокин-примированных нейтрофилов на пластике и коллагене. Не исключено, что взаимодействие пероксидаз с интегринами имеет место уже у первых многоклеточных животных — губок, так как у них обнаружены и интегрины, и пероксидазы.

Интегрины беспозвоночных вовлечены в такие иммунные функции, как инкапсуляция и формирование узелков. Это положение поддерживается опытами с RGD-пептидами на членистоногих, моллюсках и иглокожих. RGD-пептиды подавляют клеточное распластывание, инкапсуляцию, агрегацию и формирование узелков. У беспозвоночных известно еще несколько типов белковых молекул, которые способствуют клеточно-клеточной и клеточно-субстратной адгезии. Это, например, 18 кДа гемагглютинин клеток крови мечехвоста. Этот агрегатирующий агрегационный фактор имеет структурную гомологию с 22 кДа-белком внеклеточного матрикса человека — дермалгопонином. Гемоцитин из клеток крови шелкопряда также индуцирует агрегацию клеток крови, т. е. является гемагглютинином. Этот белок содержит домен, сходный с таковым фактора Ван Виллибрандта, который участвует в гемостазе у млекопитающих, а также область, подобную лектину C-типа.

Другой тип адгезионных молекул, известных как селектины, выявлен у позвоночных животных. Селектины в своей структуре содержат лектиновый домен. Они связывают клеточно-ассоциированные сахара — лиганды — и инициируют преобразование начальные взаимодействия клеток крови, мигрирующих в очаги воспаления, с эндотелием. Активация клеточной адгезии может иметь место только при синтезе определенных адгезионных молекул и/или их переносе на поверхность взаимодействующих клеток. Адгезионные рецепторы могут быть активированы по так называемому «inside-out-signaling»-пути, в котором цитоплазматические факторы, взаимодействуя с цитоплазматическими доменами рецепторов, активируют

внеклеточные лигандсвязывающие сайты последних. Так, например, осуществляется увеличение аффинитета интегринов тромбоцитов к фибриногену, достигаемое агонистами, которые инициируют рассматриваемый процесс на уровне цитоплазмы тромбоцитов.

Необходимо подчеркнуть, что многие адгезионные молекулы (кадхерины, интегрины, селектины и Ig-подобные белки) участвуют в морфогенетических процессах, а их вовлечение в иммунные реакции является частным проявлением этой важной функции. И хотя, как правило, эти молекулы не участвуют непосредственно в распознавании ПАМП, тем не менее они обеспечивают возможность мобилизации клеток иммунной системы в области проникновения микроорганизмов. В этом заключается их важная функциональная роль в обеспечении иммунных реакций у животных. Именно экспрессия адгезионных молекул на клетках иммунной системы, эндотелии и эпителиях в значительной степени способствует неотложному характеру мобилизации противoinфекционных механизмов врожденного иммунитета животных.

СУПЕРСЕМЕЙСТВО СКАВЕНДЖЕР-РЕЦЕПТОРОВ

Скавенджер-рецепторы (СР) представляют собой группу мембранассоциированных рецепторов, которые участвуют не только в обеспечении удаления (клиренса) структурно модифицированных и функционально неполноценных молекул внутренней среды животного организма, но и в детекции некоторых патогенассоциированных молекулярных паттернов. СР широко распространены в природе, их структурно-функциональные свойства изучены у многих представителей животного мира. Они подразделяются на А, В и С классы. Первый класс был известен уже в 1979 г., он включает в себя следующих основных представителей: SR-AI, SR-AII и MARCO. Первоначально была описана способность этих рецепторов распознавать химически модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛПНП), в дальнейшем набор изученных лигандов для этих рецепторов расширился. Эти ли-

ганды являются, как правило, полианионными соединениями (ацетилированные или окисленные ЛПНП, полиинозинат и полигуаниловая кислоты, малеилированный бычий сывороточный альбумин, фукоидан, декстран сульфат, каррагинан, фосфатидилсерин и поливинил сульфат). Из микробных компонентов лигандами СР являются липид А липополисахаридов и липотейхоевые кислоты. Связывание липополисахаридов (ЛПС) с СР является одним из механизмов удаления из внутренней среды животных эндотоксинов, не сопровождаемого освобождением провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12). Рецептор MARCO способен связывать напрямую неопсонизированные грамположительные и грамотрицательные бактерии, опосредуя таким образом их фагоцитоз.

Недавно японскими исследователями была открыта новая группа СР, подобная классу А, но отличающаяся от последнего присутствием домена, который охарактеризован как лектин С типа — SR-CL1. SR-CL1 в опытах *in vitro* также избирательно связывает такие бактерии, как *E. coli* и *S. aureus*.

Группу В СР представляет белок CD36. Он распознает модифицированные белки (тромбоспондин, коллаген), длинноцепочечные жирные кислоты, окислительно-модифицированные ЛПНП. CD36-молекула встречается уже на гемоцитах плодовой мушки и известна под названием *croquemort*, что в переводе с французского означает «ловец смерти». Ее роль у дрозофилы доказана пока в эмбриогенезе и апоптозе, но не в иммунитете. Фагоцитоз микробов, опосредованный CD36, как правило, сопряжен с продукцией провоспалительных цитокинов макрофагами.

У человека СР экспрессированы преимущественно на макрофагах и дендритных клетках и в меньшей степени на некоторых эндотелиальных клетках. Основная их функция заключается в улавливании и эндоцитировании во внутренней среде организма модифицированных молекул и апоптотических клеток. В последнее время накапливаются данные об их участии и в иммунных реакциях врожденного типа. Они опосредуют связывание и фагоцитоз микроорганизмов и их компонентов (липотейхоевые кислоты — ЛТК, липополисахариды, ДНК

микробов). Это дает основание некоторым исследователям считать СР одной из наиболее древних групп паттернраспознающих рецепторов, участвующих в детекции патогенассоциированных молекулярных паттернов (ЛПС, ЛТК).

СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПЕНТРАКСИНОВ В РЕАЛИЗАЦИИ ЗАЩИТНЫХ РЕАКЦИЙ ЖИВОТНЫХ

Пентраксины являются семейством белков, встречающихся у беспозвоночных и позвоночных животных. Наиболее изученными представителями этой группы соединений являются С-реактивный белок (СРВ) и сывороточный амилоид Р (САП). Характерной структурной особенностью этих белков является их олигомерное строение. Олигомеры функционально полноценных белков формируются из 5 или 10 идентичных субъединиц, образующих молекулу с пентамерной радиальной симметрией. Благодаря такой организации функционально активных молекул белков СРВ и САП они получили наименование пентраксины. Особенностью пентраксинов как белков является их высокая устойчивость к протеолитическому действию.

Все пентраксины способны к кальцийопосредованному связыванию разнообразных по химической природе лигандов. С-реактивный белок был открыт как протеин плазмы крови человека, способный высокоаффинно связывать С-полисахарид пневмококка, в связи с чем он и получил свое название. Связывание полисахарида осуществляется через остатки фосфохолина, а не сахаров клеточной стенки бактерий. Слабее СРВ может лигировать и углеводы, такие как агар и другие галактаны. В силу этого СРВ можно рассматривать и в качестве специализированного С-лектина. САП распознает в молекулах-мишенях фосфозаноламин, а не фосфохолин, а также избирательно взаимодействует с агарозой, галактозил-галактозидами, зимозаном, фосфоманнаном и сульфатированными гликозаминогликанами. В дополнение к этому, САП, очевидно, связывает ДНК и фрагменты хроматина. Возможно, что связывание и удаление внеклеточного хроматина является одной из его физиологических функций.

СРБ также может связываться при определенных условиях с липопroteидами низкой и очень низкой плотности, а САП — с растворимым фибронектином, С4-связывающим белком и фиксированным iC3b.

СРЕ и САП способны активировать классический путь комплемента без участия антител благодаря взаимодействию с компонентом комплемента C1q, что делает их реальными участниками системы механизмов врожденного иммунитета.

Из возможных углеводных лигандов, связываемых САП, наиболее изученным является метил 4,6-О(1-карбоксииэтилен)-βD галактопиранозид (МОβDG) — компонент агарозы. Связывание САП с МОβDG опосредовано двумя ионами кальция (Ca^{2+}). Олигомерная структура САП, включающая 10 субъединиц, обеспечивает мультивалентное, а, следовательно, высокоаффинное связывание с углеводными соединениями. Подобным же образом он связывает фосфоэтанолламин. Физиологическое значение этой реакции до настоящего времени неясно.

Олигомерная структура СРБ человека представляет собой пять нековалентно связанных идентичных субъединиц с молекулярной массой около 23 кДа, которые расположены радиально, образуя по периферии диск. САП человека состоит из 10 гликозилированных субъединиц с молекулярной массой в пределах 19–30 кДа каждая, формирующих два идентичных диска, которые взаимодействуют друг с другом лицевой поверхностью, обеспечивая при этом максимальные стерические условия для кальцийопосредованного связывания лигандов. Субъединицы САП гликозилированы по аспарагину-32.

Одним из древнейших гомологов СРБ человека является белок из гемолимфы подковообразного краба, известный как лимулин. И хотя он имеет определенную гомологию с пентрактинными позвоночных, он является, скорее всего, по своей функциональной активности, С-лектином, избирательно связывающим сигнальные кислоты, которые представляют собой нормальные углеводные компоненты гликокаликса высших эукариот. Лимулин присутствует в гемолимфе мечехвостов в концентрации 0 мг/мл. Кроме того, он состоит из 6 или 12 субъединиц и формирует «диски» из 6 субъединиц, т. е. является, строго говоря, гексаксацином.

Есть основания считать, что наряду с очевидным участием рассматриваемых белков в связывании и удалении (клиренсе) из животных организмов компонентов стареющих и некротических клеток (санационная функция), СРБ и САП причастны к реализации некоторых реакций врожденного иммунитета, функционируя как опсонины и активаторы классического пути комплемента. Нельзя недооценивать того факта, что при инфицировании человека и животных содержание СРБ в плазме может возрастать более чем в сотни раз. При этом многофункциональность одного из ведущих реактантов острой фазы может обеспечивать различные защитные реакции организма: связывание полисахаридов, активацию комплемента и функциональной активности нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и естественных киллеров (НК-клеток). В связи с этим представляет интерес вопрос не только о природе лигандов, но и в ряде случаев о возможных рецепторах пентраксинов в организме, который пока остается открытым, хотя предполагает участие в избирательном связывании СРБ клетками иммунной системы FcγR1 и рецептора, специфичного для СРБ (CRP-R).

ЛЕКТИНЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ РЕКОГНОСЦИРОВОЧНОГО ЗВЕНА СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЖИВОТНЫХ

За распознавание углеводных компонентов микробных клеток и вирионов ответственна обширная группа белков, известная как лектины. Термин введен в научную литературу известным иммунологом У. Бойдом в 1954 г. Лектины (от лат. *legere* — различать, выбирать) — группа широко распространенных в эволюции живого мира белков, участвующих в большом круге биологических процессов, — были открыты Х. Штильмарком в 1888 г. в Дерптском университете. Он разработал метод выделения и описал свойства белка из клецвины, который назвал рицином. Лектинам присуща углеводраспознающая активность, обеспечивающая избирательные межмолекулярные взаимодействия в морфогенетических процессах, частным проявлением которых можно считать и им-

мунные. Анализируя обширный материал по этой группе белков, присутствующих у всех представителей животного мира, необходимо отметить, что их участие в иммунных реакциях является одним из частных проявлений их обширного функционального потенциала. Избирательное (селективное) узнавание сахаров в составе клеточных оболочек микробов обеспечивает дискриминацию «своего» от «несвоего», определяющую точность (прицельность, локальность) инициальных стадий иммунного реагирования животных на патогены и их производные. При всем структурном разнообразии для большинства лектинов характерно присутствие глобулярного углеводраспознающего домена (carbohydrat recognition domain — CRD), состоящего почти из 200 аминокислот. Существует несколько групп (классов) лектинов, среди которых наиболее важными являются лектины С-типа, S-типа, Р-типа, I-типа, а также пентраксины (С-реактивный белок) и гепаринсвязывающие белки. Для каждой из групп лектинов установлена заметная структурная гомология углеводраспознающих доменов (УРД).

Из лектинов животного генеза, участвующих в иммунных реакциях, наиболее известными являются С-лектины, функционирование которых предполагает обязательное участие ионов кальция (Ca^{2+}). К их числу относится в первую очередь *маннозо(маннан)связывающий лектин* (МСЛ, или MBL в английской аббревиатуре).

Маннозо(маннан)связывающий лектин. Маннозо(маннан)связывающий лектин (МСЛ) имеет сложную олигомерную структурную организацию, первичным компонентом которой является субъединица с молекулярной массой около 32 кДа, состоящая из четырех основных функциональных доменов. Первый обогащен цистеиновыми остатками, участвующими в формировании четвертичной структуры белка посредством образования межцепочечных дисульфидных связей. Коллагеноподобный домен играет важную роль в активации комплемента по так называемому лектиновому пути, связывая сериновые протеиназы MASP-1 и MASP-2 (MBL associated serine proteases), которые функционально и структурно гомологичны C1q и C1r компонентам комплемента. Следующий, так называемый шестичный домен ответственен за стабилизацию первичного

олигомера, состоящего из 3 исходных субъединиц, и связывает углеводраспознающий домен с остальной молекулой. В состав функционально полноценной молекулы МСЛ входят по разным оценкам от 3 до 6 первичных олигомеров, несущих от 9 до 18 углеводраспознающих доменов соответственно. Вследствие того, что в составе базовой субъединицы МСЛ сочетаются домены с лектиновой и коллагеновой структурами, было предложено обозначать его, а также подобные по структуре белки как коллектины. Селективное взаимодействие УРД с некоторыми поверхностно локализованными сахарами микроорганизмов обеспечивает высокоаффинный характер (K_d в пределах 10^{-9} – 10^{-10} М) процесса распознавания патогенов. Основным функциональным доменом МСЛ является углеводраспознающий домен, который определяет лектиновую специфичность белка. Белок синтезируется клетками печени, его ген локализован в длинном плече 10-й хромосомы человека, вблизи центромера. В его состав входят 4 экзона и 3 интрона. Выявлено 2 варианта транскриптов этого гена. МСЛ высокоаффинно связывает соединения, несущие в терминальном положении олигосахаров клеточной стенки микробов и вирионов остатки D-маннозы, D-N-ацетилглюкозамина, L-фукозы и D-N-ацетилманнозамина в присутствии ионов кальция. Существенно слабее белок может также взаимодействовать с краевыми остатками D-глюкозы. Специфическое связывание рассматриваемых углеводов остатков определяется наличием у последних 2 экваториально расположенных гидроксильных групп в положениях 3 и 4, формирующих водородные связи с парами аминокислот (E_{185} и N_{187} соответственно). Каждая из гидроксильных групп связана с Са, играющим ключевую роль в стабилизации лиганд белкового комплекса. Галактоза, содержащая гидроксильную ОН группу 4 в аксиальном положении, не способна образовывать подобные комплексы. Именно это обстоятельство препятствует связыванию МСЛ с гликопротеинами эукариотических клеток, терминальное положение у которых в углеводной цепочке обычно занимают галактоза, сиаловые кислоты и их производные. Необходимо подчеркнуть, что благодаря олигомерной организации МСЛ в его состав входят как минимум 9 мандозораспознающих доменов, определяющих многоточечные

многовалентные) связи с лигандами, что и определяет высокоаффинный характер рассматриваемого лиганд-белкового взаимодействия МСЛ, связываясь с поверхностными структурами бактерий, низших грибов, простейших и вирусов, опсонизирует патогены, маркируя их для последующего фагоцитоза.

Комплекс патоген-МСЛ эффективно фагоцитируется лейкоцитами (моноцитами/макрофагами, нейтрофилами) благодаря наличию у них рецепторов к коллагеноподобному домену крестина. Наиболее вероятными рецепторами этого процесса являются C1qR и C1qRp, которые также могут лигировать компонент комплемента C1q и сурфактантный белок SP-A. Есть свидетельства об участии в рассматриваемом взаимодействии и рецептора комплемента первого типа (CRI).

Наряду с опсонизирующей активностью МСЛ активирует систему комплемента независимо от C14 и антител по так называемому лектиновому пути. Этот феномен был установлен в начале 1990-х гг. В настоящее время расшифрованы многие звенья активации комплемента по лектиновому пути. Установлено, что в естественном комплексе с МСЛ находятся две сериновые протеиназы MASP-1 и MASP-2. Структурный анализ выявил высокую степень гомологии между MASP-1 и MASP-2, с одной стороны, и инициальными протеиназами классического пути активации комплемента C1r и C1s — с другой. Кроме человека, подобные протеиназы выявлены в крови мышей, крыс, лягушек, костных рыб (карпа), хрящевой рыбы (акулы), у круглых червей (миноги, японской асцидии). Имобилизация комплекса МСЛ с MASP-2 на микробной поверхности запускает превращение зимогена в активную сериновую протеиназу, которая активирует C4 и C2 компоненты комплемента, а производные последних C4b-C2a (C3-конвертаза) активируют C3 компонент комплемента. Возможен второй вариант активации C3 напрямую комплексом МСЛ с MASP-1 и белком с неизвестным названием Mar19. Ковалентное присоединение образовавшегося C3b дополнительно маркирует и опсонизирует микробные клетки для фагоцитоза, и/или обеспечивает формирование на поверхности микроорганизмов мембраноатакующего комплекса C5b-9. Неясно, какие факторы определяют направленность административного процесса, связанного с активацией системы

комплемента по лектиновому пути, в ту или иную сторону иммунного реагирования. Относительно недавно установлено, что другие лектины плазмы крови человека, сочетающие в своей структуре фибриногенподобный лектиновый домен и коллагенподобный домен — фиколины, также, кооперируясь с MASP-1, MASP-2 и Mar19, могут активировать систему комплемента по лектиновому пути. Фиколин распознает на поверхности микроорганизмов терминальные остатки D-N-ацетилглюкозы, что расширяет возможности иммунной системы человека распознавать и элиминировать патогены. Компоненты, гомологичные белкам подобной системы млекопитающих (фиколин, C3-подобный фактор, B-подобный и MASP-подобный факторы), обнаружены у асцидии, т. е. беспозвоночного животного, эволюционно наиболее близкого позвоночным животным.

Участие МСЛ в активации комплемента сравнимо с ролью антител в составе иммунных комплексов при активации комплемента по классическому пути, поэтому этот лектин часто рассматривается иммунологами в качестве функционального предшественника антител (преантитело). Иммунобиологическая роль МСЛ четко прослеживается при ряде форм инфекционной патологии, которые развиваются на фоне дефицита продукции белка в организме. Повышение чувствительности к менингококковой и вирусной (HIVV, HBV, HSV) инфекциям и таким заболеваниям, как рецидивирующие кожные абсцессы и атопические дерматиты, часто наблюдают при недостаточности МСЛ в организме. В то же время повышенный уровень МСЛ также может приводить к нежелательным последствиям. В частности, высокий уровень сывороточного МСЛ способствует быстротечному фагоцитозу и дальнейшему переживанию в организме человека и животных микобактерий. Активация системы комплемента по лектиновому пути МСЛ часто сопровождается проявления аутоиммунных синдромов при ревматоидном артрите и постстрептококковом гломерулонефрите. Все это свидетельствует о необходимости коррекции уровня МСЛ при различных формах микробной патологии и при аутоиммунных заболеваниях.

Таким образом, МСЛ детектирует сахара на поверхности микроорганизмов (бактерий, низших грибов, паразитических

простейших) и некоторых вирусов. При этом происходит опсонизация микробов, благодаря которой облегчается их фагоцитоз моноцитами/макрофагами и нейтрофилами по рецептор-опосредованному (сC1qR, C1qR, CR1) механизму. Некоторые патогены могут подвергаться внеклеточному киллингу, осуществляемому мембраноатакующим комплексом комплемента, который формируется на поверхности клетки-мишени в ходе активации комплемента по лектиновому пути. Как было подчеркнуто ранее, МСЛ в качестве лигандов (от лат. *ligo* — связывать) предпочитает терминально локализованные D-маннозу, D-N-ацетилглюкозоамин, L-фукозу, D-N-ацетилманнозоамины и D-глюкозу в составе гликанов, липофосфогликанов, гликоинозитолфосфолипидов и гликопротеинов. Именно поверхностная экспозиция рассматриваемых сахаров формирует патогенассоциированный молекулярный паттерн микробных клеток и некоторых вирионов. Собственные гликопротеины и гликолипиды животных клеток, как правило, не содержат в терминальном положении рассматриваемые сахара, что и является основой дискриминации «свое-чужое» маннозосвязывающим лектином и последующей направленности как патогены элиминирующих реакций фагоцитоза и активации системы комплемента.

Таким образом, иммунное распознавание, опосредованное МСЛ или фиколинами, запускает каскад активации комплемента, известный в настоящее время как лектиновый путь. Все это свидетельствует о том, что в рамках блока врожденного иммунитета уже у *Protochordates* возникли эффективные рецепторопосредованные и элиминационные механизмы кооперации лектинов и отдельных компонентов системы комплемента, которые рассматриваются как эволюционные предшественники классического пути активации комплемента.

Сурфактантные белки SP-A и SP-D. К компонентам рецепторопосредованной системы врожденного иммунитета относятся также хорошо изученные апобелки легочного сурфактанта SP-A и SP-D, которые в отличие от МСЛ функционируют на границе внутренней и наружной среды (полость альвеолы). Первоначально эти белки были описаны как участники системы, обеспечивающей поддержание структурированности и обмен

сурфактанта альвеол. Как выяснилось позднее, их функции в организме оказались значительно шире. В настоящее время доказана их роль в формировании на уровне альвеол легкого защитного противoinфекционного барьера. Рассматриваемые белки синтезируются и секретируются в полость альвеол клетками альвеолярного эпителия второго типа и клетками Клара (Clara cell). Они, как и МСЛ, относятся к лектинам С-типа, лигируя сахара в присутствии ионов кальция. Сурфактантный белок А (SP-A) связывает олигосахара, которые в терминальном положении содержат D-N-ацетилманнозоамин и L-фукозу, в то время как SP-1 предпочитает взаимодействовать с инозитолом, мальтозой и глюкозой. Функционально активный SP-A является олигомером, состоящим из 6 тримеров, формирующих структуру «букета тюльпанов», характерную также для МСЛ, а SP-D представлен либо в форме крестообразной структуры додекамера, подобной конглютинуину быка, либо олигомером более высокого порядка.

Пространственное расположение углеводсвязывающих доменов сурфактантных белков позволяет осуществлять им многоочечное связывание с гликоконъюгатами и может приводить к агглютинации их носителей, облегчая последующий фагоцитоз клеточных и молекулярных агрегатов. Мишенями SP-A и SP-D являются грамотрицательные бактерии. Спектр микробных мишеней SP-A распространяется и на грамположительные бактерии. Оба легочных сурфактантных белка могут агглютинировать респираторные вирусы. Причем SP-A связывается преимущественно с диманнозными повторами капсульных полисахаридов грамотрицательных бактерий, в то время как SP-D лигирует глюкозосодержащие коровые олигосахара липополисахаридов. Кроме того, SP-A может связываться с липидом А, т. е. проявляет распознающую активность нелектинового типа. Все эти взаимодействия в той или иной степени приводят к агглютинации (агрегации) микробов, облегчающей их фагоцитоз альвеолярными макрофагами и нейтрофилами. В какой степени последний процесс опосредован рецепторами фагоцитов? Описано несколько клеточноассоциированных структур, способных избирательно связывать SP-A. Так, альвеолярные макрофаги и альвеолоциты II типа экспрессируют на поверхно-

сти клеток белок SPR-210 (Surfactant protein receptor 210 kDa), к которым связываются как свободные SP-A, так и те, которые находятся в комплексе с микроорганизмами. В силу структурной гомологии коллагеноподобных доменов SP-A, МСЛ и компонента комплемента C1q все они являются естественными лигандами C1q рецепторов (сC1qR, C1qRp). Связывание SP-A с липидом А липополисахаридов предопределяет, по-видимому, и возможность его взаимодействия с рецептором CD14. Следует подчеркнуть, что в отличие от большинства известных лектинов (МСЛ, конглоутинин, CP43) и C1q, которые в свободном состоянии не лигируются C1q-рецепторами, SP-A-белок способен связываться с ними и CD14-рецептором как сам по себе, так и в комплексе с носителями патогенассоциированных молекулярных паттернов углеводной природы. Предполагаемым рецептором SP-E является белок Gp340 на поверхности альвеолярных макрофагов, известный как представитель суперсемейства CP. Наряду с основной агрегирующей микробы активностью, SP-A и SP-D обладают еще рядом функциональных свойств, значимых в формировании резистентности к инфекционным патогенам. В частности, SP-A и SP-D стимулируют полимеризацию актина в альвеолярных макрофагах и способствуют таким образом хемотаксису этих клеток. Их влияние как онсонизирующих факторов пока строго не доказано. Интересно, что SP-A и SP-D усиливают дыхательный взрыв в макрофагах и продукцию ими окиси азота (NO), но подавляют в фагоцитарных клетках ЛПС- или кандидами индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов. При прямом контакте SP-A с альвеолярными макрофагами и моноцитами крови наблюдается увеличение продукции ФНО α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИФН γ этими клетками.

SP-A и SP-D усиливают фагоцитоз *E. coli*, *S. pneumoniae*, *St. aureus* нейтрофилами. Интересно, что в большинстве исследований модели SP-A подавляют различные стороны функциональной активности лимфоцитов. Предполагается, что это связано со способностью сурфактантных лектинов подавлять продукцию клетками ИЛ-2 как одного из основных T-регуляторных факторов. Можно говорить в целом, что SP-A и SP-D хотя и в разной степени, усиливают фагоцитарные защитные

реакции организма, ослабляя при этом сопутствующие воспалительные проявления, которые связаны с гиперпродукцией микробами индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами. По-видимому, подобный характер регулирования иммунных реакций на уровне нижних дыхательных путей является наиболее адекватным, соответствующим структурно-функциональной организации легких.

Конглоутинин. Бычий конглоутинин был первым описанным лектином С-типа позвоночных, который вызывал агрегацию комплементосонизированных эритроцитов. Структурный анализ белка выявил в его базовой субъединице короткий 25-аминокислотный N-концевой участок, содержащий 2 цистеина, которые участвуют в формировании олигомера, и следующий за ним коллагеноподобный домен, включающий 55 повторов GXU. С-терминальная часть молекулы включает 155 аминокислот, которые формируют углеводраспознающий домен (УРД), стабилизированный двумя дисульфидными связями. Молекулярная масса субъединицы — около 43 кДа. Три такие субъединицы за счет взаимодействия коллагеноподобных доменов формируют олигомер первого порядка, свойственный также МСЛ, SP-A и SP-D.

Вследствие стереотипного характера образования таких олигомеров четырьмя рассмотренными лектинами эта группа белков получила общее название *коллектинов*, т. е. молекул, сочетающих в своей структуре лектиновые и коллагеноподобные домены. Функционально активная молекула конглоутинина состоит из 4 олигомеров первого порядка, объединенных в крестообразную надмолекулярную структуру. По характеру олигомерной организации конглоутинин отличается от МСЛ и SP-A, но сходен с додекамером SP-D.

Как представитель лектинов, конглоутинин лигирует с большой аффинностью невосстановленные терминальные остатки N-ацетилглюкозамина в N-ацетилманнозамин. Он способен связывать также терминальные остатки D-маннозы и L-фукозы. Подобный спектр лигандов позволяет конглоутинину активно участвовать в ряде иммунных реакций. В частности, он агрегатирует грамотрицательные бактерии, опсонизированные

СВ), и способствует их поглощению фагоцитами и последующей элиминации. Конглютинин является, по-видимому, рекогносцировочным белком при некоторых вирусных инфекциях. Есть основание рассматривать его в качестве основного компонента β -ингибиторов сыворотки крупного рогатого скота, ответственных за нейтрализацию гемагглютинирующей активности вируса гриппа.

Конглютинин рассматривается в настоящее время в качестве одного из основных гуморальных факторов крови крупного рогатого скота, обеспечивающих распознавание «несвоего» (чужеродного). Есть основания считать, что при этом он вступает в кооперацию с системой комплемента, хотя в отличие от МСЛ и не активирует этот каскад.

Примером древней рекогносцировочной системы врожденного иммунитета у беспозвоночных, базирующейся на гуморальных факторах, функционально гомологичных лектинам млекопитающих, является каскад коагуляции гемолимфы подковообразного краба (мечехвоста), запускаемый компонентами микробных оболочек (полисахаридами, липополисахаридами).

Клеточноассоциированные лектины. Фагоциты человека и ряда экспериментальных животных (мышь, морская свинка, крыса, кролик) экспрессируют на своей поверхности разнообразные по специфичности лектины, с которыми связана способность этих клеток распознавать свои и чужеродные углеводы и которые в связи с этим участвуют в детекции микроорганизмов, имеющих характерный только для них набор терминально локализованных сахаров, т. е. ПАМП. Например, в состав зимозана клеточных стенок дрожжей входят маннаны, маннопротеины и β -гликаны с последовательностью моносахаров, типичных для этой группы микроорганизмов. Фагоциты млекопитающих с помощью маннозного рецептора, избирательно связывающего α -маннан, и дектина 1, связывающего β -гликаны, детектируют и фагоцитируют дрожжевые клетки и зимозан.

Маннозный рецептор макрофагов является трансмембранным белком 1-го типа, часть которого локализована внеклеточно, с коротким (45 аминокислотных остатков) цитоплазматическим фрагментом. Внеклеточная часть рецептора, участвующая в детекции остатков терминально локализованных

манноз, состоит из восьми доменов, характерных для лектинов С-типа, короткого фрагмента, обогащенного цистеином, и фибронектинового повтора II типа. Этот рецептор характерен для дендритных клеток и некоторых субпопуляций макрофагов. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что лиганды, активирующие маннозный рецептор, обеспечивают последовательность внутриклеточных структурно-функциональных изменений, достаточных для осуществления процесса эндцитоза.

Дектин 1 как лектин, связывающий β -гликаны, характерные для низших грибов, был первоначально открыт на дендритных клетках. В его состав входят один внеклеточный углеводраспознающий домен и короткая цитоплазматическая часть, включающая предположительно ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) последовательность. Кроме β -гликанов рецептор связывает с помощью области, отличной от УРД, Т-лимфоциты. Это взаимодействие рассматривается как одно из условий активации Т-клеток. Рассматриваемый рецептор экспонируется на поверхности клеток миелоидной линии и является, по-видимому, одним из доминирующих рецепторов, которые лигируют β -гликаны при фагоцитозе.

Кроме дектина 1 высокоаффинное связывание β -гликанов с K_d 5×10^{-8} М осуществляет α М-цепь рецептора CR3. Есть основание предполагать, что оба рецептора β -гликанов участвуют совместно с маннозным рецептором в фагоцитозе зимозана и низших грибов, осуществляемом макрофагами.

Функция рекогносцировочного аппарата иммунной системы заключается в избирательном распознавании структур и молекул микробных патогенов (ПАМП), которое обеспечивает их направленную нейтрализацию и конечную элиминацию.

В ряде случаев у отдельных молекул системы врожденного иммунитета имеет место сочетание как узнающей микробы, так и элиминирующей их активности (лектин L6, система комплекта, некоторые антимикробные пептиды и белки).

Наиболее древней группой рецепторов макрофагов является CR и маннозный рецептор. Необходимо подчеркнуть, что уже их взаимодействию с ПАМП свойственна высокая избирательность.

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА В ИММУНИТЕТЕ ЖИВОТНЫХ

Система комплемента была открыта американским бактериологом Дж. Наттолом и независимо от него немецким исследователем Г. Бюхнером, который использовал термин «алексия» для обозначения бактерицидной фракции крови человека и лабораторных животных. Термин комплемент (от нем. *komplement* — дополняющий) ввел П. Эрлих для обозначения фракции свежей, не подвергнутой температурной обработке (56°C в течение 30 мин или 60°C в течение 20 мин) сыворотки крови, которая в исследованиях Ж. Борде была способна вызывать лизис эритроцитов в присутствии антиген-специфических антител (иммунный гемолиз). Этот феномен впервые обстоятельно изучил Ж. Борде в 1898 г., получивший впоследствии (1919) за исследование системы комплемента Нобелевскую премию в номинации «Физиология или медицина». Лишь во второй половине XX в. были не только функционально, но и химически охарактеризованы основные составляющие этой сложной многокомпонентной белковой системы, функция которой обеспечивает распознавание «несвоего» (чужеродного), т. е. инородных антигенов и патогенассоциированных молекулярных паттернов и их последующую нейтрализацию и элиминацию. Именно сочетание функций распознавания и их последующей инактивации в системе комплемента определяет ее ключевую биологическую роль в защите позвоночных и некоторых беспозвоночных животных от инфекции, а в ряде случаев и от трансформированных опухолевых клеток.

В настоящее время установлено, что система комплемента состоит из более чем 30 индивидуальных плазматических и мембранассоциированных белков, формирующих и регулирующих каскад белковых превращений, которые базируются на ограниченном протеолизе эндогенными сериновыми протеиназами и генерируют физиологически активные вещества (C4a, C3a, C5b, C5a, C5b), определяющие эффективность рассматриваемой системы в иммунной защите животных.

Активация каскада комплемента осуществляется одним из трех путей. В работах Борде был впервые описан путь, получивший в литературе название *классического*, главным

активатором которого (хотя и не единственным) является комплекс антиген/антитело (иммунный комплекс). Взаимодействии С1-компонента комплемента с СН3 и СН2 доменами антител в составе иммунных комплексов инициирует каскад последовательных реакций, превращая проэнзим С1r в сериновую протеиназу, которая далее путем ограниченного протеолиза активирует С1s-компонент, также проявляющий активность сериновой протеиназы.

С1q связывает СН3 домен IgM или СН2 домен IgG, находящиеся в составе иммунных комплексов. В случае неиммунных активаторов природа связываемых структур точно не известна. Но в этом взаимодействии, по-видимому, важную роль играют высокозаряженные кластеры молекул-активаторов. Молекулярная масса С1q составляет около 450 кДа. Он состоит из 6 олигомеров, в составе каждого из которых находятся в разных сочетаниях 3 полипептидные цепи (А, В, С). 14-концевые коллагеновые части субъединиц формируют «стебель» «тюльпана», а С-концевые — глобулярные головки «тюльпанов», которые в конечной олигомерной молекуле С1q имеют форму «букета тюльпанов», внешне напоминающую, но не гомологичную по структуре, таковую маннозосвязывающего лектина. С1q с помощью своих глобулярных головок на основе белок-белковых взаимодействий распознает определенные домены константной области иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов.

В случае же других активаторов системы комплемента по классическому пути (сывороточный амилоид Р, С-реактивный белок и ДНК) в качестве связывающего домена выступает коллагеноподобная область А цепи С1q. Присутствие в олигомерной макромолекуле шести идентичных связывающих сайтов обеспечивает мультивалентное присоединение С1q к активатору, что является одним из условий активации комплемента по классическому пути. Для того чтобы произошла активация С1q необходимо, как минимум, взаимодействие 2 макромолекул С1 с двумя сайтами активатора. После связывания активируются обе ассоциированные с ней молекулы С1r путем аутокаталитического процесса. Меньшая субъединица расщепленного С1r является сериновой протеиназой, атакующей в свою очередь одну

пептидную связь в C1s. Меньшая субъединица расщепленного C1s также является сериновой протеиназой. Так осуществляется активирование C1 в результате связывания с активатором, которым в классическом пути активации комплемента является иммунный комплекс. Далее C1s гидролизует C4, формируя C4a (малый) и C4b (большой) фрагменты. C4a обладает цитокин-подобной активностью, являясь умеренным хемокином и анафилатоксином. C4 содержит тиоэфирную связь, которая активируется после его расщепления с помощью C1s. Метастабильная карбонильная группа глутаминовой кислоты расщепленной тиоэфирной связи обладает способностью образовывать эфирную или амидную связи с гидроксильными группами или аминокеттогруппами на поверхности активаторов комплемента.

C1s, являясь сериновой протеазой, расщепляет C4- и C2-компоненты комплемента, из фрагментов которых C4b и C2a формируется энзиматический комплекс с серинпротеазной активностью, известный как C3-конвертаза, субстратом которой является ключевой компонент всего каскада — компонент C3. Именно его расщепление на поверхности иммунного комплекса или патогена во всех трех известных каскадах активации (классическом, альтернативном и лектиновом) является определяющим в реализации рекогносцировочной функции системы комплемента.

Ограниченный протеолиз субъединицы C3-компонента формирует C3a-компонент, являющийся наряду с C4a умеренным хемокином для фагоцитов, и C3b-компонент, содержащий, подобно C4, метастабильную тиоэфирную связь, которая быстро в присутствии воды «раскрывается» и свободная ацильная группа в результате мгновенно ковалентно связывается с патогеном иммунного комплекса или комплексом маннозосвязывающего лектина с патогеном. Необратимое ковалентное связывание C3b с патогенами или иммунными комплексами (в варианте активации по классическому пути) маркирует их как «чужеродное» (чужеродное, патогенное) и таким образом определяет направленность на них последующих нейтрализующих и элиминирующих патогены реакций иммунной системы.

При этом возможны два взаимодополняющих механизма элиминации «несвоего». Первый связан с фагоцитозом иммунных

комплексов или носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов по рецепторопосредованному механизму. С3b-молекула является оптимальным опсоином, способствующим через CR1- и CR3 поглощению моноцитами/макрофагами и нейтрофилами объектов фагоцитоза, поскольку она увеличивает их гидрофобность и снижает отрицательный заряд их поверхности. Другой путь инактивации патогенов связан, как правило, с клеточными объектами (микробами) и сводится к ряду последующих реакций каскада активации комплемента, заключающихся в формировании на поверхности микроорганизма С5-конвертазы (комплекс С4bС2aС3b, являющийся сериновой протеазой), расщепляющей С5-компонент на С5a- и С5b-производные. С5b-производное комплемента инициирует сборку так называемого мембраноатакующего комплекса (С5b-9) на поверхности клетки-мишени или вируса. С9-компонент комплемента формирует за счет олигомеризации в цитоплазматической мембране клетки-мишени пору диаметром 100 Å, образование которой ведет к осмотическому лизису микроорганизмов. В результате перфорации мембран происходит внеклеточная гибель микробов, структурные компоненты которых далее эндцитируются и перевариваются фагоцитами.

При всей очевидной биологической значимости рассматриваемого процесса элиминации патогенов следует подчеркнуть, что иммунодефицит по компоненту С9-комплемента у людей, как правило, не приводит к заметному снижению их резистентности к большинству известных инфекционных бактериальных и грибковых заболеваний. У таких пациентов имеет место, как правило, повышение чувствительности преимущественно к микробам рода *Neisseria*. Возможно, что мы переоценивали значимость мембраноатакующего комплекса в иммунных реакциях организма человека и некоторых позвоночных животных. Нельзя исключить и того, что у людей, дефицитных по С9-компоненту комплемента, его функцию берет на себя гомологичный белок перфорин, который образует поры в эукариотических клетках-мишенях при клеточно-опосредуемом цитолизе, осуществляемом НК-клетками и цитолитическими лимфоцитами (CD8⁺-клетками).

Производное комплемента С5а является сильным хемокином и анафилатоксином, физиологическая роль которого заключается в привлечении нейтрофилов и моноцитов в очаги проникновения инфекции.

Второй путь активации комплемента известен как *альтернативный*. Он в настоящее время рассматривается как основной в системе механизмов врожденного иммунитета, поскольку его активация не связана с антителами и иммунными комплексами. Альтернативный путь активации комплемента запускается в ходе ковалентного связывания С3b (по рассмотренному ранее механизму) с поверхностью клеток или активационных частиц. Таким образом, не С1q-компонент, а С3b-компонент комплемента является в рассматриваемом пути активации комплемента основной молекулой, распознающей «несвое». Поскольку микробные патогены не содержат на своей поверхности белки, подавляющие активность каскада комплемента (CR1, DAF, MCP), это создает предпосылки для инициации альтернативного пути активации. Иницирующие весь процесс микроколичества С3b продуцируются систематически в плазме крови под действием не ассоциированной с клетками С3-конвертазы, которая формируется в ходе взаимодействия активированной в водной среде формы С3–С3(Н₂О), фактора В и фактора D. Фактор D, являющийся сериновой протеиназой, расщепляет фактор В в составе комплекса С3(Н₂О)/В, фрагмент которого Вb остается связанным с С3(Н₂О). Комплекс С3(Н₂О)Вb и является С3-конвертазой в альтернативном пути активации комплемента. Основным субстратом этого комплекса являются нативные молекулы С3. Образовавшиеся вблизи активаторов молекулы С3b ковалентно связываются с патогенами, обеспечивая тем самым дальнейшее протекание активации каскада по альтернативному пути уже на их поверхности.

Третий путь активации комплемента, получивший название *лектинового*, был открыт относительно недавно. Запуск этого пути осуществляется МСЛ (маннозо(маннан)связывающим лектином (белком)), который представляет собой олигомерный комплекс, состоящий из 9–18 идентичных 32 кДа субъединиц. В состав каждой субъединицы входят 4 домена, ключевыми из которых являются углеводраспознающий домен

(УРД) в С-концевой области молекулы и коллагеноподобный N-концевой домен. Структурные особенности последнего, заключающиеся в наличии 55–56 повторов GXY, позволяют трем субъединицам формировать олигомер первого порядка. Далее 3–6 таких первичных олигомеров объединяются в олигомерную структуру более высокого порядка, напоминающую «букет тюльпанов», как и в случае с C1q-компонентом комплемента.

Принципиальное отличие двух сравниваемых «букетов» заключается в том, что в составе C1q объединены три типа неидентичных, хотя и гомологичных, полипептидных цепей, в то время как «букет» МСЛ состоит из идентичных субъединиц. Кроме того, глобулярные головки C1q, узнающие CH2- и CH3-домены в составе IgG и IgM соответственно, функционируют по комплементарному принципу белок-белковых взаимодействий, в то время как углеводраспознающие домены МСЛ работают по принципу углевод-белковых взаимодействий, т. е. являются лектиновыми доменами. Последние распознают в составе патогенов некоторые сахара, локализованные на поверхности клеток и вирионов, и связываются с ними с высокой аффинностью ($K = 10^{-9} - 10^{-10}$ М), образуя комплекс патоген/МСЛ. Формирование этого комплекса активирует ассоциированные нековалентно с МСЛ два проэнзима MASP1 и MASP2, которые являются сериновыми протеиназами, инициирующими протекание процесса активации комплемента на поверхности комплекса патоген/МСЛ либо по классическому пути (расщепляя последовательно C4 и C2), либо по альтернативному (мишенью в этом случае является компонент C3).

Есть много оснований рассматривать лектиновый путь активации комплемента как эволюционно предшествующий классическому и составляющий ключевое звено механизмов врожденного иммунитета. Во-первых, маннозо(маннан)связывающий лектин и ассоциированная с ним протеиназа обнаружены уже у беспозвоночных, в частности у асцидий. Во-вторых, ключевой компонент всей системы комплемента C3 и В-фактор, на котором сходятся все три пути активации комплемента, выявлены у иглокожих — морского ежа и асцидий. В-третьих, активация комплемента по лектиновому пути является наиболее «физиологичной», поскольку основана на однозначной детер-

минации патогенов — носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов и не зависит от C1q, антител и следовых количеств C3-активированного компонента комплемента. В связи с точностью дискриминации «свое»/«несвое» в лектиновом пути, детерминированной высокоаффинным взаимодействием МСЛ с патогенами, часть исследователей расценивает функциональную роль лектина МСЛ как эволюционного предшественника антител (преантитело). Наконец, активация компонента, инициируемая связыванием МСЛ с носителем патогенассоциированных молекулярных паттернов, может протекать как по классическому, так и по альтернативному путям с генерацией физиологически активных производных комплемента, обеспечивающих вовлечение в иммунную защиту организма дополнительных факторов гуморальной и клеточной природы.

Активация системы комплемента приводит к эффективной детекции «несвоего» (патогенного), его унифицированной маркировке путем ковалентного связывания с мишенями C4b- и C3b-производных комплемента, которые при этом играют опосредующую роль в рецепторопосредованном фагоцитозе носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Кроме того, в ряде случаев доказано формирование на поверхности микроорганизмов (бактерий, низших грибов и простейших) и вирионов (оболочечных вирусов) мембраноатакующего комплекса C5b-9, осуществляющего цитоллиз клеток-мишеней во внеклеточной среде.

Факторами и производными системы комплемента, опосредующими микробы, являются C1q, C3b, iC3b, C4b и iC4b. Наряду с этим при расщеплении ряда компонентов каскада комплемента образуются цитокиноподобные производные комплемента, обладающие хемотаксической для фагоцитов активностью (C5a, C3a, C4a). Кроме того, эти производные способны вызывать в тканях симптомы воспаления (краснота, набухание, локальное повышение температуры, боль), поэтому их еще называют анафилатоксинами. Они увеличивают проницаемость сосудов микроциркуляторного русла, являются дегрануляторами тучных клеток, вызывают сокращение гладкой мускулатуры. Карбоксипептидаза В-типа плазмы крови является главным

инактиватором анафилактической активности С5а, С3а и С4а-производных, удаляя функционально значимый С-концевой аргинин у этих молекул.

Наиболее активным из рассматриваемых производных является С5а. Он является хемотаксином для нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. На поверхности этих клеток имеются рецепторы, лигирующие С5а. Рецептор относится к группе провоспалительных рецепторов, одинарная белковая цепочка которых семь раз пересекает мембрану. Эта группа включает в себя рецепторы для С5а, интерлейкина 8, формилметиониловых пептидов, тромбоцитаактивирующего фактора. Связывание лигандов с рецепторами рассматриваемой группы инициирует в клетках путь трансдукции сигнала, начальными участниками которого являются G-белки, ответственные за ГТФ/ГДФ-обмен. Это приводит к активации фосфолипазы С и фосфатидилинозитол-3-киназы, обмену арахидоновой кислоты с последующим включением ряда сигнальных путей. Конечным результатом подобных изменений в моноцитах/макрофагах является синтез и секреция клетками провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-8. С5а-производное усиливает секрецию лизосомальных ферментов из нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, дыхательный взрыв в фагоцитах, их адгезию к эндотелию, экспрессию на поверхности клеток рецепторов к производным комплемента, интегринов и ряда других белков. Совокупность функциональных проявлений фагоцитов после воздействия на них С5а, С3а и С4а можно оценивать как способствующую усилению и реализации антимикробного потенциала этих клеток.

Нельзя не отметить, что гиперактивация фагоцитов и интенсивное воспаление, наряду с защитной функцией, несут в себе в ряде случаев и реальную угрозу для структурной целостности клеток и тканей собственного организма. Поэтому в процессе эволюции возник и прошел отбор ряд механизмов, ограничивающих воспалительный процесс. К реализации этих механизмов прямое отношение имеют несколько белков, регулирующих процесс активации комплемента. В частности, активность С3-конвертаз (С4b, С3а, С3b, Bb) человека находится под контролем растворимых (С4bp, HL-1) и мембранных бел-

ков (CR1, CD55, CD46), объединенных в семейство регуляторов активации комплемента. Белок, связывающий C4b-производное C4-компонента комплемента, ингибирует дальнейшую активацию комплемента посредством связывания с этим компонентом на поверхности микробов. Известен ингибитор компонента C1-Clinh, блокирующий активацию каскада классического пути на его начальной стадии. Собственные клетки животного организма имеют на своей поверхности белок, разрушающий формирующийся каскад активации комплемента на уровне C3-конвертаз (DAF — decay activation factor или CD55). Рецепторы комплемента также являются ингибиторами каскада его активации (CR1, CR2). Баланс активаторов и ингибиторов системы комплемента во многом определяет характер и интенсивность как защитных, так и повреждающих реакций, сопряженных с этой системой. Поэтому дальнейшее изучение взаимодействия рассматриваемых белков представляет несомненный медицинский интерес.

Эти стороны функциональной активности системы комплемента имеют прямое отношение к формированию врожденного иммунитета у позвоночных и некоторых групп беспозвоночных (иглокожие, асцидии) животных. Однако необходимо помнить, что у позвоночных животных с развитой системой механизмов приобретенного иммунитета комплемент участвует и формировании адаптивных реакций антителообразования на антигены, регулирует размеры иммунных комплексов и степень их растворимости, т. е. осуществляет связь двух блоков иммунной системы — врожденного и приобретенного.

Протеазы играют важную роль в различных иммунных и сопряженных с ними процессах, включая каскады образования сигнального пептида у дрозифилы и активации комплемента у позвоночных, системы свертывания крови (гемолимфы) и фибринолиза. В связи с этим представляет интерес понимание механизмов, которые определяют уровень активности ряда ключевых протеаз, вовлеченных в иммунные и гемостатические процессы. Одним из ведущих молекулярных факторов, задействованных в регуляции активности протеаз различных классов, являются разнообразные эндогенные ингибиторы белковой природы, среди которых ингибиторы группы

α_2 -макроглобулинов (α_2 М) занимают одну из ключевых позиций. К настоящему времени α_2 М-макроглобулины описаны у млекопитающих и других позвоночных, оболочников, иглокожих, членистоногих, моллюсков и нематод.

Первоначально α_2 М был обстоятельно изучен у млекопитающих, а в настоящее время он выявлен и у низших позвоночных, и у беспозвоночных. Этот ингибитор подавляет активность широкого круга протеиназ, причем осуществляет это путем захватывания белковых молекул в свой гидрофильный карман. Как правило, он не взаимодействует с активным центром ингибируемых протеаз, а вступает с ними в образование молекулярного комплекса, в котором блокируется взаимодействие протеаз со своими субстратами. Протеазы, связавшиеся с α_2 М, часто сохраняют способность гидролизовать малые амидные и эфирные субстраты, но не способны расщеплять белки.

Размер полипептидной цепи α_2 М различен у млекопитающих, мечехвостов и осьминогов и колеблется в пределах 180–185 кДа. Выявлены формы α_2 М с одной, двумя и четырьмя полипептидными цепями, но наиболее распространена двусубъединичная форма, в которой белковые молекулы соединены дисульфидными связями, а также тетрамер, в котором нековалентно объединены две двусубъединичные формы.

В мономере α_2 М различают несколько функциональных доменов. Наиболее охарактеризованы домен, связывающий белки лиганды (мишени, протеазы), внутренний тиоэфирный и рецепторузнающий домены. Домен, связывающий белки-мишени, состоит из 25 аминокислотных остатков, которые формируют такие сочетания последовательностей, которые делают его субстратом для протеаз разной специфичности. Этот участок молекулы позволяет связывать эндопептидазы со всеми известными каталитическими механизмами (сериновые, цистеиновые, аспартильные и металлопротеиназы). Внутренняя тиоэфирная связь активируется в белке после расщепления в домене-приманке той или иной пептидной связи. Она формируется в результате взаимодействия карбоксила глутамильного остатка со свободной сульфгидрильной группой: после пептидного расщепления.

После взаимодействия с эндопептидазами и расщепления того или иного участка в домене-приманке тиоэфирная связь распадается, высвобождается химически реактивный γ -карбонид, который далее реагирует с нуклеофильными группами разнообразных молекул. Образование химической связи между карбонилем и ϵ -амино- или гидроксильными группами протеаз-мишеней приводит к ковалентному присоединению последних к α_2M в области тиоэфирного домена. Инактивация этого домена небольшими первичными аминами (например, метиламином) нарушает способность α_2M связывать протеазы. Обработанный метиламином α_2M подвергается протеолизу в домене-приманке, но неспособен связывать далее протеазы, т. е. лишается своей основной функциональной активности как универсального ингибитора протеаз. Тиоэфирная связь α_2M является уникальной для всех представителей этого семейства.

Структурные перестройки α_2M происходят после его активации протеазами и в домене, распознающем рецептор, который локализован в С-концевой части молекулы. Комплекс α_2M с протеазами быстро удаляется из циркуляции посредством рецепторопосредованного эндоцитоза, инициируемого распознающим рецептор доменом, который реагирует с поверхностью многих типов клеток. Поглощенный комплекс подвергается перевариванию в лизосомальном аппарате клеток. Обработанный метиламином α_2M также подвергается эндоцитозу, как и активированный в ходе взаимодействия с протеазами.

К семейству α_2M относятся собственно α_2 -макроглобулин, а также белок беременности, α_1 -ингибитор-3 грызунов, овомакроглобулины яиц птиц и рептилий, белки системы комплемента С3, С4 и С5. В плазме крови и гемолимфы беспозвоночных также обнаружены представители данного семейства.

Для большинства представителей рассматриваемого семейства характерно наличие в их структуре внутренней тиоэфирной связи. Но из этого правила есть и исключения, например овомакроглобулины и компонент комплемента С5. Тиоэфирная связь С3- и С4-компонентов комплемента определяет возможность этих белков и их производных ковалентно связываться с поверхностью инородных частиц и клеток, обеспечивая

маркировку последних для последующего цитолиза с С5b-С9-комплексом или фагоцитоза.

Представитель семейства α_2M описан у американского подковообразного краба. Белок подавляет протеолитическую активность трипсина, химотрипсина, плазмина, эластазы, субтилизина, термоллизина в отношении казеина и фибрина.

В дальнейшем представители семейства были выделены из плазмы ракообразных, разных классов моллюсков. Все известные α_2M беспозвоночных представляют собой димеры, что подтверждено трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопией. Инактивация связывающей протеазы активности метиламином свидетельствует о значимости тиоэфирной связи в реализации ингибирующей способности α_2M хелицерových. Этот домен у беспозвоночных очень сходен по структуре с таковым α_2M позвоночных. Ковалентное связывание протеиназ-мишеней существенно важно для функционирования многих, но не всех α_2M . В случае С3 и С4 значимость этой связи очевидна.

Клиренс комплексов α_2M /протеазы из циркуляции носит рецепторопосредованный характер. Нативный непрореагировавший с протеазами α_2M довольно стабилен в плазме и не реагирует с рецепторами поверхности клеток. После реакции с протеазами образовавшийся комплекс α_2M быстро связывается с рецепторами, интернализуется клетками и подвергается протеолизу в их лизосомальном аппарате. Наиболее активно рассматриваемый комплекс расщепляют гепатоциты и макрофаги. В связи с этим предполагают, что одна из первичных и главных функций α_2M заключается в связывании эндогенных и экзогенных протеаз и удалении таким образом их из циркуляторного русла, где они могли бы вызвать нерегулируемый протеолиз. В этом смысле α_2M может рассматриваться как рекогносцировочная система широкого спектра действия, направленная на идентификацию и маркировку протеаз для их последующего эндоцитоза и переваривания. Конформационные изменения в структуре α_2M после его связывания с протеазами приводят к экспозиции С-терминального домена белковой цепи, который и является лигандом рецептора, опосредующего путем эндоцитоза клиренс образовавшихся комплексов. Рецептор комплекса α_2M у млекопитающих известен как белок, род-

тивный рецептору липопротеидов низкой плотности. Этот рецептор (LRP) синтезируется в форме 600 кДа белка с одним трансмембранным доменом. Рецептор, наряду со связыванием комплекса $\alpha_2\text{M}$ /протеаза, может взаимодействовать и с другими лигандами, такими как комплекс активатора плазминогена с его ингибитором 1-го типа (PAI-1), липазы липопротеинов, лактоферрин, экзотоксин А бактерий рода *Pseudomonas*, лиолиппротеином Е-обогащенные хиломикроны жвачных. LRP относится, как и $\alpha_2\text{M}$, к древним белкам, по-видимому, возникшим еще до эволюционной дихотомии первично- и вторичноротых. Он описан уже у нематоды. Обнаружение $\alpha_2\text{M}$ у мечехвостов дает основание предположить наличие в их клетках и LRP-подобных структур. Функциональная особенность $\alpha_2\text{M}$ мечехвоста заключается в том, что он не подавляет активность ферментов каскада свертывания гемолимфы животного.

Известно, что кроме протеаз $\alpha_2\text{M}$ связывает и другие белки: пептидные митогены, катионные белки, ферритин и некоторые цитокины (ИЛ-1, ФНО α). Для некоторых из этих белков связывание с $\alpha_2\text{M}$ идет при условии активации тиоэфирной связи и формирования через его тиольную группу дисульфидной связи. Инактивация перечисленных белков может рассматриваться в фокусе оценки их роли в тех или иных иммунных реакциях животных организмов, многие стороны которой остаются предметом дальнейших исследований.

ЛИПОПОЛИСАХАРИДСВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК КАК ЗВЕНО РЕКОГНОСЦИРОВОЧНОЙ СИСТЕМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Липополисахарид, или эндотоксин, является ведущим структурным и маркерным компонентом внешнего слоя наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Для иммунной системы животных липополисахарид имеет двойное значение. Во-первых, как молекула-носитель двух патогенассоциированных молекулярных паттернов (терминально локализованных остатков маннозы в составе O-антигена и липида А) он распознается специализированными паттерн-рекогносцировочными

рецепторами (молекулами), среди которых наиболее значимыми являются *маннозо(маннан)связывающий лектин (МСЛ)* и *липополисахаридсвязывающий белок (ЛСБ)* плазмы крови млекопитающих. Это связывание мобилизует иммунные механизмы защиты животных от инфекции (система комплемента, нейтрофилы, моноциты/макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки), направленные на элиминацию эндотоксинов и их носителей. Во-вторых, избыточное «наводнение» липополисахаридами внутренней среды некоторых животных (мышь) и человека приводит к гиперактивации иммунной системы, продукции большого количества провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), которые инициируют, наряду с защитными, и патологические реакции (гипотензия, мультиорганные нарушения, связанные с диссеминированной внутрисудистой коагуляцией, оксидативный стресс). Комплекс последних составляет синдром эндотоксического (септического) шока. Даже в развитых странах септический шок может являться непосредственной причиной смерти 40–70% инфицированных грамотрицательными бактериями пациентов, поэтому разработка соответствующей патогенетической терапии остается весьма актуальной проблемой в медицинской практике. Ее обоснование и рациональное применение возможны при условии четкого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе детекции и последующей элиминации эндотоксинов.

В связи с особой значимостью присутствия липополисахарида (ЛПС) в оболочке грамотрицательных бактерий и реакций иммунной системы на эту группу микроорганизмов следует кратко рассмотреть современное представление о структуре эндотоксинов.

Липополисахарид (эндотоксин) наружной мембраны является «визитной карточкой» грамотрицательных бактерий, он состоит из связанных амидной связью полисахарида и липида А. Полисахаридная часть ЛПС ориентирована на поверхность микробной клетки и в значительной степени определяет серологическую специфичность О-антигена. Полисахарид в свою очередь состоит из антигенной боковой цепи, представляющей собой полимер из различных сочетаний абеквозы, маннозы, рамнозы, галактозы и глюкозы, которая, как правило,

выступает над поверхностью клеточной оболочки и сердцевинной (коровой) части, которая в качестве основных структурных компонентов содержит несколько молекул 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), гексозы, этаноламин и фосфорную кислоту. Три остатка КДО образуют структурный блок, связывающий двухвалентные катионы магния и кальция. Комплекс КДО с катионами определяет в значительной степени некоторые структурно-функциональные свойства внешнего слоя наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Удаление катионов с помощью таких хелатообразующих агентов, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), приводит к разрыхлению наружной мембраны, освобождению (солюбилизации) из нее части молекул липополисахарида и изменению ее барьерных функций. В норме непроницаемая для гидрофобных соединений наружная мембрана в этих условиях начинает пропускать их внутрь клеточной стенки. Серцевинный полиакририд ковалентно связан с липидом А, формирующим внешний слой наружной мембраны бактерий. Таким образом, структура наружной мембраны асимметрична, поскольку липополисахарид локализован исключительно в ее внешнем слое.

Липид А является частью молекулы липополисахарида, ответственной за большинство проявлений эндотоксического шока. Поэтому не случайно, что в животном организме существует многокомпонентная система выявления и нейтрализации как этого соединения, так и всей молекулы эндотоксина в целом. Наиболее чувствительными эндогенными детекторами липида А у позвоночных животных являются липополисахаридсвязывающий белок (ЛСБ), бактерицидный проницаемостьувеличивающий белок нейтрофилов и лактоферрин.

ЛСБ конститутивно синтезируется гепатоцитами и секретируется в кровь в форме гликозилированного 58 кДа белка, содержание которого в плазме кролика возрастает при инфицировании макроорганизма до 50 мкг/мл в течение первых суток. Подъем уровня белка у человека в период «острой фазы» не так заметен, поскольку его количество в крови достаточно и в норме. ЛСБ имеет тенденцию связываться с низкой аффинностью с сыворочными липопротеидами высокой плотности. Специфическое же связывание ЛСБ в плазме наблюдается

с липополисахаридами грамотрицательных бактерий. Именно комплекс ЛПС/ЛСБ обладает многими иммуномодулирующими свойствами. В настоящее время расшифрованы основные механизмы ЛСБ-опосредованного действия липополисахаридов на иммунную систему животных и человека. Они связаны в основном со способностью рассматриваемого комплекса взаимодействовать с рецептором эндотоксина на моноцитах/макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, которым является мембраноассоциированный белок клеток CD14. Этот белок был открыт в 1990 г. в мононуклеарных фагоцитах как лейцин-богатый гликопротеин с молекулярной массой около 55 кДа, заякоренный в цитоплазматической мембране клеток гликозилфосфоинозитольной ножкой. CD14 рецептирует либо свободные ЛПС-молекулы, либо предварительно избирательно связанные с ЛСБ. ЛСБ является своеобразным катализатором переноса ЛПС на CD14. Связывание эндотоксина с CD14 способно вызывать продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β) макрофагами и обеспечивать последующий эндотоксизм липополисахарида с его перевариванием. Длительное время оставалось непонятным, каким образом лигирование ЛПС рецептором CD14, который лишен внутриклеточного домена, приводит к запуску пути сигнальной трансдукции, завершающемуся синтезом клеткой провоспалительных цитокинов. К настоящему времени получены экспериментальные и генетические доказательства необходимости участия в рассматриваемом процессе наряду с CD14-молекулой так называемого Толл-подобного рецептора-4.

ЛСБ и бактерицидный проникаемостьувеличивающий белок (БПУБ) из нейтрофилов связывают эндотоксин путем взаимодействия с его ацильными цепями фосфатидилхолина. Благодаря передаче ЛПС от ЛСБ к CD14 происходит концентрирование эндотоксина на поверхности клеток хозяина и их реагирование на это взаимодействие. Представляют интерес данные о том, что в зависимости от микроокружения в организме хозяина *Salmonella typhimurium* могут регулировать уровень ацилирования липида А и таким образом противодействовать иммунным механизмам распознавания и элиминации патогена. Необходимо подчеркнуть, что в силу своего кислого

характера липополисахариды являются мишенью антимикробных катионных пептидов и белков (дефенсины, протегрины, цекропины, БПУБ, лактоферрин и т. д.). Эти исследования важны в плане понимания механизмов элиминации грамотрицательных бактерий. Таким образом, через ЛСБ и CD14 липополисахариды мобилизуют механизмы врожденного иммунитета животных, внешним проявлением активации которых является синтез провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β). Гиперпродукция провоспалительных цитокинов часто приводит к синдрому, известному как септический шок.

Шоковая реакция некоторых млекопитающих (мышь, человек) на повышенный уровень липополисахаридов является относительно «молодой» в эволюции животного мира. Рыбы, амфибии, рептилии, птицы и некоторые млекопитающие (крысы, бабуины) не реагируют по типу септического шока на парентеральное введение липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Гиперчувствительность к эндотоксину, скорее всего, является исключением в мире позвоночных животных (в эмбриогенезе у птиц, копытных, кроликов, мышей и человека). Первоначально полагали, что она была связана с прямым разрушающим воздействием ЛПС на цитоплазматические мембраны клеток. Сейчас же мы знаем, что эта реакция опосредована клетками лимфоидной и моноцитарно/макрофагальной природы. Токсическое же действие ЛПС на клетки животного организма опосредовано интенсивной продукцией ФНО α и ИЛ1 β макрофагами вследствие взаимодействия с эндотоксином.

Предварительные данные, свидетельствующие об участии в распознавании ЛПС ряда белковых факторов, помимо CD14, были получены в ходе молекулярно-генетических экспериментов на мышах. Еще в 1968 г. Шульццер показал, что мыши линии С3Н/НеJ являются резистентными к липополисахаридам, что, как выяснилось спустя десять лет, было детерминировано одним из аллельных генов так называемого Lps-локуса. Мутации лишь в одном гене приводила к блокированию пути трансдукции сигнала, вызываемого ЛПС. При рефрактерности к ЛПС мышей линии С3Н/НеJ они оказались, тем не менее, высокочувствительными к инфекции грамотрицательной этиологии. Эти данные свидетельствовали о том, что рецепция ЛПС

с последующей трансдукцией сигнала внутрь клеток необходима для адекватного реагирования клеток иммунной системы на инфекцию.

Выяснилось, что трансдукционный путь передачи информации о детекции ЛПС связан с *Толл-подобными рецепторами (ТЛР)*, с которыми взаимодействует CD14 после связывания с ним эндотоксина. Рецепторы этой группы первоначально были открыты у дрозофилы в связи с их ролью в эмбриональном морфогенезе, а в последующих периодах онтогенеза насекомого они отвечают за формирование у них иммунитета к грибковой инфекции. Генетическими исследованиями было выявлено, что в *Lps*-локусе мышей находится один ген, высоко гомологичный гену Толл-рецептора дрозофилы. Ген отвечает за синтез белка, принадлежащего к группе рецепторов-сирот (*orphan receptor*), который в настоящее время получил наименование Толл-подобного рецептора-4 (*Toll-like receptor-4*) и, как выяснилось, именно он имеет прямое отношение к характеру реагирования мышей на липополисахариды. Делеция в анализируемом локусе мышей приводит к потере реактивности животных на введенные липополисахариды. Подобные генетические локусы и соответствующие им рецепторы выявлены и у человека.

Таким образом, ТЛР4 является сигнальным рецептором для моноцитов/макрофагов, обеспечивающим детекцию патогенов, которые содержат липополисахариды. Рассматриваемый рецептор детектирует тетраацильную часть липида А липополисахаридов, запуская каскад сигнальной трансдукции, который приводит к активации транскрипционного фактора NF κ B, ответственного за регуляцию генов ряда провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β). Внеклеточный домен (С часть молекулы) ТЛР4 чрезвычайно вариабелен у разных видов, в то время как внутриклеточный (N-концевой) достаточно консервативен. Структурные особенности внеклеточного домена могут определять видовую чувствительность животных к тем или иным эндотоксинам. Структурная стабильность в эволюции внутриклеточного домена отражает стереотипность путей трансдукции сигнала внутри клеток. Необходимо обратить внимание на то, что внутриклеточные домены Толл-подобных рецепторов и рецептора ИЛ-1 1-го типа гомологичны друг другу, в связи с чем

они получили название TIR доменов. Это частично может объяснить известный факт поразительного сходства иммуномодулирующего действия липополисахаридов и ИЛ-1 на функциональную активность моноцитов/макрофагов.

После связывания ЛПС с CD14/ТПР4 рецепторным комплексом моноцитов/макрофагов наблюдается продукция клетками иммунной системы ряда физиологически активных веществ (провоспалительных цитокинов, адгезионных молекул), обеспечивающих мобилизацию дополнительных факторов резистентности к инфекции. В этом смысле ЛСБ/CD14/ТПР4-опосредованная детекция ЛПС во внутренней среде животного организма выполняет роль «сторожевой системы», реагирующей на микроколичества эндотоксина и мобилизующей механизмы нейтрализации и элиминации патогена.

Таким образом, ЛСБ может выполнять функции как опсонина, облегчающего макрофагальный фагоцитоз комплекса эндотоксин/ЛСБ, так и молекулы, осуществляющей докиривание связанного ЛПС к рецепторному комплексу CD14/ТПР4, что позволяет рассматривать ЛСБ, CD14 и ТПР4 как структуры, относящиеся к паттернраспознающим рецепторам (молекулам).

ТОЛЛ- И ТОЛЛ-ПОДОБНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ КАК КОМПОНЕНТЫ РЕКОГНОСЦИРОВОЧНОГО АППАРАТА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Выживание животных в среде, изобилующей потенциально патогенными для них микроорганизмами, возможно при условии наличия у них совокупности механизмов немедленного распознавания и элиминации микробов, формирующих эволюционно древнюю форму иммунитета, именуемого врожденным (примордиальным, конституциональным, естественным). Важную роль в становлении врожденного иммунитета играет система детекции (рекогниции, распознавания) чужеродных молекул и их носителей. Значимым достижением последнего десятилетия в этой области исследований являются данные о природе и характере взаимодействия с патогенассоциированными

молекулярными паттернами группы рецепторов, известных как Толл-рецепторы и Толл-подобные рецепторы у человека и мыши.

Подобное экзотическое название рассматриваемой группе рецепторов дала известная немецкая исследовательница, лауреат Нобелевской премии по физиологии или медицине за 1995 г. Кристиана Нюсляйн-Фольхард. «Toll» переводится с немецкого как «невероятно» или «умопомрачительно». Именно так отреагировала Нюсляйн-Фольхард на картину аномального эмбрионального развития дрозофилы, которую ей продемонстрировали сотрудники лаборатории. Этой группой исследователей анализировалась экспрессия набора генов в эмбриогенезе и их значимость в закладке органов и тканей насекомого. Они широко использовали в своей работе методы молекулярной биологии по включению и выключению генов, имеющих отношение к морфогенезу. Ими было, в частности, выявлено критическое значение в закладке дорсовентральной оси тела дрозофилы рецепторов, которые и получили наименование «Толл-рецепторов».

Уже другой группой ученых было установлено, что столь значимые для морфогенеза в эмбриональный период рецепторы у взрослых насекомых (имаго) имеют прямое отношение к формированию рекогносцировочных механизмов врожденного иммунитета. Как выяснилось далее, взаимодействие компонентов микробных оболочек (липополисахариды, пептидогликаны, липотейхоевые кислоты, глипротеиды микобактерий, маннаны низших грибов) с клетками-носителями Толл-рецепторов инициирует в них процессы синтеза антимикробных пептидов и белков, которые участвуют в киллинге бактерий и низших грибов. При этом одни рецепторы реагируют на липополисахариды, другие — на компоненты клеточной стенки низших грибов, третьи — на пептидогликаны и т. д. Подобная избирательность реагирования на лиганды патогенов (патогенассоциированных молекулярных паттернов) рецепторов иммунных клеток организма определяет прицельность и эффективность иммунного реагирования животных на инфекцию. В последние годы выявлены Толл-подобные рецепторы, участвующие в дискриминации ДНК бактериального и животного происхождения, основанной на детекции степени метилирования цито-

ция в CpG-парах, которая почти на порядок выше в ДНК эукариот. Рассматриваемое семейство рецепторов дополняет группу рецепторов, связанных с лектинами и формилметиониловыми пептидами, которые в совокупности обеспечивают эффективное распознавание «несвоего» как у беспозвоночных, так и у позвоночных животных системой врожденного иммунитета.

Группа Толл-подобных рецепторов у млекопитающих (человек, мышь) представлена как на поверхности (ТПР2, ТПР4, ТПР5, ТПР6), так и в вакуолярном аппарате (ТПР2, ТПР7, ТПР8, ТПР9) клеток, имеющих отношение к защитным реакциям организма. Толл-подобные рецепторы у позвоночных экспрессируются на клетках мононуклеарной фагоцитирующей системы, дендритных клетках, нейтрофилах, базофилах и тучных клетках, эозинофилах, НК-клетках и эпителиоцитах, а у насекомых — на клетках жирового тела (функциональный аналог печени позвоночных) и амебоцитах. Гены и соответствующие им белки, принадлежащие к семейству Толл-подобных рецепторов, были выявлены и в клетках человека.

В настоящее время известно 10 изоформ ТПР у человека и 12 — у мыши. Для многих из них установлены лиганды, а также молекулярные компоненты путей сигнальной трансдукции, приводящих к активации транскрипционных факторов, которые ответственны за регуляцию того или иного набора генов иммунного ответа у животных. У человека и мыши описано четыре адапторных белка, взаимодействующих с TIR-доменами ТПР: MyD08; MAL/TIRAP; TRIF; TRAM. Эти адапторные белки обеспечивают проведение сигналов с ТПР, IL1R, IL18R, благодаря гомофильному взаимодействию с T1K-доменами рецепторов, с одной стороны, и доменами смерти серин-треониновых протеинкиназ (IRAK, TBK1) — с другой. Благодаря этим белкам формируются межбелковые контакты в проксимальных частях путей сигнальной трансдукции, которые завершаются активацией соответствующих транскрипционных факторов (NFκB, IRF3), транслоцирующихся из цитоплазмы в ядро и взаимодействующих со специфическими сайтами в области промоторов и энхансеров генов иммунного ответа.

Клетки иммунной системы человека экспрессируют в различных сочетаниях до десяти разнообразных Толл-подобных

рецепторов, каждый из которых участвует в распознавании одного или группы молекулярных паттернов. Наибольшее внимание исследователей до настоящего времени было привлечено к ТПР2 и ТПР4. Последний рецептор имеет прямое отношение к распознаванию ополисахаридов (эндотоксина) грамотрицательных бактерий, поскольку нокаут его гена (1ps) приводит к потере «чувствительности» организма к этому соединению. Мыши с выключенным геном 1ps резистентны к септическому шоку, вызываемому ополисахаридами, но чувствительны к инфекции грамотрицательной этиологии.

ТПР2 ответствен за распознавание липопротеидов микобактериального происхождения. Этот же рецептор в кооперации с ТПР6 распознает пептидогликаны бактериальных стенок. Другая система детекции чужеродных молекул опосредована ТПР9. С этим рецептором связана способность распознавать метилированные остатки цитозина в CpG-парах ДНК микробного и вирусного происхождения.

Первые рецепторы рассматриваемого семейства были выявлены у дрозофил в ходе анализа путей сигнальной трансдукции, контролирующей формирование дорсовентральной оси эмбриона плодовой мушки. Толл-гены ответственны за синтез трансмембранных белков с большим внеклеточным доменом, включающим множественные повторы, обогащенные аминокислотой лейцином. В эмбриогенезе рассматриваемые белки участвуют в межклеточных взаимодействиях, ответственных за морфогенетические процессы, а у взрослой мухи-имаго они опосредуют индуцибельные реакции иммунной системы насекомого. Белки, гомологичные Толл-рецепторам плодовой мушки, были вскоре обнаружены у человека и мыши.

В силу структурной гомологии между белками млекопитающих и белками Толл-рецепторов плодовой мушки первые называли Толл-подобными рецепторами. Функционально эти белки оказались связанными с рецепцией патогенассоциированных молекулярных паттернов клетками иммунной системы млекопитающих. В настоящее время у человека выявлено десять изоформ Толл-подобных рецепторов, каждый из которых самостоятельно или в сочетании с другими осуществляет изби-

рительную детекцию какого-то одного или группы молекулярных паттернов.

Как рассматривалось в предыдущем разделе, Толл-подобный рецептор-4 оказался ответствен за связывание с липидом А липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Причем это связывание осуществляется внеклеточным лейцинобогатым доменом рецептора совместно с надмолекулярным комплексом липополисахаридсвязывающий белок/CD14/MD2-белок. Формирование многокомпонентного комплекса обеспечивает оптимальное связывание эндотоксина с ТПР4 и запуск пути сигнальной трансдукции, приводящего к активации транскрипционного фактора NFκB. Последний связывается со специфическими сайтами промоторов и энхансеров более чем 150 генов, ответственных за синтез белков и пептидов, вовлеченных в той или иной степени в иммунный ответ организма на инфекцию. Один из путей активации гомологичен по структуре NFκB — фактору транскрипционных факторов дрозофилы, участвующих в иммунном реагировании насекомого на патогены грибковой и бактериальной этиологии. Поражает удивительное сходство ряда ключевых компонентов сравниваемых путей сигнальной трансдукции у животных, разделенных в эволюции несколькими сотнями миллионов лет.

Среди соединений, синтез которых на генетическом уровне активируется транскрипционным белком NFκB, представлены цитокины: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНОα, ЛТα, ЛТβ, GM-CSF, ИЛ-8; адгезионные факторы ICAM, VCAM, ELAM; ко-стимуляторные молекулы CD40, CD80 и CD86; дефенсины, продуцируемые эпителиями (TAP, hβD2, mβD2). Многие из этих белков и пептидов в той или иной степени не только участвуют в реализации иммунного ответа врожденного типа, но и регулируют ряд реакций приобретенного иммунитета у позвоночных.

Отличительной особенностью системы врожденного иммунитета является ее способность распознавать широкий спектр микрорганомов, используя для этого ограниченный репертуар рецепторов. Структура некоторых из них отличается удивительным постоянством (инвариантностью) на протяжении сотен миллионов лет эволюции животных. Наиболее показательным примером консерватизма структуры некоторых рецепторов

врожденного иммунитета являются Толл-рецепторы человека и мыши. Объяснение установленному структурному сходству рецепторов лежит, по-видимому, в том, что их лиганды являются также мало изменяющимися в эволюции структурными компонентами микроорганизмов, получивших название патогенассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП)*. Между изоформами Толл-рецепторов насекомых и Толл-подобных рецепторов млекопитающих существует специализация по преимущественному связыванию или реагированию на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн. Уже у дрозофилы Толл-рецептор (ТР) реагирует на инфицирование грибами, а гомологичный ему 18 Weeler рецептор — на бактериальную инфекцию. Представители этого суперсемейства рецепторов у человека были открыты в лаборатории Ч. Джэнзюя в 1997 г., а в лаборатории Б. Бьютлера был впервые изучен ТПР4 мыши, ответственный за реагирование клеток иммунной системы на эндотоксины. Установлено, что каждая изоформа Толл-подобных рецепторов мыши и человека ответственна за детектирование какого-то одного типа или группы структурно сходных лигандов. За детекцию пептидогликанов оказались ответственны ТПР2 в кооперации с ТПР6. Флагеллин — белок жгутиков бактерий выявляется ТПР5, а бактериальная ДНК — ТПР9, ТПР4 лигирует непосредственно липополисахариды, а ТПР3 детектирует двуспиральную РНК вирусов. Спектр ПАМП для ТПР2, по-видимому, более разнообразен: пептидогликаны и липопотеины бактерий, липоарабиноманнаны микобактерий, маннаны дрожжей. Есть сведения в пользу того, что предпочтение тому или иному из лигандов формируется в ходе ассоциации ТПР2 с другими ТПР. Это доказано в случае детекции пептидогликанов связкой рецепторов ТПР2 и ТПР6.

В настоящее время доказано, что гетерологичная (как в случае ТПР2 и ТПР6) или гомологичная (в случае ТПР3, ТПР4, ТПР9 и др.) димеризация Толл-подобных рецепторов является необходимым условием инициации пути сигнальной трансдукции в результате связывания патогенассоциированных молекулярных паттернов. У человека и мыши липополисахари-

* Более подробно о природе ПАМП см. на с. 81

ды взаимодействуют с Толл-подобными рецепторами непосредственно, будучи докированными к ним в форме двойного (ЛПС/CD14) или тройного (ЛПС/ЛСБ/CD14) комплекса.

Следует обратить внимание, что в случае ТПР4 возможны как минимум два пути сигнальной трансдукции, приводящие к активации различных факторов инициации транскрипции и, как следствие, к нескольким различающимся спектрам синтезируемых цитокинов. Основной путь, рассмотренный нами ранее в связи с активацией транскрипционного фактора NFκB, в своей проксимальной внутриклеточной части сопряжен с гетеродимерным комплексом, состоящим из белков MyD88 и MAL/TIRAP. Параллельный ему путь сигнальной трансдукции, иницируемый также связыванием липополисахаридов с ТПР4, в качестве инициального внутриклеточного звена включает гетеродимерный комплекс TRAM/TRIF, который, мобилизуя киназу TBK1, создает условия для фосфорилирования и переноса в ядро транскрипционного белка IRF3. Последний может активироваться также в результате разветвления пути сигнальной трансдукции, который начинается с ТПР3, ответственного за детектирование двуспиральных РНК вирусов или их молекулярных имитаторов (полиинозин/цитозин). В ядре фосфорилированный IRF3 связывается с регуляторными сайтами ряда генов, иницируя их транскрипцию, завершающуюся синтезом цитокинов, которые необходимы в формировании защитных реакций организма.

Вопрос о том, являются ли флагеллин и ДНК бактерий непосредственными лигандами для Толл-подобных рецепторов насекомых или они иницируют пути сигнальной трансдукции опосредованно, как это имеет место в случае Толл-рецептора у дрозофилы, остается открытым до настоящего времени. Как однозначно установлено, молекулы микробного происхождения (ПАМП) не являются непосредственными лигандами Толл-рецепторов у насекомых. Компоненты грамположительных бактерий избирательно связываются циркулирующим в гемолимфе пептидогликанраспознающим белком, что приводит к активации еще не до конца изученным путем ферментов протеиназ гемолимфы, осуществляющих ограниченный протеолиз и выщепление из молекулы-предшественницы

цитокиноподобного пептида. В случае грибковой инфекции компоненты их клеточной стенки так же активируют протеазный каскад, приводящий к образованию цитокина, который запускает путь сигнальной трансдукции с Толл-рецептора, завершающийся активацией транскрипционного фактора DIF у взрослого животного или Dorsal у личинки дрозофилы. Транслокация DIF в ядро инициирует транскрипцию генов иммунного ответа у насекомого и, в частности, эффективного противогрибкового пептида дрозомидина. Моноциты/макрофаги, незрелые дендритные клетки и эпителиальные клетки млекопитающих реагируют на взаимодействие со всеми рассмотренными ПАМП активацией транскрипционных факторов NF κ B, AP1 и IRF3 и последующей продукцией цитокинов, хемокинов, адгезионных и костимулирующих молекул, антимикробных пептидов и белков. Все эти физиологически активные соединения участвуют в реализации эффекторной фазы иммунного ответа врожденного типа на ПАМП, а также в той или иной степени оказывают регулирующее воздействие на реакции приобретенного иммунитета у позвоночных животных.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР NF κ B И РОДСТВЕННЫЕ ЕМУ БЕАКИ

NF κ B был открыт в лаборатории Д. Балтимора (США) при изучении механизмов регуляции гена, ответственного за синтез легкой κ -цепи иммуноглобулинов в В-лимфоцитах мыши. В синтезирующих иммуноглобулины лимфоцитах он был выявлен в ядре клеток, что и послужило основанием для принятия в литературе названия: Nuclear Factor κ B. В дальнейшем выяснилось, что рассматриваемый транскрипционный фактор встречается практически во всех клетках человека, причем его первоначальная после синтеза локализация является цитоплазматической, где он находится в связанном состоянии со своим ингибитором (Inhibitor κ B или I κ B). Процесс активации NF κ B является многостадийным. Он инициируется многочисленными химическими, физическими и биологическими факторами при стрессе и инфицировании животных и человека. Каскады активации NF κ B начинаются после связывания лигандов с рецепто-

рами некоторых цитокинов (IL1R, IL18R) и Толл-подобными рецепторами. Многоступенчатый процесс сигнальной трансдукции инициируется фосфорилированием IκB с его последующим протеолизом в протеосомах и транслокацией «освобожденного» от ингибитора NFκB в ядро. В ядре NFκB выполняет свою функцию транскрипционного фактора, связываясь со специфическим сайтом κB в промоторах и энхансерах более чем 150 генов.

По своей структурной организации NFκB и родственные ему белки являются димерами, состоящими из субъединиц p50 (NFκB1), p52 (NFκB2), p65 (RelA), Rel (c-Rel) и RelB. NFκB представляет собой гетеродимер, образованный путем нековалентного связывания субъединиц p50 и p65 (RelA) с молекулярными массами около 50 и 65 кДа соответственно. В структуре всех пяти субъединиц выявлены участки RHD (от англ. *Rel Homology Domain*), ранее описанные при изучении онкогена Rel, поэтому все вместе они составляют семейство MEκB/Rel белков. У дрозофилы к этой группе принадлежат транскрипционные факторы. N-концевой RHD домен белков NFκB/Rel семейства является консервативной в эволюции структурой, и именно он ответственен за связывание с κB сайтом промоторов и ингибиторов многих генов белков иммунитета, воспаления и стресса. В C-концевых доменах белков-предшественников субъединиц p50 и p52 представлены последовательности с анкириновыми повторами. В ходе процессинга они отщепляются от молекул p105/p50 (NFκB1) и p100/p52 (NFκB2) соответственно. Кроме того, анкириновые повторы характерны для ингибиторов NFκB — IκBα, IκBβ, Bcl-3, cactus. Именно эти домены маскируют в комплексе NFκB/IκB сигнальные последовательности NFκB, которые определяют конечную ядерную локализацию транскрипционного фактора (nuclear localization sequence — NLS). Наиболее распространенным вариантом NFκB, участвующим в активации генов иммунного ответа и стресса, является гетеродимер p50/p65 (RelA). Функциональная активность именно этой формы транскрипционного фактора будет рассматриваться нами далее. Стрессорные воздействия на организм или его инфицирование инициируют по рецепторопосредованному механизму каскад активации NFκB у млекопитающих и Dif/Relish в клетках дрозофилы.

Лигандом, запускающим путь активации транскрипционных факторов дрозифилы, является эндогенный цистинсодержащий пептид. В случае активации транскрипционного фактора, ответственного за регуляцию транскрипции гена антигрибкового пептида под названием «дрозомицин», образование лиганда Толл-рецептора (ТР) происходит при участии каскада сериновых протеиназ. Нокаут по ингибиторам сериновых протеиназ (серпинам) приводит к неиндуцированному непрерывному синтезу дрозомицина. Протеолитический каскад, формирующий лиганд Толл-рецептора, запускается компонентами микробной стенки. В данном конкретном случае это, по-видимому, маннаны низших грибов.

Существуют и особенности в лигировании липополисахаридов Толл-подобным рецептором четвертого типа (ТПР4) моноцитов/макрофагов у млекопитающих. Как правило, детекцию свободного липополисахарида во внутренней среде животного осуществляет специализированный белок, названный липополисахаридсвязывающим белком (ЛСБ). В отличие от маннозосвязывающего лектина (МСЛ) этот белок распознает эндотоксины по их относительно консервативной части — липиду А. Комплекс ЛСБ/липополисахарид переносится и докирывается к молекуле CD14, локализованной на поверхности иммунных клеток (моноциты/макрофаги, В-лимфоциты, нейтрофилы) и являющейся рецептором эндотоксина. Есть данные и о возможности прямого, непосредственного ЛСБ-связывания липополисахаридов с CD14.

Особенностью CD14 как рецептора, лигирующего эндотоксин, является отсутствие у него внутриклеточного домена. В силу этого связывание им липополисахаридов не приводит к инициации какого-либо каскада трансдукции сигнала. Условия для запуска пути сигнальной трансдукции в макрофагах возникают в случае кооперации CD14 с ТПР4. CD14-рецептор эстафетно передает липополисахарид рецептору ТПР4. Последний, благодаря особенностям структуры своего внеклеточного домена, представляющего собой повторяющиеся аминокислотные последовательности, которые обогащены лейцином, эффективно связывает эндотоксин за счет гидрофобных взаимодействий между липополисахаридом и белком. Подоб-

ное связывание, осуществляемое одновременно двумя пространственно сближенными молекулами ТПР4 в присутствии вспомогательного белка MD-2, инициирует запуск пути сигнальной трансдукции, ведущий к активации NFκB. Сходно этот процесс протекает в клетках жирового тела и гемоцитах дрозофилы после лигирования Толл-рецептором пептида, образование которого было инициировано маннанами низших грибов.

Необходимость сближения двух молекул ТПР4 у мышей или ТР у дрозофилы связана с созданием условий для взаимодействия внутриклеточных доменов этих рецепторов с белком Myd88 (myeloid differentiation factor 88) у мыши и частично гомологичным ему белком Tube у дрозофилы. Эти домены получили название TIR (Toll/IL-1 Receptor homologous region) вследствие того, что они оказались практически идентичными у внутриклеточных частей ТПР и рецептора 1 типа ИЛ-1.

Это открытие позволило понять сходство иммуномодулирующих эффектов эндотоксинов и цитокина ИЛ-1, известное иммунологам еще с 70–80-х гг. XX в. Несмотря на различия в лигандах и структуре внеклеточных доменов ТПР4 и рецептора ИЛ-1, тождественный характер структуры их внутриклеточных доменов определяет возможность реализации общего пути сигнальной трансдукции, завершающегося активацией NFκB. Ассоциированный с Толл-подобными рецепторами белок MyD88 (или Tube у дрозофилы) обеспечивает уже за счет присутствия в его структуре разновидности домена смерти (death domain) образование внутриклеточного комплекса с IRAK-киназами (ИЛ, receptor-associated kinase). У насекомых структурно-функциональным гомологом IRAK-киназ является белок Pelle. Эти киназы, осуществляющие фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина (серин, треониновые киназы), мобилизуют адапторный белок TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). Все эти межмолекулярные взаимодействия приводят к активации комплекса IκB киназы (Inhibitory κB kinase — ИКК), фосфорилирующего ингибитор IκB. Фосфорилирование последнего приводит к его отсоединению от NFκB, последующему убиквитилированию и протеолизу в протеасомах. Свободный NFκB с экспонированным участком сигнала ядерной локализации транслоцируется в ядро, где

и осуществляет после связывания со специфическими для него сайтами ДНК регуляцию генов иммунного ответа.

Сходные по структуре рассмотренным белкам млекопитающих факторы участвуют в активации генов иммунного ответа у дрозофилы, реализуемой через фосфорилирование и последующий протеолиз ингибитора транскрипционных факторов под названием Cactus и транслокации Dorsal в ядро. Компоненты каскада, связывающие TRAF6 (dTRAF1/6) и ИКК (dIKK), также описаны в настоящее время, и один из них известен как ECSIT, который сопряжен с MAP-киназой киназы 1 (MAP-ECSIT kinase kinase-1, или MEKK1). Следует обратить внимание на то обстоятельство, что как у млекопитающих, так и у насекомых в каскадах активации NF κ B и Dif/Relish после звена TRAF (dTRAF1/6) наблюдается разветвление цепи, приводящее к возможности активации одного и того же транскрипционного фактора разными путями, а также вовлечению в регуляционную систему других транскрипционных факторов (AP-1, Elk-1, c-Jun).

Все это свидетельствует о сложности путей, определяющих активацию только нескольких трансфакторов, значимых в иммунном реагировании животных на патогены. Но один из важных выводов, базирующийся на рассмотренном материале, заключается в том, что многие молекулярные звенья реализации иммунных реакций врожденного типа у млекопитающих и насекомых поразительно сходны по своей структуре и характеру функционирования. Как в связи с этим не вспомнить о концепции академика А. М. Уголева о стереотипных структурно-функциональных блоках, достаточно консервативных по своей химической природе, комбинация которых обеспечивает удивительное многообразие регуляторных механизмов живых систем (Уголев, 1985).

Отмечая структурно-функциональное сходство ряда ключевых белков и путей сигнальной трансдукции, связанных с Толл и Толл-подобными рецепторами, необходимо отметить и существующие между ними различия у насекомых и млекопитающих. Во-первых, непосредственным лигандом Толл-рецептора у дрозофилы является эндогенный пептид, индуктивное образование которого из белка-предшественника осуществля-

ется каскадом сериновых протеиназ, активируемых ПАМП (например, маннаны дрожжей). Для большинства же Толл-подобных рецепторов млекопитающих установлено, что их непосредственными лигандами являются ПАМП. Во-вторых, белки Tube (дрозофила) и MyD88 (млекопитающие) каскадов сигнальной трансдукции имеют между собой только частичную структурную гомологию. Наконец, у дрозофилы гомолог ИКК комплекса млекопитающих до настоящего времени достоверно не описан.

Установленное разделение специфичности лигандов для изоформ Толл-подобных рецепторов свидетельствует о том, что уже в рамках блока механизмов врожденного иммунитета у животных наблюдается избирательное реагирование на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн. Так, каскад, начинающийся с Толл-рецептора у дрозофилы, реагирует на грибковую инфекцию насекомого, в то время как защита от бактерий связана с родственным ему 18-Wheeler рецептором. В результате инициации того или иного пути активируются разные группы генов, белковые продукты которых являются антибиотическими пептидами, наиболее эффективно поражающими биологический источник ПАМП. В случае инфицирования дрозофил грибковой инфекцией через Толл-рецептор запускается каскад активации трансфактора Dif/Relish, регулирующего активность гена дрозомидина, — наиболее эффективного в отношении низших грибов антимикробного пептида. При бактериальном вторжении иммунная система дрозофилы (жировое тело, амебоциты гемолимфы, клетки кутикулы) через 18 Wheeler рецептор запускает каскад активации трансфакторов и регулируемых ими генов, которые ответственны за синтез дефенсинов, некропинов и других бактерицидных пептидов.

В системе Толл-подобных рецепторов у млекопитающих также наблюдается разделение функций между отдельными ее представителями. Так, TLR4 реагирует преимущественно на липополисахариды, TLR5 — на белок жгутиков бактерий флагеллин, TLR3 — на двуспиральную РНК вирусов. Некоторые рецепторы, как например TLR2, являются менее избирательными в отношении лигандов и могут реагировать на разнообразные

ПАМП (пептидогликаны, липопроотеиды бактерий, маннаны низших грибов и т. д.). В ряде случаев преимущественное связывание того или иного лиганда Толл-подобным рецептором 2 обусловлено кооперацией ТПР2 с другими изоформами ТПР. Это имеет место, например, при детекции пептидогликана грамположительных бактерий макрофагами, осуществляемое кооперативно ТПР2 и ТПР6. Возможно, что это достаточно распространенный механизм функционирования паттернраспознающих рецепторных молекул. Установлено, что активация NF κ B, опосредованная ТПР4, приводит к продукции дендритными клетками и моноцитами/макрофагами цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО β и экспрессии ими на своей поверхности костимулирующих молекул CD40, B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86), необходимых для межклеточных взаимодействий на уровне региональных лимфатических узлов, которые активируют функционирование Т-лимфоцитов. Таким образом, у позвоночных специализированное реагирование на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн рецепторами системы врожденного иммунитета является одним из необходимых условий для формирования протективного иммунного ответа приобретенного типа.

Некоторые из рассмотренных каскадов активации генов иммунного ответа находятся под регулирующим воздействием со стороны ряда внутриклеточных факторов, известных как *супрессоры цитокиновой сигнализации* (suppressors of cytokine signaling — SOCS). Эти белки были открыты в качестве ингибиторов YAK-киназ, участвующих в каскадах сигнальной трансдукции, инициируемых рядом цитокинов (интерфероны, ИЛ-6, GM-CSF). Семейство SOCS-белков у млекопитающих состоит из 8 членов, характерной структурной особенностью которых является наличие в их составе SH2-домена (src-homology домен второго типа). Этот домен ответствен за избирательное связывание SOCS-белков с белками, фосфорилированными по остаткам тирозина. Их связывание с YAK-киназами приводит к ингибированию активности последних и всех путей сигнальной трансдукции, в которых рассматриваемые киназы являются ведущими звеньями. Синтез этих белков в клетках иммунной системы индуцируется ИЛ-1 и ФНО α , что приводит к

опосредованному SOCS-белками ингибированию путей сигнальной трансдукции ИФН γ , GM-CSGF, ИЛ-6. Некоторые лиганды Толл-подобных рецепторов (липополисахариды, неметирированные по цитозину CpG тандемы ДНК) также инициируют активацию SOCS-белков, независимую от синтеза белка *de novo*. Эти данные дают основание думать, что SOCS-белки являются ингибиторами не только сигнальных путей, в которые вовлечены YAK/STAT-белки, но и некоторых ТПР (ТПР4, ТПР9). В частности, они могут быть ответственны за толерантность к липополисахаридам. Таким образом, семейство супрессоров цитокиновой сигнализации обеспечивает сдерживание гиперактивации некоторых путей сигнальной трансдукции цитокинов (ИЛ-1, ФНО α , ИФН γ), а также ТПР4 и ТПР9, регулируя по принципу отрицательной обратной связи адекватное реагирование клеток иммунной системы на патогенассоциированные молекулярные паттерны и эндогенные цитокины, задействованные в мобилизации иммунных механизмов защиты макроорганизма от инфекции.

NOD- И NALP-БЕЛКИ КАК ПРЕДСТАВИТЕЛИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ, РАСПОЗНАЮЩИХ ПАТОГЕНАССОЦИИРОВАННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТТЕРНЫ

Наряду с системой Толл-подобных рецепторов в клетках человека выявлено два цитоплазматических белка NOD1 и NOD2, в функционировании которых важную роль играет нуклеотидсвязывающий олигомеризационный домен, или нуклеотидсвязывающий сайт (nucleotide-binding oligomerization domain — NOD). Кроме этого домена в состав рассматриваемых белков входят N-концевой каспазомобилизирующий домен (caspase recruitment domain — CARD), которых у NOD2-белка два, и C-концевой домен, состоящий из повторов, обогащенных аминокислотой лейцином (leucine-rich repeat — LRR). Он структурно гомологичен экстрацеллюлярным доменам Толл-подобных рецепторов. Если последние участвуют преимущественно в распознавании патогенассоциированных молекулярных

паттернов, представляемых внеклеточно (за исключением, по-видимому, ТПП9, ТПП8, ТПП7 и ТПП3), то NOD1 и NOD2 детектируют цитоплазматически локализованные ПАМП и внутриклеточные инфекционные агенты. Сходная распознающая патогены система описана у высших растений. Получены доказательства участия NOD1-белка в качестве внутриклеточного рецептора в детекции липополисахарида грамотрицательной бактерии *Shigella flexneri*, инфицирующей эпителиальные клетки человека, и некоторых компонентов пептидогликана: мурамилдипептиды, трипептиды с терминальной диаминопимелиновой аминокислотой. Лигандсвязывающим доменом этих белков является, скорее всего, последовательность, обогащенная лейциновыми повторами (LRR), а NOD (NBS) и в большей степени CARD-домены участвуют в межбелковых взаимодействиях, формирующих пути сигнальной трансдукции, которые завершаются активацией транскрипционного фактора NFκB и генов иммунного ответа. Многие звенья этих путей сигнальной трансдукции являются предметом пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся изучением и разработкой терапевтических средств, направленных на регуляцию активности иммунной системы человека и животных.

Не только ТПП- и NOD-белки содержат в своем составе повторяющиеся домены, обогащенные лейцином (LRRs — leucine-rich repeat). Выявлено новое семейство белков, содержащих подобные структуры и локализованных внутриклеточно. Обычно они не содержат TIR-доменов, но включают домены другой природы (NACHT, CIITA, CARD, PYD и др.). Эти белки составляют семейство «гусеничных» белков (caterpillar protein family).

Среди них представляет интерес субсемейство NALP, включающее 14 белков. Наличие N-концевого домена PYD (pyrin domain), NACHT (domain present in neuronal apoptosis inhibitor protein — NAIP) и LRR (leucine-rich repeats) доменов характерно для всех представителей рассматриваемого субсемейства NALP, за исключением NALP10. Наиболее изучена функциональная роль NALP1-белка. Функционально этот белок является внутриклеточным гомологом Толл-подобных рецепторов. Его домен, состоящий из обогащенных лейцином последовательностей, ответствен за детектирование цитоплазматически-

локализованных патогенассоциированных молекулярных паттернов, взаимодействие с которыми создает конформационные предпосылки для взаимодействия PYD-домена NALP1 с PYD-доменом вспомогательного белка ASC. CARD-домен белка-посредника по принципу гомофильного взаимодействия связывает CARD каспазы-1, или интерлейкин-1 конвертирующего фермента. Дополнительное вовлечение в надмолекулярный комплекс каспазы-5 формирует структуру, получившую в литературе наименование инфламмосомы, которая осуществляет превращение проинтерлейкина 1β (p35-белка) в цитокин ИЛ- 1β (p17-белок). Таким образом осуществляется активация одного из ключевых провоспалительных цитокинов иммунной системы человека, опосредуемая NALP1-белком как системообразующим компонентом инфламмосомы.

ПЕПТИДОГЛИКАНРАСПОЗНАЮЩИЕ БЕЛКИ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ РЕКОГНОСЦИРОВОЧНОЙ СИСТЕМЫ ЖИВОТНЫХ

Наряду с Толл-подобным рецептором-2, который участвует в распознавании пептидогликанов микроорганизмов, в процессе эволюции у ряда животных возникла система циркулирующих и клеточно-ассоциированных пептидогликанраспознающих белков. Представители этой группы паттернраспознающих рецепторов (молекул) выявлены у насекомых и млекопитающих: мыши, крупного рогатого скота и человека. У *D. melanogaster* белки этой группы (например, PGRP-SA) инициируют каскады сигнальной трансдукции, ведущие к активации генов, ответственных за синтез антимикробных пептидов (дрозомицин, цекропин, апацин), а у шелкопряда *B. mori* — за активацию профенолоксидазной системы. Пептидогликанраспознающий белок крупного рогатого скота, который локализован в гранулярном аппарате нейтрофилов и базофилов, оказывает прямое микробицидное действие. Отсюда можно заключить, что пептидогликанраспознающие белки являются составляющим звеном системы паттернраспознающих рецепторов.

СИСТЕМА ПАТТЕРНРАСПОЗНАЮЩИХ РЕЦЕПТОРОВ

Система рецепторов и молекул, распознающих ПАМП, включает Толл- и Толл-подобные рецепторы, NOD-белки, CD14-рецептор, липополисахаридсвязывающий белок, маннозо(маннан)связывающий лектин, маннозный рецептор макрофагов, пептидогликанраспознающие белки, сквенджер-рецепторы, рецептор комплемента третьего типа (CR3). Система паттернраспознающих рецепторов (ППР) представлена в эволюции животного мира от губок до человека. Что касается Толл-подобных рецепторов, то уже у нематоды *C. elegans* и представителя хелицерных мечехвостов *T. tridentatus* выявлены гены, родственные генам Толл-рецепторов дрозофилы и Толл-подобных рецепторов млекопитающих. У мечехвостов описана развитая система лектинов, распознающих липополисахариды и пептидогликаны бактерий. Все это однозначно свидетельствует о древнем происхождении рассматриваемой рекогносцировочной, определяющей «несвое» (патогенное) системы иммунитета. Как и тот факт, что система внутриклеточных NOD-рецепторов животных гомологична рецепторной системе высших растений, представленной R-белками.

По-видимому, NOD-белки, наряду с лектинами, являются древними факторами распознающих «несвое» (патогенное) молекул в эволюции всего живого мира. Гомологичные по лейцинобогащенным повторам NOD-белков домены представлены в составе Толл-подобных рецепторов млекопитающих. Избирательность взаимодействия этих рецепторов со своими лигандами различна — от узкой, характерной для TLR4, до широкой, свойственной TLR2.

Необходимо обратить внимание и еще на одну особенность паттернраспознающих рецепторов. Наряду с «внешними» лигандами, являющимися, как правило, структурами микробных клеток и вирионов, многие ППР имеют и «эндогенные» лиганды. Часто это модифицированные или «стареющие» макромолекулы собственного организма животных либо молекулы, претерпевшие в силу разных причин изменения в клеточной локализации (hps60, лизосомальные гидролазы). Но среди них фигурируют многие соединения с неизменными струк-

турными свойствами или локализацией (фибриноген, ЛПВП, лиотропин и т. д.).

Обращает на себя внимание и тот факт, что активация генов иммунного ответа через ТПР также может осуществляться эндогенными лигандами. Биологическая значимость активации некоторых генов иммунного ответа эндогенными («своими», непатогенными) компонентами клеток остается невыясненной. Если исходить из концепции «о сигналах опасности», активирующих отдельные механизмы врожденного иммунитета животных, то можно допустить, что делокализованные неизменные молекулы собственного организма (hsps 60, 70, 90) могут выполнять функцию сигналов о нарушении клеточного и тканевого гомеостаза. Можно также предположить, что подобная клеточная реактивность значима в морфологических процессах на тех или иных стадиях эмбриогенеза животных, как это было установлено при изучении Толл-рецепторов у дрозофилы. В пользу этого могут говорить известные данные о том, что фагоциты млекопитающих (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки) играют важную роль не только в защите от инфекции, но и в удалении стареющих клеток. Таким образом, распознавание микробных патогенассоциированных паттернов рекогносцировочной системой врожденного иммунитета может рассматриваться в качестве составной части широкой системы гомеостатического клиренса, направленного на поддержание постоянства внутренней среды многоклеточных организмов. Функциональный дуализм отдельных представителей системы паттернраспознающих рецепторов достаточно очевиден на ряде примеров.

CR3 является $\beta 2$ -интегрином, известным также как CD18/CD11b, он играет ключевую роль в мобилизации моноцитов и нейтрофилов в очаги воспаления и фагоцитозе опсонизированных микроорганизмов. В дополнение к этому CR3 может прямо рецептировать *Mycobacterium tuberculosis* и зимозан дрожжей, ICAM-1, отдельные компоненты свертывающей системы (фибриноген, Factor X), стареющие тромбоциты и денатурированные белки, апоптотические тельца. CR3-опосредованный фагоцитоз, осуществляемый макрофагами, не сопровождается освобождением арахидоновой кислоты и продукцией активных

форм кислорода, как это имеет место при Ес-рецепторами опосредованном фагоцитозе. Этот вариант фагоцитоза протекает с минимальными проявлениями симптоматики воспаления.

СР макрофагов и некоторых эндотелиев характеризуются широкой специфичностью связывания полианионных лигандов. Наиболее охарактеризованы скавенджер-рецепторы класса А (например, SR AI/II), с которыми связан эндоцитоз модифицированных липопротеидов низкой плотности. Они содержат так называемый домен SRCR-типа, встречающийся во многих молекулах адгезии и эндоцитоза. К тому же семейству относится рецептор MARCO, участвующий в связывании ацетилированных ЛПНП. SR-A участвует в фагоцитозе апоптотических тимоцитов и неопсонизированных бактерий *Neisseria meningitis* макрофагами. Животные с нокаутом по гену SR-A оказываются по сравнению с конвенциональными более чувствительными к эндотоксининдуцированному шоку. Это свидетельствует об участии SR-A в связывании и нейтрализации липополисахаридов по пути, отличному от того, который опосредован ТПП-4. SR-A-опосредованный клиренс липополисахаридов не связан с продукцией макрофагами провоспалительных цитокинов, ответственных за патогенез септического шока. Таким образом, SR-A проявляют как свойства адгезионных молекул, так и опосредуют эндоцитоз и фагоцитоз модифицированных компонентов собственного организма и ряда экзогенных лигандов (липополисахариды, липотейхоевые кислоты, *N. meningitis*). Другие классы СР (например, CD36) участвуют в липопротеиновом транспорте и обмене, а также клиренсе апоптотических клеток, хотя известны отдельные случаи вовлечения их в фагоцитоз некоторых бактерий и простейших (*Plasmodium falciparum*; *Trypanosoma cruzi*).

Макрофаги экспрессируют на своей поверхности набор лектиноподобных рецепторов С-типа, подобных тем, которые встречаются на НК-клетках. Мажорным рецептором этой группы на макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках мыши является дектин-1, связывающий β -гликаны зимозана и других компонентов дрожжевого происхождения. В то же самое время дектин-1 может взаимодействовать с некоторыми Т-клетками по пути, не зависящему от присутствия β -гликанов. Как и в слу-

чае с СР, для дектина-1 характерен функциональный дуализм, проявляющийся при взаимодействии с эндогенными и экзогенными лигандами, что может свидетельствовать о присутствии в молекуле рецептора несовпадающих сайтов для связывания лигандов различного происхождения.

Маннозный рецептор макрофагов, дендритных клеток и некоторых эндотелиев является типичным представителем лектинов С-типа. Это лектин с широкой лигандной специфичностью, поскольку он связывает гликоконъюгаты, в терминальном положении которых находятся D-манноза, L-фукоза или D-N-ацетилглюзамин. Лигирование сахаров углеводраспознающим доменом маннозного рецептора является Ca^{2+} -зависимым, что характерно для всех лектинов С-типа.

Лиганды маннозного рецептора локализованы на поверхности бактерий, низших грибов, простейших, вирионов и вирусинфицированных клеток. Рецептор содержит несколько углеводраспознающих доменов. Домены с 4 по 7 связывают липополисахариды *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*. Эндогенными лигандами МР являются L-селектин, вовлеченный в клеточную миграцию, и ряд лизосомальных гидролаз. Наряду с УРД, МР содержит N-богатый домен, который способен связывать gp120-блок вируса иммунодефицита человека, а также такие эндогенные лиганды, как лютеотропин и тиреоидстимулирующий гормон, сиалоадгезин, CD45, сульфатированные по галактозе олигосахара. Макрофаги освобождают в кровь растворимую форму маннозного рецептора. Обе формы рецептора, по-видимому, активно участвуют в клиренсе гликоконъюгированных антигенов, в том числе собственных молекул, и поврежденных (измененных) собственных молекул. Известно еще несколько молекул, подобных маннозному рецептору. Это Дес 205 и фосфолипаза А2-рецептороподобная молекула. Лиганды этих лектинов пока не описаны.

Такие коллектины, как маннозо(маннан)связывающий лектин и сурфактантные белки SPA и SPD, обладают такой же лигандсвязывающей специфичностью, как и маннозный рецептор. Все это свидетельствует о наличии у человека и животных целого набора С-лектинов, распознающих гликоконъюгаты по терминально-локализованным остаткам маннозы, фукозы и

N-ацетилглюкозамина. Для большинства из этих рецепторных молекул известны как экзогенные, относящиеся к группе патогенассоциированных молекулярных паттернов, так и эндогенные лиганды, часть из которых представляет неизменные, но декомпартментализованные молекулы (лизосомальные гидролазы, миелопероксидаза, тироглобулин, амилаза и др.), в то время как другие являются модифицированными соединениями (например, модифицированные липопротеиды низкой плотности), которые должны быть подвергнуты клиренсу для поддержания антигенного гомеостаза организма.

Доказательства участия Toll-белка, который был известен ранее как рецептор, участвующий в морфогенетическом процессе закладки дорсовентральной оси насекомого, в обеспечении иммунной резистентности организма плодовой мушки к низшему грибу *Aspergillus fumigatus* явились мощным импульсом к развитию современной концепции врожденного иммунитета. Уже в исследованиях на мышах было показано, что в реагировании на липосахариды ключевую роль играет ген, локализованный в локусе *Lps*, нокаут по которому приводит к резкому снижению чувствительности животных к рассматриваемому патогенассоциированному молекулярному паттерну и их резистентности к грамотрицательным бактериям. Как теперь известно, этот ген ответствен за синтез одной из изоформ Толл-подобных рецепторов мыши, а именно ТПР4, для которого лигандами являются эндотоксины. Способность большинства рецепторов клеток фагоцитирующей системы детектировать как «несвой», так и «свои» лиганды отражает исходно многофункциональное назначение клеток этого ряда (моноциты/макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, разновидности эндотелиоцитов).

Они обеспечивают отдельные стороны морфологических (контроль за нормально функционирующим клеточным составом тканей посредством фагоцитоза клеток, вступивших на путь апоптоза), трофических (продукция ростовых факторов ангиогенеза) и детоксицирующих (система цитохрома P-450 в клетках Купфера) процессов в организме и в то же самое время являются ведущими клеточными компонентами системы механизмов врожденного иммунитета. Участие фагоцитов в том или ином процессе определяется, по-видимому, различным ха-

рактором «своих» и «несвоих» лигандов, рецепторами и несовпадающими путями сигнальной трансдукции, которые обеспечивают дифференцированный характер реагирования клеток на эндо- и экзогенные вещества.

При распознавании «своих» или модифицированных «своих» молекул фагоцитарные клетки чаще реагируют таким изменением своей функциональной активности, которая, как правило, приводит к локальным или системным воспалительным процессам. В случае детектирования «несвоих» соединений (патогенассоциированных молекулярных паттернов, ксеноантигенов) фагоцитарный процесс часто сопровождается продукцией и секрецией провоспалительных факторов (O_2 , NO , цитокины и др.). В этом заключается основное различие в реагировании клеток на «свои» и «несвои» молекулы, хотя оно далеко не во всех случаях бывает таким полярным.

Различия в профиле экспрессируемых рецепторов и путей сигнальной трансдукции, каждый из которых приводит к связанному с ним реагированию антигенпредставляющих клеток, и форме функциональной активности и активации группы генов, в каждом конкретном случае определяют характер клеточного ответа на те или иные лиганды.

В случае лигирования «несвоих» молекул клетками системы врожденного иммунитета мобилизуются механизмы элиминации чужеродного, сопровождаемые, как правило, теми или иными проявлениями воспалительного процесса, распознавание «своих» молекул включает механизмы их удаления (клиренса) без заметной симптоматики воспаления. Подобный механизм детекции, будучи модифицирован по структуре «своего», обеспечивает очищение организма от молекулярных «шлаков» и поддерживает постоянство антигенного состава его внутренней среды (антигенный гомеостаз организма).

Таким образом, дискриминация «свое» и «несвое» (чужеродное) в рамках блока механизмов врожденного иммунитета представляется как многоуровневый процесс, в который вовлечены как клетки, так и ряд межклеточных взаимодействий, опосредованных клеточно-ассоциированными и циркулирующими (гуморальными) молекулами.

С этого момента и начинается инфекционный процесс. Однако разовьется ли эта инфекция в заболевание или защитные факторы окажутся в состоянии подавить ее у места входа, т. е. на первой внутренней линии защиты организма, будет зависеть как от природы самого микроба, его вирулентности и количества (дозы), так и от восприимчивости организма, от мобилизационной готовности его защитных сил и средств. Начинается серия процессов, объединяемая под названием реакции воспаления.

Группы мобилизованных клеток устремляются на поврежденное место, создают защитный вал и начинают уничтожать или обезвреживать вторгшиеся бактерии. Некоторые защитные клетки поглощают и разлагают бактерии при помощи ферментов. Многие из этих клеток все же погибают под давлением токсинов, выделенных бактериями, и поле боя вскоре покрывается погибшими клетками и продуктами их распада. Если организм ранее уже перенес инвазию бактерий этого вида, то расправа с агрессором бывает более быстрой. Вместе с клетками в воспалительный очаг поступает и жидкая часть крови, в которой содержатся такие важные факторы защиты организма, как антитела, опсонины, комплементы, вирусные ингибиторы.

БЕАКИ И ФЕРМЕНТЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ И ДРУГИХ ТКАНЕВЫХ И КЛЕТОЧНЫХ СЕКРЕТОВ

В лимфе и других тканевых секретах содержится большое количество различного рода веществ, обладающих выраженным антимикробным действием. Это действие характеризуется в одном случае гибелью микроорганизмов (бактерицидное действие), в другом — задержкой их роста и размножения (бактериостатическое действие).

Губительное действие сыворотки крови зависит от содержания в ней таких веществ, как комплемент, пропердин, лизоцим, бактериолизины, интерферон и др. Комплемент состоит из десяти различных белков и проявляет свою активность в присутствии ионов Mg^{++} и Ca^{++} . Он обладает способностью уси-

ливать действие пропердина и других антимикробных веществ. Высокое содержание пропердина в крови является фактором защиты, а снижение его уровня указывает на ослабление защитных свойств организма. Пропердин — белок сыворотки, который тесно связан с комплексом белков комплемента и создает систему из пропердина, комплемента и ионов магния и кальция. Количество пропердина в крови определяет степень устойчивости к различным микроорганизмам. Искусственное введение сыворотки крови, богатой пропердином, повышает устойчивость животного к инфекции. Система пропердина состоит из бета-глобулина, магния и комплемента. Эта бактерицидная система является весьма мощным механизмом естественной резистентности организма к некоторым возбудителям. Полагают, что в системе с магнием и комплементом пропердин убивает многие бактерии, инактивирует некоторые вирусы, лизирует аномальные эритроциты. Согласно данным Л. Пиллемера, открывшего эту систему, крыса имеет 25–50 единиц пропердина, морская свинка — 1–2, человек — 4–8 единиц. Как показали исследования, выраженность естественного иммунитета к большинству болезней находится в прямой зависимости от содержания пропердина в крови животных. При высоком содержании пропердина сопротивляемость инфекциям оказывается высокой. Более того, в отличие от других иммунных факторов пропердиновая система, очевидно, является частью врожденной устойчивости, общей как к неинфекционным, так и к инфекционным заболеваниям.

Лизоцим — это фермент, обладающий свойством лизировать живые и убитые микроорганизмы. Это связано с разрушением клеточных стенок большинства бактерий и их растворением (лизисом). Другие виды бактерий погибают, не подвергаясь разрушению. Биологическое значение лизоцима заключается в том, что он ограждает слизистые оболочки от внедрения микроорганизмов из внешней среды, ускоряет процессы заживления ран. Лизоцим содержится в сыворотке крови, слезной жидкости, слюне, секрете слизистых оболочек носа, желудочном и дуоденальном содержимом, молоке, экстрактах из различных тканей и органов. Зализывание животными ран вызывает поступление лизоцима в рану из слюны. Это приводит не только

к гибели и лизису гноеродной микрофлоры, но и способствует заживлению ран.

Бактериолизины — это вещества, содержащиеся в сыворотке крови и обладающие литическим действием на многие виды грамположительных бактерий.

Интерферон представляет собой весьма эффективное средство ограничения вирусной инфекции. Он быстро появляется в клетках животного организма после проникновения в них вируса. Его количество при поражении клеток вирусом увеличивается очень быстро, и животные могут выздоравливать только за счет этого. Причем животное или ткань, инфицированные одним вирусом, становятся устойчивыми к заражению другим вирусом.

В сыворотке крови обнаруживается компонент основного вещества соединительной ткани — *гиалуроновая кислота*, которая обладает способностью задерживать проникновение в ткани посторонних веществ, в том числе микроорганизмов.

Бактерицидными свойствами обладают моча, молоко, простатическая жидкость, экстракты из печени, мозга, селезенки и других органов. Существенная роль в устойчивости принадлежит кислотности тканевых секретов. Бактерии весьма чувствительны к понижению рН среды. Для каждого вида микроорганизмов существуют особые пределы рН среды как в сторону кислотности, так и щелочности.

Фагоцитарная реакция клеточных элементов. Микроорганизмы, попавшие в ткани животного организма, подвергаются действию клеток, называемых фагоцитами. Реакция организма на внедрение микробов и чужеродных клеток выражается поглощением, перевариванием и, таким образом, уничтожением их фагоцитами. Внутриклеточное переваривание микроорганизмов в процессе фагоцитоза осуществляется ферментами, выделяемыми непосредственно фагоцитами. В некоторых случаях, несмотря на поглощение микроба, полного уничтожения его в клетке не происходит или оно сильно запаздывает (незавершенный фагоцитоз). Причем, находясь в цитоплазме фагоцитов, микробы не только остаются живыми, но и не теряют способность к размножению. Некоторые микроорганизмы обладают способностью образовывать капсулу, которая препят-

ствует фагоцитозу клетками РЭС. Однако под действием содержащихся в сыворотке крови веществ (пропердиноподобных, нормальных антител) поверхность микроорганизмов становится доступной для фагоцитоза.

Фагоцитарной способностью обладают лейкоциты крови и лимфы, Купферовы клетки печени, ретикулярные клетки селезенки, костного мозга, лимфатических узлов, эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов, гистиоциты рыхлой соединительной ткани. Внутри фагоцитов содержатся клеточные органеллы — *лизосомы*, защитное действие которых заключается в том, что фагоцитированный белок или клетка расщепляются на отдельные частицы, ее составляющие. Макрофаги окружают инородные вещества и микроорганизмы, а лизосомы в каждой клетке перемещаются к той стороне макрофага, которая начинает фагоцитировать. Лизосомы — это скопление ферментов, находящихся внутри клетки и упакованных в специальную липопротеидную мембрану. Лизосомы были найдены у представителей всех клеточных форм жизни. У животных наибольшее их количество содержится в лейкоцитах крови и клетках лимфоидной ткани. При физиологическом старении клеток или патологическом их изменении лизосомальные ферменты выходят наружу и участвуют в аутолизе клеток.

Фагоцитоз филогенетически является наиболее древним защитным процессом, осуществляемым специализированными клетками иммунной системы (Мечников И. И., 1883, 1892). Именно И. И. Мечниковым впервые в сравнительных морфофизиологических исследованиях была доказана ключевая роль этого механизма иммунной защиты в формировании резистентности животных к инфекции. К профессиональным фагоцитам у позвоночных животных в первую очередь относятся *нейтрофилы* (полиморфноядерные лейкоциты, макрофаги) и *моноциты/макрофаги* (монойдерные, моноклеарные фагоциты). Эти клетки морфофизиологически и биохимически приспособлены к осуществлению поглощения и инактивации микробных тел и частиц, превышающих размеры диаметром 0,5 мкм (размер наименьших бактерий). Отличие фагоцитоза от других форм эндодитарных реакций клеток предполагает обязательное участие в этом процессе актинового цитоскелета, который в форме

микрофиламентов пронизывает псевдоподии, осуществляющие захват микроорганизмов и частиц. Фагоцитоз требует для своего протекания определенных температурных условий (13–18°C) и не происходит при более низких температурах у позвоночных животных. Наряду с нейтрофилами и моноцитами/макрофагами в фагоцитозе принимают участие незрелые дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, эпителиальные клетки, тромбоциты и даже некоторые лимфоциты.

Контакт фагоцита с микроорганизмом инициирует клеточные реакции, связанные с цитоплазматической мембраной, цитоскелетом, активацией механизмов убивания (киллинга) патогенов, продукцией цитокинов, хемокинов и молекул, играющих ключевую роль в представлении антигенов. Основные стадии фагоцитоза: хемотаксис, контакт фагоцита с микробом, поглощение (интернализация) микроорганизмов (фагоцитоз в узком смысле слова), инактивация (киллинг) и последующее переваривание патогенов в вакуолярном аппарате фагоцитов (завершение фагоцитоза). Наряду с этими функциональными проявлениями фагоцитоз, как правило, сопровождается секреторными реакциями фагоцитов, особенно моноцитов/макрофагов и дендритных клеток, в ходе которых выделяются разнообразные физиологически активные вещества, обеспечивающие протективный характер течения и завершения всего процесса в целом.

В распознавании, контакте и поглощении микробов фагоцитами участвуют разнообразные рецепторы. С помощью современных молекулярно-генетических методов установлено, что при фагоцитозе частиц латекса макрофагами мыши в фагоцитах наблюдаются изменения в экспрессии более 200 генов, а при фагоцитозе *Mycobacterium tuberculosis* — около 600. Все это свидетельствует о сложном и комплексном характере структурно-функциональных изменений в макрофагах, сопряженных с фагоцитарным процессом. Понимание их молекулярной основы обеспечит в перспективе создание фармакологических средств, направленно регулирующих процесс фагоцитоза. Многообразие рецепторов обеспечивает эффективность распознавания патогенов и является необходимым условием для последующей прицельной инактивации инфекционных агентов. В од-

ной из современных концепций врожденного иммунитета совокупность этих рецепторов принято обозначать как систему рецепторов (молекул), распознающих патогенассоциированные молекулярные паттерны.

Целая группа локализованных на поверхности клеток рецепторов обеспечивает протекание фагоцитарного процесса. Часть из них (например, рецепторы формилметиониловых пептидов и С5а) ответственны за хемотаксическую фазу фагоцитарного процесса.

ХЕМОТАКСИС И СОПРЯЖЕННЫЕ С НИМ КЛЕТОЧНЫЕ РЕАКЦИИ

Стадия хемотаксиса обеспечивается последовательной деятельностью ряда лиганд-рецепторных взаимодействий, как на уровне фагоцита, так и фагоцита эндотелиальной клетками. Благодаря этим взаимодействиям фагоциты (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, незрелые дендритные клетки, базофилы, тучные клетки и эозинофилы) мигрируют в места пролиферации микроорганизмов в направлении возрастающей концентрации хемоаттрактантов и входят в непосредственный множественный рецепторопосредованный контакт с ними. При этом наблюдается одновременная активация нескольких сигнальных путей трансдукции, обеспечивающих мобилизацию фагоцитов на поглощение и инактивацию патогенов, а также выработку ряда соединений, которые секретируются в околкеклеточное пространство и осуществляют межклеточные кооперативные взаимодействия, направленные на формирование протективного (адекватного) иммунного ответа организма.

Фагоциты мигрируют из циркуляции с целью аккумуляции в очагах воспаления в ответ на некоторые медиаторы и компоненты микробных клеток. В очагах воспаления лейкоциты активируются, они становятся способными к фагоцитозу, продукции активных форм кислорода (O_2 , H_2O_2) и азота (NO) и секреции ряда физиологически активных веществ. Выходу лейкоцитов в очаги воспаления предшествует их связывание с эндотелием посткапиллярных венул. Далее они мигрируют в ткани, проходя через просветы в эндотелии. Разнообразные

медиаторы вызывают направленный в места воспаления выход нейтрофилов, моноцитов и других клеток крови. Хемотаксические факторы связываются с поверхностными рецепторами лейкоцитов и стимулируют их функциональную активность, обеспечивающую диапедез.

Как правило, после лигирования хемоаттрактантов рецепторами активируются связанные с ними ГТФ-белки (G-белки). Эти белки чувствительны к коклюшному токсину, их функциональная активность подавляется этим соединением. Субъединицы гетеротримерных G-белков иницируют множественные сигнальные каскады, из которых $\beta\gamma$ -зависимый изучен наиболее обстоятельно. Менее чем за 5 с после взаимодействия лиганда с рецептором происходит $\beta\gamma$ -зависимый гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата с высвобождением инозитолтрифосфата, который обеспечивает дальнейшие изменения в клетке (выход кальция из внутриклеточных депо в цитоплазму, активация низкомолекулярных G-белков, фосфолипаз и многочисленных протеиназ).

Наиболее распространенными природными хемоаттрактантами являются бактериальные продукты (формилметиониловые пептиды, липополисахариды), производные комплемента (C5a, C4a, C3a), секретлируемые продукты метаболизма фосфолипидов (PAF, LTB₄), а также хемокины ИЛ8 и MCP1. Для большинства рассматриваемых соединений идентифицированы их рецепторы. В зависимости от дозы хемоаттрактанта лейкоциты реагируют на взаимодействие с ним либо в форме направленной двигательной активности, либо в форме экзоцитоза и инициации дыхательного взрыва. *Формилметиониловые пептиды* как хемоаттрактанты для лейкоцитов были идентифицированы в 1975 г. Формилированный метионин является типичной аминокислотой при белковом синтезе у бактерий и в митохондриях. Поэтому такие пептиды привлекают лейкоциты, преимущественно нейтрофилы, в места проникновения микробов и клеточной деструкции (некроза). Наличие остатков аминокислот с гидрофобными боковыми группами в N-концевой части пептидов важно в связывании с рецепторами лейкоцитов. Формилметиониллейцилфенилаланин как типичный представитель формилметиониловых пептидов взаимодей-

стнует со своим рецептором с K_d около 20 нМ. Рецепторы формилметиониловых пептидов сопряжены с гетеротримерными G-белками, что вообще характерно, по-видимому, для большинства рецепторов хемоаттрактантов.

C5a был одним из первых открытых хемоаттрактантов эндогенного происхождения. Это основной с 3 дисульфидными связями пептид, гликозилированный по аспарагину в 64-й позиции. Делеция пяти С-концевых аминокислот приводит к потере хемотаксической активности пептида при сохранении его способности связываться с рецептором. PAF и LTB₄ являются продуктами метаболизма, возникновение которых инициируется фосфолипазой A₂ (PLA₂).

Хемокины — белки с молекулярной массой в пределах 8–10 кДа классифицируются на группы в зависимости от расположения первых двух цистеинов, образующих дисульфидную связь. Это белки, доминирующей вторичной структурой которых является β-слой, образованный 3 антипараллельными тяжами. Часто хемокины в жидких средах организма образуют димеры, что свойственно также эндогенным антибиотическим пептидам человека — дефенсинам. Поэтому не случайно, что некоторые хемокины обладают, подобно дефенсинам, антимикробной активностью. N-концевая внеклеточная область рецепторов *C5a* и хемокинов обогащена отрицательно заряженными аминокислотными остатками, что, по-видимому, имеет значение связывания преимущественно катионных лигандов.

Как правило, *рецепторы хемоаттрактантов* образуют отдельную группу большого семейства белков, имеющих 7 трансмембранных доменов и сопряженных с G-белками цитоплазматической мембраны клеток. В пользу этого говорят экспериментальные данные о снижении активности рецепторов и сопряженных с ними путей сигнальной трансдукции, установленные при обработке клеток коклюшным токсином. Хемоаттрактанты инициируют обширные структурные перестройки мембран лейкоцитов через включение фосфоинозиотида специфической фосфолипазы C, фосфоинозитидкиназы, фосфолипазы D и A₂. Последствием этих изменений является увеличение внутриклеточного Ca²⁺, перенос и активация протеинкиназы C и других сигнальных молекул. Таким образом, интенсификация

фосфолипидного метаболизма является ключевым звеном клеточного ответа на хемоаттрактанты.

Немедленным следствием активации *фосфолипазы С*, что приводит к продукции инозитолтрифосфата, является транзиторное (преходящее) повышение уровня внутриклеточного Са (от 100 нМ/Л до более чем 1 мМ/Л). Под действием инозитолтрифосфата Са²⁺ освобождается из внутриклеточных депо — кальциосом. Увеличение концентрации внутриклеточного Са²⁺ является существенным в поддержании секреторных реакций и активации дыхательного (респираторного) взрыва фагоцитов. В регуляцию ранних реакций фагоцитов на хемоаттрактанты (хемотаксис, дыхательный взрыв, секреция гранул, метаболизм фосфолипидов) вовлечены и низкомолекулярные G-белки. В частности, Rac-1 белок участвует в активации дыхательной НАДФН-оксидазной цепи.

Способность хемоаттрактантов индуцировать секрецию или респираторный взрыв в лейкоцитах может быть потенцирована предварительной экспозицией клеток с некоторыми веществами (примирование клеток). Такими примирующими лейкоциты соединениями являются полисахариды и низкие дозы собственно хемоаттрактантов. Цитокины увеличивают число рецепторов хемоаттрактантов на поверхности фагоцитов. Немаловажное значение в регуляции функциональной активности фагоцитов имеет процесс терминации (подавления) сигнализации, инициируемой хемоаттрактантами. Десенситизация рецепторов хемоаттрактантов осуществляется различными механизмами. Один из них связан с фосфорилированием остатков серина и треонина в цитоплазматической части рецептора, другой — с фосфолипазой С.

РОЛЬ РЕЦЕПТОРОВ ФАГОЦИТОВ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА ПОГЛОТИТЕЛЬНУЮ СТАДИЮ ФАГОЦИТОЗА

Направленное движение фагоцитов в места проникновения микроорганизмов является необходимым условием реализации последующих стадий фагоцитоза, в которых участвуют различные клеточные рецепторы. Из последних некоторые распознаны

ют нативные компоненты поверхности микробных клеток (например, липотейхоевые кислоты, терминально расположенные остатки маннозы или фукозы, липополисахариды, β -гликаны). Эти рецепторы обеспечивают протекание фагоцитоза, не опосредованного опсонинами, — «неопсонический фагоцитоз». Эта форма фагоцитоза особенно распространена у беспозвоночных и составляет важный механизм формирования у них врожденного иммунитета. Доминирующим типом фагоцитоза у позвоночных является опосредованный опсонинами фагоцитоз. *Опсонины* представляют собой гуморальные белковые факторы, взаимодействующие с поверхностью микробов и/или клетками макроорганизма и облегчающие процесс поглощения (интернализации) патогенов. Опсонизация клеток сводится к снижению гидрофильности и/или отрицательного заряда поверхности взаимодействующих при фагоцитозе клеток.

Обычно опсонины являются белками жидких сред и секретов организма, а некоторые из них могут выделяться внеклеточно фагоцитами в ходе фагоцитарного процесса. Однако в ряде случаев граница между опсонинопосредованным и независимым от опсонин фагоцитозе может быть размыта. Это, в частности, наблюдается при CR3-зависимом фагоцитозе, когда рецептор детектирует как C3b-опсонизированные микробы, так и липополисахариды грамотрицательных бактерий, β -гликаны дрожжей и тяжи гемагглютинаина.

Микробные тела и объекты, опсонизированные иммуноглобулинами класса G, распознаются группой рецепторов, локализованных на поверхности фагоцитов, которые связывают Fc γ -области молекул антител. Они являются низкоаффинными рецепторами, связывающими только мультимеры IgG. Макрофаги и нейтрофилы экспрессируют различающиеся наборы рецепторов этого типа, которые разделяют на две основные группы: *активирующие* и *ингибирующие*.

Представители первых осуществляют рекрутирование внутриклеточных тирозин-киназ SyK-семейства и запуск каскадов фосфорилирования. В результате дополнительного фосфорилирования инициируется зависящая от него сборка актина в филламенты, обеспечивающие подвижность фагоцитарных клеток при интернализации микроорганизмов. Так же активируются

фосфатидилинозитол-3-киназы, участвующие в везикулярном транспорте, который обеспечивает поверхность клеток дополнительным мембранным материалом для формирования псевдоподий. Связывание лигандов с Fc γ R ведет также к активации фосфолипаз A2 (PLA2), которые кооперируются с PI3-киназами в поддержании необходимых для осуществления движения клеток мембранных структур. Адгезия и формирование псевдоподий макрофагами сопряжены с PLA2. Активация сфингомиелиназ при фагоцитозе рассматривается в качестве негативного (подавляющего) звена регуляции фагоцитоза.

Ингибирующие рецепторы мобилизуют фосфатазы, отменяющие пути сигнальной трансдукции, связанные с протеинкиназами. Соотношение активирующих и ингибирующих рецепторов на поверхности фагоцитов определяет характер реагирования клеток на IgG-опсонизированные частицы при фагоцитозе и воспалении.

Рецепторы комплемента активно участвуют в фагоцитарном процессе. CR1 экспрессирован на нейтрофилах, моноцитах, эозинофилах, дендритных клетках, В-лимфоцитах и эритроцитах. Рецепторы CR3 и CR4 по своей природе являются $\alpha\beta$ 2- и $\alpha\beta$ 2 интегринами соответственно. Лигандами CR1 являются C1q-, C4b-, C3b-опсонизированные тела, а также маннозсвязывающий лектин (МСЛ) на поверхности частиц. Лигандами CR3 и CR4 являются iC3b-опсонизированные объекты. Связывание лигандов с CR1, CR3, CR4, как правило, недостаточно для осуществления процесса поглощения объектов. Фагоцитоз в этих случаях протекает благодаря кооперации рецепторов комплемента с рецепторами иммуноглобулинов.

Распространен среди позвоночных и *интегринопосредованный фагоцитоз*. Интегрины β 1 ответственны за связывание и поглощение микроорганизмов в культуре эпителиальных клеток. Плотность рецепторов и аффинитет к ним лигандов определяют эффективность фагоцитоза. К β 2-интегринам принадлежит CR3, экспрессируемый исключительно на гемопоэтических клетках. Эти интегрины важны в адгезии, диapedезе и фагоцитозе лейкоцитов. Особенность функционирования CR3-рецепторов заключается в том, что они в ходе фагоцитоза настраиваются сначала на связывание C3ib-опсонизированных

частиц и тел, а в последующем на их поглощение. Интересно, что в нейтрофилах пул CR3-рецепторов локализован в специфических гранулах, причем часть из них находится уже в форме кластеров, облегчающих при экспозиции на поверхности клеток процесс фагоцитоза.

СР первоначально были описаны как структуры, ответственные за связывание и интернализацию модифицированных липопротеинов низкой плотности (ацетилированных липопротеинов). В дальнейшем установлена их способность связывать полирибонуклеотиды, липополисахариды и частицы кремния. Два представителя группы СР вовлечены в связывание и интернализацию микроорганизмов. Это рецепторы SI-A и MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) рецепторы. SR-A ответственен за связывание микробных клеток, липотейхоевых кислот и липополисахаридов макрофагами. Лиганды MARCO окончательно не выяснены. СР участвуют в связывании микробов, но не в их поглощении. Наличие других рецепторов обеспечивает формирование сигналов, ответственных за интернализацию микроорганизмов.

В ходе фагоцитоза наблюдается кооперация между рецепторами различного типа. Например, фагоцитоз макрофагами опосредован одновременно рецепторами комплемента и маннозы, а также СР. FcγR-рецепторы на нейтрофилах человека активируются дополнительно хемотаксическим пептидом формилметионилейцилфенилаланином. Описана RGD-зависимая активация FcγR и CR1, реализуемая через β3-интегрин. Сурфактантный белок А (SPA), основной белок сурфактанта легких, усиливает EсγК- и СК1-зависимый фагоцитоз. SPA относится к коллектинам, включающим также маннозосвязывающий лектин и конглютинин.

Фагоцитоз сопровождается формированием *псевдоподий* (ложноножек), которые участвуют в обхвате объекта фагоцитоза и формировании по механизму «молнии-застежки» вакуоли — фagosомы. Одновременно наблюдается образование актиновых филаментов, формирующих цитоскелет клетки, который способствует захвату и интернализации микроорганизмов. Ингибитор полимеризации актина цитохалазин D в концентрации 1–2 мкМ подавляет поглощение частиц и микробных тел при фагоцитозе.

Ключевым этапом процесса фагоцитоза является последующее слияние фагосом с лизосомами и эндосомами. В результате слияния антибиотические факторы различной природы и механизмов действия (кислородзависимые и независимые в своем действии от кислорода) приходят в контакт с микроорганизмами и инактивируют их. Завершается процесс фагоцитоза перевариванием микробов в фаголизосомах под воздействием большого арсенала кислых и нейтрально-щелочных гидролаз. На этой стадии фагоцитоза микрофиламенты уже не играют важной функциональной роли, поскольку слияние лизомоподобных гранул с фагосомой зависит от микротубулярного аппарата клеток.

Таким образом, фаза поглощения (эндоцитоза, интернализации) объекта обеспечивается согласованной активацией нескольких путей сигнальной трансдукции, приводящих к формированию актиновых микрофиламентов, псевдоподий, охватывающих частицы, и последующему поглощению последних. Десятки сигнальных молекул, включая белки, связывающие актин и регулирующие движения мембран, активность ионных каналов, киназ и липаз, вовлечены в процесс фагоцитоза на стадии поглощения микробных агентов. Среди них фосфоинозитид-3-киназа, фосфолипаза C, Rho ГТФазы и протеникиназа C играют интегрирующую роль в регуляции фагоцитоза на стадии поглощения.

Эндоцитоз микробов фагоцитами обычно сопровождается продукцией провоспалительных молекул и активацией внутриклеточных механизмов антимикробной защиты. Причем в случае иммуноглобулинопосредованного фагоцитоза эти функциональные проявления реализуются одновременно с интернализацией объекта. В процессе активации фагоцитов по современным представлениям участвуют и Толл-подобные рецепторы, которые, однако, не играют непосредственной роли в поглощительном процессе.

Наряду с активацией *дыхательного взрыва* в фагоцитах при поглощении частиц и макрофагов осуществляются реакции, приводящие к продукции *хемокинов* и *цитокинов*. В последние годы изучен путь продукции цитокинов, инициированный Толл-подобными рецепторами (ТПР). Некоторые ТПР в ходе фагоцитоза микроорганизмов попадают в фагосому, где они

участвуют в детекции природы инфекционных агентов. По-видимому, ТПР кооперируют с IgG-рецепторами и CR3 при фагоцитозе микроорганизмов макрофагами. Продукция ФНО α и ИЛ1 β является одним из результатов активации моноцитов/макрофагов, опосредованной ТПР.

В процессе эволюции микроорганизмы выработали ряд механизмов патогенности, позволяющих им избегать фагоцитирования моноцитами/макрофагами и нейтрофилами. Так, энтеропатогенная *E. coli* подавляет поглощение фагоцитами путем ингибирования PI3-киназы, а *Yersinia* подавляет полимеризацию актина в клетках. Сальмонеллы нейтрализуют микробные факторы внутри фаголизосом. Иерсинии, используя систему секреции III типа, инъецируют в макрофаги различные молекулы, подавляющие, в частности, ГТФазы Rho-семейства и нарушающие актиновый цитоскелет клеток. SP12-система сальмонелл позволяет им избегать при вакуолярной локализации воздействий со стороны НАДФН-оксидной системы. *Mycobacterium tuberculosis* подавляет процесс закисления в фагосоме. Микобактерии способны блокировать слияние фагосом с лизосомами. Той же способностью характеризуются *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *T. gondii*. Палочка Коха осуществляет рассматриваемую блокаду с помощью сульфатидов своей клеточной стенки. Другие микроорганизмы блокируют закисление фаголизосом. *Listeria monocytogenes*, многие виды риккетсий, *Trypanosoma cruzi* и *Shigella spp* разрушают фагосомы и выходят в цитоплазму, где для них существуют приемлемые условия для внутриклеточного паразитирования.

КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭЛИМИНАЦИИ ПАТОГЕНОВ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ И ВОСПАЛЕНИИ

Активация нейтрофилов и моноцитов/макрофагов при контакте с объектами фагоцитоза и некоторыми хемокинами приводит к мобилизации внутриклеточных микробцидных систем, среди которых различают кислородзависимые и кислороднезависимые. Наиболее изученными из первых являются НАДФН-оксидазная и пероксидазная системы.

НАДФН-оксидазная система. Эффективность фагоцитарных реакций, осуществляемых нейтрофилами и моноцитами/макрофагами, является результирующей многих взаимодействующих морфобиохимических элементов клеток. Одним из стереотипных проявлений функциональной готовности этих клеток к фагоцитозу является состояние их обмена веществ, получившее в литературе название «дыхательного взрыва». Термин отражает быстротечность и интенсивность мобилизации энергетических и пластических ресурсов нейтрофилами в ответ на воздействия на их цитоплазматическую мембрану разнообразных по химической природе соединений: хемоаттрактантов (С5а-компонент комплемента, формилметиониловые пептиды и белки бактерий, лейкотриен В4), опсоинов (С3b-компонент комплемента, иммуноглобулины классов IgG1, IgG2, IgM и маркированных ими микроорганизмов, поверхностно активных веществ (форболовые эфиры, дигитонин). Дыхательный взрыв характеризуется резким усилением сопряженных биохимических превращений, связанных с вовлечением кислорода и его химически реактивных производных в разнообразные защитные и повреждающие реакции организма. Наблюдаются увеличение поглощения кислорода фагоцитами в 2–20 раз по сравнению с исходным уровнем покоящейся клетки, генерация заметных количеств супероксидного радикала (O_2^-) и перекиси водорода, интенсификация фосфоглюконатного (пентозофосфатного) пути окисления глюкозы и фиксации неорганического йода в биополимерсвязанную форму.

Отличительной особенностью дыхательного (респираторного) взрыва как процесса утилизации кислорода является его нечувствительность к ингибиторам цепи переноса электронов в митохондриях (цианид, антимицин А, азид натрия) и окислительного фосфорилирования (динитрофенол), но подавление амобарбиталом-ингибитором флавопротеидов. В соответствии с этими данными было сформулировано представление о флавиновой природе кофермента энзима (НАДФН-оксидазы), ответственного за восстановление кислорода при активации фагоцитов. В настоящее время установлено, что большая часть поглощаемого нейтрофилами кислорода восстанавливается до

супероксидного радикала оксидазной системой, основу которой составляет гетеродимерный цитохром b_{558} с низким окислительно-восстановительным потенциалом ($E = 245$ мВ), включающий в себя субъединицы двух типов: α с молекулярной массой 22 кДа (p22phox) и β с молекулярной массой 91 кДа. Цитохром b_{558} (b_{245}) является НАДФН-связывающим флавопротеидом. Это первый флавоцитохром, описанный у высших эукариотов, который одновременно связывает гем и ФАД в соотношении 2:1. Следует подчеркнуть, что в покоящихся нейтрофилах 90% цитохрома b_{558} локализовано в мембранах их специфических гранул и везикул. Под воздействием веществ, стимулирующих активацию нейтрофилов, происходит слияние мембран специфических гранул с цитоплазматической мембраной и, как следствие, перенос электрон-транспортного белка на поверхность клетки со сборкой функционально полноценной НАДФН-оксидазной системы.

Установлено, что наряду с цитохромом В в формировании функционально полноценной НАДФН-оксидазной системы участвуют также как минимум четыре цитоплазматических белка: это фосфопротеин с молекулярной массой 47 кДа (p47phox, аббревиатура *phox* означает *for phagocyte oxidase*), белок p47phox (67 кДа), белок p40phox (40 кДа) и низкомолекулярный белок РАК 1 (кДа), связывающий гуаниновые нуклеотиды. Стимулы, активирующие фосфорилирование белка p47phox, индуцируют перенос цитозольного комплекса из трех белков p67phox, p40phox, p47phox в область цитоплазматической мембраны. За фосфорилирование p47phox ответственно несколько киназ (РКС, РКА, p21-активируемая киназа РАК, Р13-киназы). РАК 1, активируемый ГДФ-ГТФ-обменным фактором, также транслоцируется к мембранному комплексу. Сборка комплекса НАДФН-оксидазы сопряжена с функционированием актинового цитоскелета, нарушение целостности которого блокирует процесс активации оксидазной системы и продукцию супероксидного аниона. До настоящего времени не ясно, являются ли эти белки интегральными компонентами цепи переноса электронов к кислороду или только модулируют ее активность.

Следует отметить, что сборка рассматриваемой системы может осуществляться под действием сигналов, возникающих при поглощении как опсонизированных частиц, так и растворимых

факторов (формилметиониловые пептиды, форболмиристат-ацетат). Значимость отдельных рецепторов в инициации сборки НАДФН-оксидазной системы и дыхательного взрыва различна. Наиболее очевидна в этом процессе роль I8P у макрофагов и нейтрофилов, далее по значимости идут маннозный рецептор в кооперации с 3-гликановым рецептором и, наконец, CR3-рецептор.

В начале фагоцитарного процесса супероксид, образуемый НАДФН-оксидазной системой, выбрасывается во внеклеточное пространство, но по мере дальнейшей инвагинации плазмалеммы и последующего образования фагосомы накопление этого цитотоксического метаболита происходит внутри клетки, где и реализуется его антимикробный потенциал.

В процессе ферментативной или спонтанной дисмутации супероксидного радикала образуется перекись водорода, которая является неотъемлемым компонентом микробоцидной миелопероксидазной системы. В присутствии ионов Fe супероксид и перекись водорода вступают в реакцию, порождая один из самых сильных биогенных окислителей — гидроксильный радикал. В дополнение к этим соединениям в реакциях неэнзиматической дисмутации супероксида и, частично, Хабер-Вайса может образоваться энергизированная форма кислорода — синглетный кислород (1O_2), который активно взаимодействует с молекулами, содержащими участки повышенной электронной плотности (полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран, основания нуклеиновых кислот, ароматические аминокислоты в белках). Совокупное действие синглетного кислорода и гидроксильного радикала инициирует перекисное окисление липидов мембран, окисление сульфгидрильных групп биомолекул, разрушение пептидных связей в белках и оснований в нуклеиновых кислотах фагоцитированных микроорганизмов. Благодаря осуществлению этих реакций может иметь место нарушение структурной целостности микробных клеток и разрушение их основных биомолекул (ДНК, РНК, белков, полисахаридов, липидов), что в значительной степени определяет эффективность киллерной функции нейтрофилов. Действительно, в экспериментально созданных анаэробных условиях наблюдается снижение микробоцидной активности нейтрофилов.

Природной моделью, подтверждающей значимость дыхательного взрыва в функционировании фагоцитов, является редкое наследственное заболевание — хроническая грануломатозная болезнь. Носители этого заболевания страдают от хронических аутогенных нагноительных процессов, вызванных стафилококками, сальмонеллами, грибами рода кандиды и многими другими микроорганизмами. Нейтрофилы, эозинофилы и моноциты/макрофаги больных хронической грануломатозной болезнью (ХГБ) утрачивают способность к умерщвлению многих видов микроорганизмов вследствие неспособности фагоцитов отвечать полноценным дыхательным взрывом (продукция O_2 , H_2O_2) на активирующие воздействия. Это обусловлено генетически детерминированными нарушениями в функционировании НАДФН-оксидазной системы. Как установлено в настоящее время, встречаются четыре основные формы ХГБ. У большинства пациентов (60%) имеет место отсутствие или структурный дефект большой β -субъединицы цитохрома b_{558} , у части (5%) малой α -субъединицы. Около 30% больных ХГБ имеют клеточный дефицит или функциональную неполноценность белка p47phox и, наконец, у 5% патология обусловлена отсутствием p67phox.

Завершая рассмотрение биологического значения респираторного взрыва в фагоцитах, необходимо отметить, что в ходе длительной сопряженной эволюции системы хозяин-паразит микроорганизмы выработали многочисленные механизмы нейтрализации химически реактивных производных кислорода (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза). Поэтому реальный вклад токсических производных кислорода в инактивацию микробов при фагоцитозе и воспалении зависит от ряда дополнительных условий, среди которых решающими следует считать нарушение структурной целостности оболочек бактерий, грибов и некоторых оболочечных вирусов, а также блокаду в них ключевых метаболических процессов. По современным представлениям, ответственными за эти воздействия на микроорганизмы являются лизосомные (гранулярные) белки и полипептиды фагоцитов, общим физико-химическим свойством которых является катионный (основный, щелочной) характер их молекул.

ПЕРОКСИДАЗНЫЕ СИСТЕМЫ И НАКТИВАЦИИ МИКРОБОВ

Одним из ведущих гранулярных компонентов антимикробной системы фагоцитов, тесно связанным в своем функционировании с метаболитами респираторного взрыва, является пероксидаза. В нейтрофилах и моноцитах/макрофагах локализована *миелопероксидаза*, в эозинофилах — *эозинофильная пероксидаза*. Содержание фермента в нейтрофилах человека колеблется от 1 до 5% сухого веса клеток и составляет 2–4 мг на 10^9 лейкоцитов.

Миелопероксидаза является маркерным белком азурофильных гранул нейтрофилов. Она входит в качестве фермента в состав микробоцидной миелопероксидазной системы, которая включает в себя также окислитель (перекись водорода — H_2O_2 и кофакторы (I^- , Cl^- , Br^- , SCN^-). В настоящее время получены и охарактеризованы по физико-химическим свойствам миелопероксидазы человека и ряда видов животных. Ферменты из разных источников характеризуются заметным сходством биохимических параметров. Миелопероксидазы (МПО) относятся к окислительно-восстановительным ферментам (КФ 1.11.1.7), окисляющим перекисью водорода (H_2O_2) и некоторыми гидроперекисями ($R-O-O-H$), различные по химической природе соединения (органические кислоты, ароматические амины, фенолы, анионы галоидов и др.).

Гены МПО человека были клонированы в ряде лабораторий. Исходный продукт трансляции белка представляет собой молекулу с массой около 84 кДа. Последующий процессинг и присоединение углеводной цепочки, состоящей из маннозы, формируют молекулу проМПО с молекулярной массой 89 кДа. Далее происходит отщепление 125 аминокислотных остатков и расщепление оставшейся молекулы на большую α -субъединицу (57 кДа, 467 аминокислот) и малую — β -субъединицу (12 кДа, 112 аминокислот). Молекула конечной зрелой МПО состоит из двух протомеров, связанных дисульфидной связью, в состав каждого из протомеров входит по одной α - и β -цепи. Ген, представляющий собой железосодержащий хлорин, ковалентно связан с тяжелой гликозилированной α -цепью. Холоферменты МПО из других видовых источников построены по

рассмотренному типу. Все изученные миелопероксидазы являются катионными белками с изоточкой (pI) выше 10. Несмотря на катионный характер своих молекул, миелопероксидазы сами по себе обладают незначительной микробоцидной активностью, существенно возрастающей в присутствии перекиси водорода (H_2O_2) и одного из анионов галоидов (I^- , Cl^- , Br^-). Миелопероксидазная система (МПО-система) подавляет жизнедеятельность бактерий, грибов, микоплазм и вирусов, т. е. является универсальным антимикробным фактором.

В одном из первых выдвинутых и доказанных механизмов бактерицидного действия МПО-системы галогенирование биополимеров (белков, полисахаридов, ненасыщенных жирных кислот) микробной клетки рассматривалось в качестве основного результата ее функционирования. Галогенирование, например, некоторых аминокислот (тирозин, гистидин, триптофан) в составе белков микроорганизмов приводит к нарушению их надпервичных структур и, как следствие, к потере ими функциональной активности. Указанная реакция лежит в основе перевода йода из свободного в органически связанное состояние, что является одним из показателей респираторного взрыва нейтрофилов. Нейтрофилы больных хронической грануломатозной болезнью с дефектом в НАДФН-оксидазной системе характеризуются сниженной способностью связывать йод с биополимерами клетки и фагоцитированных микроорганизмов. Ингибирование пероксидазной активности интактных лейкоцитов азидом или цианидом резко подавляет переход йода в кислотонерастворимую (связанную) форму. Что касается природы соединений, связывающих йод, то ими по всей вероятности являются в первую очередь белки, поскольку обработка общего белка фагоцитирующих нейтрофилов протеиназой (трипсиной) приводит к освобождению в среду йодированных форм тирозина: моно- и диодитирозина.

Часто доводом против рассматриваемого механизма действия миелопероксидазной системы служили данные об относительно низкой концентрации йода в нейтрофилах. По мнению Томаса и Юне, содержание йодида достаточно для осуществления бактерицидной функции миелопероксидазной системы, но при условии, если реакции галогенирования имеют следующую

последовательность. Сначала пероксидаза окисляет перекисью водорода йодид до йода. Таким образом осуществляется опосредованное I-окисление сульфгидрильных групп белков, которое является одной из непосредственных причин снижения жизнеспособности бактерий. При этом йодид в этом процессе не расходуется, хотя и является на его отдельных этапах переносчиком окислительных эквивалентов с перекиси водорода на белки микроорганизмов. В опытах с *E. coli* эта схема получила частичное подтверждение.

При использовании *хлорида* в качестве кофактора МПО-системы последовательность и характер реакций, ведущих к гибели микробов, имеют несколько иную направленность. Согласно одной из предложенных схем, миелопероксидаза окисляет сначала анион хлора до катиона в составе гипохлоритного иона (OCl^-). Образовавшаяся хлорноватистая кислота без участия фермента взаимодействует в кислой среде с аминокислотами (аспарагиновой, аланином, серином, лизином) с образованием соответствующих хлораминов. Показано, что хлорноватистая кислота способна реагировать с пептидными связями в микробных белках, образуя хлорамиды. Хлорамиды, в свою очередь, гидролизуются с разрушением пептидной связи и формированием NCl-пептидов. Последние, как и хлорамины свободных аминокислот, окисляют компоненты микроба, усиливая первоначальные структурные нарушения. Образующиеся в конечном счете альдегиды как раз и являются, по образному выражению А. Сент-Дьердьи (1971), «когтями и клыками» макроорганизма в защите от разнообразных инфекционных агентов, поскольку они активно реагируют с функционально важными группами чужеродных макромолекул (^-NH , $^-\text{NH}_2$, ^-OH), лишая их биологически значимой активности. По предположению группы авторов, гипохлорит может окислять железо-серные центры некоторых электронно-транспортных белков, в частности кофакторов сукцинатдегидрогеназы, что приводит к нарушению функционирования дыхательной цепи бактерий и разобщению окисления с фосфорилированием. Одним из последствий подобного воздействия МПО-системы является падение мембранного потенциала и снижение жизнеспособности микробной клетки.

В литературе рассматривается схема антимикробного действия МПО-системы, связанная с продукцией синглетного кислорода. Синглетный кислород, являясь электрофилом, активно взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов, инициирует их перекисное окисление, нарушающее целостность цитоплазматической мембраны бактерий.

Столь разнообразные механизмы антимикробного действия миелопероксидазной системы отнюдь не исключают друг друга и, скорее всего, являются основой ее многонаправленного действия на структуры и обменные процессы бактерий, грибов и вирусов. Именно это обстоятельство определяет ведущую роль МПО-системы среди других микробоцидных кислородзависимых систем нейтрофилов и моноцитов. Эффективность антимикробного действия миелопероксидазной системы зависит от многих факторов: концентрации перекиси водорода, pH среды, структурной организации микробных клеток. Немаловажную роль в реализации ее микробоцидных свойств играет катионный характер молекулы пероксидазы.

Для доказательства значимости адсорбции миелопероксидазы на поверхности бактериальных клеток в реализации микробоцидной активности всей системы в целом удачный методический прием был использован О. Ю. Янковским с соавторами (Янковский и др., 1979, 1981). Авторы получили специфические антитела к миелопероксидазе, которые не влияли на каталитические реакции, осуществляемые ферментом, но существенно снижали способность последнего к адсорбции на поверхности клеток *E. coli*. Добавление таких антител в тест-систему *in vitro*, состоящую из микробной взвеси и миелопероксидазной системы, заметно подавляло бактерицидное действие фермента. Нормальная сыворотка не обладала ингибирующим влиянием. По заключению исследователей, электростатическое связывание миелопероксидазы с поверхностью бактериальных клеток-мишеней является необходимым условием реализации антимикробного действия МПО-системы, обеспечивающим непосредственный контакт продуктов ферментативного катализа (O_1 , OS_1 , O_2 , альдегиды) с поражаемыми молекулами инактивируемого микроорганизма. Значимость адсорбции фермента на

клетках-мишенях была установлена и *in vivo*. На модели почечного кандидиоза у мышей было изучено лечебное действие миелопероксидазы. Внутривнутрибрюшинное одноразовое введение МПО человека на следующий день после инфицирования заметно повышало выживаемость мышей. К 60-му дню наблюдения в этой группе выживало 80% животных, в то время как в контрольной (введение забуференного физиологического раствора) только 25%. Терапевтическое действие МПО в этом исследовании продемонстрировано однозначно, однако остается неясным его механизм. Нейтрализующее терапевтическое действие миелопероксидазной системы одновременное с МПО введение компонентов клеточной стенки гриба (маннанов) свидетельствует в пользу значимости адсорбции фермента на микробной клетке как необходимого условия реализации его кандидацидного действия.

Во многих отношениях сходное действие на микроорганизмы оказывает *эозинофильная пероксидаза* (ЭПО). В отличие от миелопероксидазы ЭПО является более основным белком, состоящим из большой (50 кДа) и малой (10–15 кДа) субъединиц. Молекулярные массы известных ЭПО находятся в пределах 5–80 кДа. Клонирование гена ЭПО человека и его сиквенс позволили определить точную первичную структуру белка, а также сравнить ее со структурой миелопероксидазы. Гомология первичной структуры ЭПО человека и МПО человека составила 68,3%, что дает основание для предположения о происхождении белков от общего гена, структура которого в процессе эволюции дивергировала на гены ЭПО и МПО. Было осуществлено сравнительное биохимическое изучение МПО и ЭПО из лейкоцитов свиньи. Анализ аминокислотного состава сравниваемых пероксидаз выявил значительное сходство ферментов из двух источников. В ЭПО, однако, выше доля основных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин), ниже — дикарбоновых (глутаминовая и аспарагиновая), что находит свое отражение в более щелочном характере их молекул. Выявлена значительная степень структурной гомологии сравниваемых ферментов методом пептидных карт. Из 57 пептидов МПО свиньи и 65 — ЭПО свиньи общими оказались 50. Эти данные позволили также высказать предположение о происхождении генов сравниваемых пероксидаз от одного исходного предкового гена.

Рассмотрение биохимических основ респираторного взрыва и сопряженных с ним механизмов инактивации и разрушения микроорганизмов однозначно говорит в пользу биологической значимости этой стороны функционирования фагоцитов. Однако накопившиеся в настоящее время клинические и экспериментальные данные дают основание для частичной переоценки сложившихся в 1970-е гг. представлений о доминирующей роли кислородзависимых антимикробных систем фагоцитов в осуществлении ими защитных реакций. Так, среди больных ХГБ выявлены пациенты, не страдающие от тяжелых рецидивирующих инфекционных заболеваний, с обычной средней продолжительностью жизни. Это говорит, с одной стороны, о разнообразии клинических форм ХГБ, а с другой — о существовании в нейтрофилах компенсаторных защитных систем, не зависящих в своем антимикробном действии от дыхательного взрыва.

Интерес к исследованию антимикробных свойств белков и пептидов нейтрофилов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидный проницаемостьувеличивающий белок, дефенсины, кателицидины и др.) диктуется необходимостью выяснения их роли в формировании резистентности организма к инфекции. Он поддерживается постоянными клиническими наблюдениями о дефиците или полном выпадении того или иного звена микробоцидного потенциала фагоцитов. По заключению одного из ведущих специалистов в этой области исследований именно дефициты в молекулярных механизмах, обеспечивающих киллинг фагоцитированных микроорганизмов, обуславливают более тяжелый характер развития инфекционной патологии у больных по сравнению с пациентами, у которых нарушены только хемотаксис, адгезия или эндоцитоз нейтрофилов. Известна повышенная чувствительность людей к грибковой инфекции с дефицитом в их нейтрофилах миелопероксидазы. Значительное снижение резистентности организма к бактериальной инфекции наблюдается в случаях с наследственно обусловленным отсутствием или дефицитом специфических гранул нейтрофилов и их основного компонента — лактоферрина. Подобная же морфобиохимическая и функциональная особенность нейтрофилов встречается при острой и хронической

гранулоцитарных лейкомиях и ожоговой болезни у людей. Во всех рассмотренных примерах функциональная неполноценность нейтрофилов обусловлена в значительной степени отсутствием или недостаточностью в них лактоферрина. Это тем более парадоксально, что сам по себе этот белок обладает слабой микробицидной активностью и его действие на микроорганизмы оценивается большинством исследователей как микростатическое. Возможно, что лактоферрин, будучи слабым цитотоксическим агентом, в составе фаголизосом вступает в разнообразные кооперативные взаимодействия с другими антимикробными веществами, в том числе с миелопероксидазой, которые определяют эффективность умерщвления фагоцитированных бактерий и грибов.

Моделирование некоторых сторон такого взаимодействия проводилось в условиях *in vitro*, которые по ряду своих параметров (кислое значение рН-среды, наличие перекиси водорода и йодида) аналогичны содержимому фаголизосом. В этих условиях аполактоферрин свиньи — форма белка, лишенная железа, в которой он, по-видимому, преимущественно находится в нейтрофилах, в концентрации 20 мкг/мл инкубационной пробы не проявляет бактерицидной активности в отношении стафилококка. Повышение концентрации белка до 1 мг/мл практически не сказывается на жизнеспособности бактерий.

Следующий этап работы состоял в выяснении характера воздействия на стафилококки АЛФ и миелопероксидазной системы нейтрофилов свиньи при их совместном испытании. При таком сочетании лейкоцитарных белков воспроизводятся отдельные стороны их кооперативного антимикробного действия в фаголизосомах после слияния с ними содержимого специфических азурофильных гранул. Микробицидное действие МПО-системы изучено хорошо. Его интенсивность в значительной мере зависит от концентрации отдельных ингредиентов системы и в первую очередь от активности фермента. Если подобрать такие соотношения компонентов МПО-системы, при которых ее стафилоцидный эффект был незначителен, то совместное испытание в тест-системе АЛФ и МПО-системы выявило существенный синергический бактерицидный эффект. Наблюдается отмирание количества колониеобразующих микробных единиц на три

порядка больше по сравнению с вариантами раздельного испытания анализируемых белков. Бактерицидное действие зависит от наличия всех веществ, составляющих кооперативную систему, так как исключение любого из них практически полностью снимает синергический эффект.

Как можно объяснить наблюдаемый феномен? По-видимому, аполактоферрин, сорбируясь на клеточной оболочке стафилококков, вступает в молекулярное взаимодействие с белками, в состав которых входят Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} . Среди них есть микробные супероксиддисмутазы и каталаза, которые вследствие потери важных металлов каталитического центра инактивируются. Это приводит к обогащению области поверхностных структур бактерии супероксидом (O_2) и продуктом его спонтанной дисмутации — перекисью водорода (H_2O_2). Постоянная продукция окислителя в этих условиях поддерживает на более высоком уровне активность миелопероксидазной системы, что находит свое отражение в заметной гибели стафилококковых клеток.

Так, в ходе совместного *взаимоусиливающего кооперативного действия МПО-системы и АЛФ* формируется мощная бактерицидная система, существенно превосходящая по своей силе составляющие ее вещества. В пользу обоснованности выдвигаемого механизма синергизма антимикробных белков свидетельствует чувствительность системы к экзогенной каталазе и независимость от супероксиддисмутазы. Повышение ионной силы инкубационной среды до 0,2, как и внесение в нее антител к ЛФ, отменяют синергический эффект, так как препятствуют сорбции АЛФ на поверхности стафилококковых клеток. Неактивна система при добавлении в среду насыщенного железом лактоферрина и аскорбиновой кислоты — ловушки супероксидных анионов.

Есть основания считать, что установленное нами кооперативное антимикробное действие белков является не только лабораторным феноменом, но и отражает объективно существующие закономерности взаимодействия гранулярных факторов при фагоцитозе и воспалении. В свете этих экспериментальных данных становится понятной роль лактоферрина в обеспечении полноценной микробицидной функции нейтрофилов как

компонента, создающего условия для пролонгированного действия МПО-системы. Подобные синергические эффекты при совместном действии на бактерии аполактоферрина и МПО были также показаны в нашей лаборатории и в случае использования хлорида в качестве кофактора миелопероксидазной системы, причем в отношении как грамположительной (*Listeria monocytogenes*), так и грамотрицательной бактерий (*E. coli*).

МПО может проявлять еще ряд функциональных активностей в процессах фагоцитоза и воспаления. На некоторые клетки она действует модифицирующим образом. В частности, инкубация МПО-системы с тромбоцитами приводит к выбросу из них серотонина, что можно рассматривать в качестве провоспалительного эффекта.

Миелопероксидазная система может ослаблять функциональную активность естественных киллеров в культуре клеток. Это воздействие обратимо, поскольку через 24 ч после начала экспозиции с МПО-системой функциональная активность лимфоцитов восстанавливается.

Все три основных типа лимфоцитов (В- и Т-лимфоциты, НК-клетки) подвержены ингибиторному воздействию со стороны миелопероксидазной системы. Наиболее чувствительны к ней антителопродуцирующие В-лимфоциты, а естественные киллеры и Т-лимфоциты — в меньшей степени. МПО как модификатор структуры медиаторов и ферментов может вовлекаться в разнообразные стороны протекания воспалительных процессов. В частности, МПО-система может инактивировать один из ведущих ингибиторов сериновых протеиназ — α -1-ингибитор протеиназ (α -1-антитрипсин), окисляя его метионильные остатки. Непосредственно инактивирующим α -1-ингибитор агентом является гипохлорная кислота — один из основных продуктов МПО-системы. Инактивация α -1-ингибитора протеиназ может приводить к нарушению баланса сериновые протеиназы — ингибиторы в очагах воспаления.

МПО может усилить протеолитический потенциал очагов воспаления путем активации коллагеназы и желатиназы нейтрофилов. Коллагеназа — металлоэнзим, сохраняющийся в латентной форме в гранулах нейтрофилов. После активации

и секреции из клеток она избирательно расщепляет межклеточный коллаген.

Окисляя ϵ -аминогруппы лизиновых остатков эластина и других белков, МПО-система инициирует сшивание белковых молекул, которое может приводить к образованию нерастворимых полимеров, откладывающихся в воспаленной соединительной ткани. Так же, по-видимому, могут формироваться в очагах воспаления и агрегаты иммуноглобулинов IgG.

Наряду с провоспалительными эффектами некоторые функциональные проявления МПО-системы могут рассматриваться как направленные на снижение интенсивности воспалительного процесса. В частности, МПО-система путем окисления инактивирует такие медиаторы воспаления, как лейкотриены В₄ и С₄. Она в состоянии инактивировать также растворимые хемотаксические пептиды — С₅а и формилметиониловые пептиды. Молекулярный механизм инактивации этих пептидов связан с окислением тиозфирной группы метионина, которое приводит к снижению аффинитета хемотаксиков к их мембранным рецепторам. Возможно, благодаря такому процессу происходит снижение потока миграции нейтрофилов в ткани в конце первой фазы острой воспалительной реакции.

Важным фактором регуляции фагоцитарного и воспалительного процессов является, по-видимому, способность МПО-системы инактивировать белковые токсины микроорганизмов. В модельной системе *in vitro* была продемонстрирована ее способность инактивировать дифтерийный и столбнячный токсины, гемолитический токсин из *Streptococcus pneumoniae*, а также токсин цитоплазмы *Clostridium difficile*.

Таким образом, функциональные проявления МПО-системы при фагоцитозе и воспалении могут быть многообразными, а часто и разнонаправленными. И если ее роль как антимикробной системы доказана однозначно, то биологическая значимость ряда других ее активностей требует дополнительных обоснований.

К цитотоксическому действию МПО-системы чувствительны не только микробы, но и клетки макроорганизма. Она лизирует, в частности, эритроциты, сперматозоиды и опухолевые клетки в модельных системах *in vitro*.

Воздействие МПО-системы на опухолевые клетки представляет интерес в связи с поиском эффективных терапевтических средств в онкологии. Одно из первых успешных применений МПО было осуществлено при совместном введении фермента и алкилирующего соединения (тиотепа) крысам с аденокарциномой молочной железы.

ФЕНОЛОКСИДАЗА В ИММУНИТЕТЕ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

Многие беспозвоночные имеют открытую кровеносную (циркуляторную) систему, а потому их выживание возможно при условии наличия развитой системы локального свертывания крови (гемолимфы), сопряженной с постоянно действующими иммунными механизмами распознавания, нейтрализации и элиминации патогенов инфекционной природы. Одним из таких иммунных механизмов является фенолоксидаза (ФО) и инициирующая ее профенолоксидазоактивирующая система. Профенолоксидазоактивирующая система состоит из нескольких белков, среди которых ведущими являются рекогносцировочные белки, сериновые протеиназы, их ингибиторы и профенолоксидаза. Фенолоксидаза (ФО) (монофенил-L-допа: кислород оксидоредуктаза; КФ 1.14.18.1) обнаружена в гемолимфе и целомической жидкости у многих беспозвоночных, но наиболее детально изучена у насекомых и ракообразных. Фермент катализирует окисление фенолов до хинонов, которые в свою очередь неэнзиматическим путем полимеризуются до меланина. Промежуточные продукты окисления фенолов и меланин являются токсичными для микроорганизмов соединениями.

ФО у исследованных видов животных находится в циркуляции (крови, гемолимфе, целомической жидкости) в неактивной форме как профенолоксидаза, которая активизируется ступенчатым образом профенолоксидазоактивирующим ферментом (ПФОАФ). Запуск последнего осуществляется при попадании во внутреннюю среду животного микробных клеток и/или компонентов их стенок (липополисахариды, пептидогликаны, β -1,3-гликаны), которые по принятому в настоящее время определению являются патогенассоциированными

молекулярными паттернами. Активаторами профенолоксидазной системы у насекомых являются именно все три разновидности молекул микробного происхождения. Это свидетельствует о том, что у них существует эволюционно выверенная система распознавания чужеродного (которая может быть отнесена к паттернраспознающим рецепторам — молекулам). Рассматриваемая система представляет собой механизм защиты против инфекции, сочетающий в себе как распознающие патогенные («несвой» молекулы), так и инактивирующие их активности. Известно, что меланин — конечный продукт функционирования ФО-системы — обладает фунгистатической активностью, генерирует факторы, иммобилизующие бактерии и обладающие противовирусным действием. С активацией профенолоксидазной системы связывают и эффективность таких защитных процессов как фагоцитоз, инкапсуляция, образование узелков (nodules), миграция и адгезия клеток крови. По-видимому, не случайно некоторые паразиты, успешно внедряющиеся в тело животных, часто подавляют именно профенолоксидазоактивирующую систему.

ПФО и гемоцианины членистоногих, гексамерины и арил-фориновый рецептор насекомых, Cr-P1 аллерген таракана являются белками одного семейства. Первая ФО вторичноротого животного была клонирована из асцидии. ПФО ракообразных синтезируется в клетках крови, в то время как гемоцианин — в гепатопанкреасе.

ПФО является ферментом, выделенным из крови некоторых членистоногих (раков и насекомых). Она имеет молекулярную массу от 70 до 90 кДа, а ФО от 60 до 70 кДа. ПФО рака имеет изоточку 5.4 и содержит два иона меди. Гены ПФО некоторых членистоногих клонированы, определена первичная структура белка, который имеет два сайта связывания ионов меди. Установлена структурная гомология ПФО речного рака и трех видов насекомых. Фенолоксидаза является гидрофобным белком, неспецифически сорбирующимся на различных поверхностях. Активность ФО приводит к ковалентному сшиванию многих белков, в том числе и молекул самого фермента, когда исследователи обнаруживают его агрегаты. ПФО активируется в результате ограниченного протеолиза молекулы

различными протеазами. В случае ФО рака доказано наличие эндогенного фермента, осуществляющего расщепление ПФО в крови, этот фермент является сериновой протеиназой. ПФО может быть активирована непротеолитическим путем посредством нагревания или инкубации с детергентами. При подобных воздействиях в молекулах ПФО происходят конформационные изменения, способствующие проявлению оксидазной активности фермента. Физиологическая значимость этого варианта активации фермента остается неясной.

ПФО локализована в гранулярных клетках крови рака. В процессе мерокриновой секреции фермент высвобождается в плазму в неактивной форме, и активация всей системы осуществляется уже внеклеточно после взаимодействия с компонентами микробных клеток. У некоторых насекомых наблюдается подобная ситуация с активацией фермента, в то время как у других он циркулирует в плазме в форме предшественника. Профенолоксидазоактивирующий фермент является сериновой протеазой, которая в свою очередь в плазме предсуществует также в проформе, активируемой, в частности, компонентом стенки низших грибов β -1,3-гликаном. Эта последовательность превращений доказана для анализируемой системы у рака. Кутикула насекомых также может быть источником рассматриваемого фермента наряду с энзимом, локализованным в гемолимфе. Есть сведения о том, что и в отсутствие микробных компонентов, но при наличии низких концентраций Ca^{2+} может происходить трансформация ПФО в ФО.

Активность системы также регулируется ингибиторами протеиназ. Из плазмы рака выделен высокомолекулярный ингибитор трипсина. Из тканей ряда животных выделен гомолог α -2-макроглобулина позвоночных, который подавляет активность протеаз, участвующих в активации ПФО. ПФО-активирующий фермент (ПФОАФ) активируется β -1,3-гликанами низших грибов, липополисахаридами грамотрицательных бактерий и пептидогликанами грамположительных бактерий. Распознавание β -1,3-гликанов специфично, поскольку α - или β -1,4-гликаны не инициируют ПФО активирующую систему. Минимально активирующая цепь β -1,3-гликана должна включать пять моносахаров.

Активаторы микробного происхождения инициируют ПФОАФ членистоногих, иглокожих и асцидий. Белки, связывающие β -1,3-гликаны, очищены из плазмы шелкопряда, таракана, а также некоторых ракообразных. После удаления β -1,3-белка (β -ГСБ) профенолоксидазоактивирующая система шелкопряда не активируется β -1,3-гликаном. Необходимо подчеркнуть, что это не единственная функция β -ГСБ. После взаимодействия β -ГСБ с β -1,3-гликаном происходит связывание комплекса с мембранным рецептором клеток крови. В результате этого последние секретируют компоненты ПФО-системы в ответ на грибковую инфекцию, а у ракообразных стимулируют фагоцитоз низших грибов клетками крови. Первичная структура рассматриваемого белка не имеет очевидных гомологов, но содержит в своем составе триплет RGD, который ответствен за связывание фибронектина и ряда других внеклеточных белков с рецепторами интегринавого семейства. β -1,3-гликансвязывающий белок, отличный от такового ракообразных и насекомых, выделен из подковообразного краба (мечехвоста). Он носит название фактора G, аутокаталитически расщепляется в присутствии β -1,3-гликана, что создает предпосылки для активации системы, свертывающей гемолимфу. Необходимо подчеркнуть, что мечехвосты не содержат феноксидазу, но между каскадами активации их свертывающей гемолимфу системы и профенолоксидазоактивирующей системой ракообразных, насекомых и других беспозвоночных наблюдается заметное сходство.

Наряду с β -ГСБ у членистоногих обнаружены и липополисахаридсвязывающие белки (ЛПС-СБ), в том числе у мечехвоста фактор С. В плазме шелкопряда описан пептидогликансвязывающий белок (ПГСБ), который участвует в активации фенолоксидазной системы. Эндогенные лектины таракана и фосфолипиды мечехвоста могут инициировать процесс активации фенолоксидазной системы.

ПФО-активирующему каскаду белков сопутствуют белки клеточной адгезии. Одним из таких белков является рецептор белка, связывающего β -1,3-гликан. Поскольку белок, связывающий β -1,3-гликан, и белки клеточной адгезии стимулируют клеточное распластывание, дегрануляцию и фагоцитоз,

постольку есть основания предполагать присутствие в клетках рецепторов к этим белкам. Такой рецептор для β -ГСБ идентифицирован и очищен. Есть основания рассматривать его и в качестве рецептора белка клеточной адгезии. Взаимодействие лигандов-белков с рецептором клеток крови приводит к секреции из них компонентов профенолоксидазоактивирующей системы.

Следует обратить внимание на то, что профенолоксидазоактивирующая система и система комплемента имеют ряд сходных функциональных черт. Они обе активируются компонентами клеточных стенок микроорганизмов и генерируют опсонические факторы. Наконец, ПФО рака содержит комплементподобный структурный домен.

Совокупность представленных данных свидетельствует о том, что профенолоксидазоактивирующая система функционирует, сочетая в себе рекогносцировочные и эффекторные свойства. Она развита у некоторых классов членистоногих (ракообразные, насекомые), иглокожих и оболочников. Активирование системы осуществляется β -1,3-гликанами, липополисахаридами и пептидогликанами, которые, связываясь с белками системы, приводят к превращению пропротеиназы (ПФОАФ) в сериновую протеиназу, переводящую в свою очередь профенолоксидазу в фенолоксидазу. Образование и полимеризация меланина на поверхности патогена завершает процесс активации профенолоксидазы, происходящий в гемолимфе или кутикуле. У рака с рассматриваемой системой, по-видимому, в ряде случаев кооперирует адгезионный белок с пероксидазной активностью, известный как пероксинектин.

КИСЛОРОДНЕЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНАКТИВАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ФАГОЦИТОЗЕ И ВОСПАЛЕНИИ

Ранний период изучения кислороднезависимых механизмов инактивации микроорганизмов был связан с поиском веществ, которые И. И. Мечников (1903) определял как «цитазы». Под «цитазом» (автор использовал этот термин в мужском роде) И. И. Мечников понимал внутриклеточное

бактерицидное вещество белковой природы с ферментативным, преимущественно протеолитическим механизмом антимикробного действия. Он допускал существование разнообразных по ферментативной специфичности «цитазов», совокупность которых в микрофагах (нейтрофильных гранулоцитах) была обозначена им как «микротаза», а в моноцитах/макрофагах как «микрочитаза». Причем он не исключал того, что подобное действие цитазов из двух источников относительно условно и допускал присутствие идентичных антимикробных компонентов как в макро-, так и в микрочитазе, но в разных количественных соотношениях. И. И. Мечников интуитивно предполагал, что «последний акт фагоцитарной реакции заключается в химическом или физико-химическом процессе переваривания микробов посредством цитазов...», и в этом, по его мнению, состоит ключевая биологическая роль этих соединений в формировании невосприимчивости (иммунитета) к инфекции бактериальной и грибковой этиологии.

Необходимо, однако, отметить, что концепция «цитаз» И. И. Мечникова носила преимущественно характер гипотезы до тех пор, пока Ф. Петтерсон в 1905 г. не выделил из лейкоцитов гноя человека антимикробные субстанции, которые по заключению автора, представляли смесь щелочных протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб.

Продолжение этих исследований имело место только через 50 лет и было по времени и идеологически сопряжено с открытием и доказательством функциональной роли лизосом в клетках, в том числе и лейкоцитах гранулоцитарного ряда. Антимикробные свойства фагоцитов в тот период пытались связать с активностью кислых гидролаз лизосом этих клеток. Однако уже в первых работах этого направления было продемонстрировано, что бактерицидная активность препаратов «лейкин» и «фагоцитин», полученных из псевдоэозинофилов (клеток структурно и функционально гомологичных нейтрофильным гранулоцитам человека) кролика, обусловлена присутствием в них белковых компонентов, являющихся по своим электрохимическим свойствам поликатионами и, по-видимому, не относящихся к ферментам. Строгое доказательство эти наблюдения получили в исследованиях группы американских ученых,

которые из смеси кислоторастворимых белков, гранул (лизосом) псевдоэозинофилов кролика и морской свинки выделили и охарактеризовали по физико-химическим свойствам группу катионных белков и полипептидов с молекулярной массой менее 10 кДа. В модельной системе *in vitro* ими были продемонстрированы микробоцидные свойства этих белков, отсутствующие у параллельно изученных кислых гидролаз (кислая фосфатаза, РНКаза, ДНКаза, β -глюкоронидаза) лейкоцитов. Следует отметить, что этим биохимическим исследованиям предшествовали морфологические, в которых с использованием красителя прочного зеленого, селективно выявляющего основные по природе белки и пептиды, был установлен факт переноса лизосомных катионных белков на поверхность фагоцитированных бактерий и грибов, по времени совпадающий с потерей микроорганизмами жизнеспособности. В своей совокупности эти наблюдения дали основание рассматривать низкомолекулярные лизосомные катионные белки (полипептиды) нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в качестве специализированной группы веществ, проявляющих в отношении фагоцитированных микробов цитотоксическую активность. В настоящее время эти полипептиды названы *дефенсинами* (от англ. *defense* — защита, оборона), они выделены и секвенированы из НГ человека, крупного рогатого скота, кролика, крысы, морской свинки, хомячка, курицы и индейки. Их структура характеризуется наличием большого числа остатков основных аминокислот (аргинин, лизин) и шести остатков цистеина, образующих три внутримолекулярных дисульфидных мостика (в частности, дефенсин человека НМР-1).

По механизму антимикробного действия дефенсины относятся к молекулярным перфораторам мембран клеток-мишеней. Формируя неспецифические поры и каналы в цитоплазматической мембране бактерий и грибов, они нарушают структурную целостность клеток, вызывают утечку из них жизненно важных компонентов, способствуют проникновению воды в клетки, их набуханию и осмотическому лизису. Таким образом, антимикробное действие дефенсинов не связано с каким-либо известным энзиматическим механизмом. Сходным образом действуют на микроорганизмы катионные пептиды из ней-

трофилов свиньи — протегрины. В гранулярном аппарате НГ обнаружено еще несколько белковых компонентов с неферментативным механизмом антимикробного действия, которые наряду с дефенсинами будут рассмотрены нами далее.

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЖИВОТНЫХ

Более чем вековой период развития фагоцитарной теории иммунитета, впервые сформулированной И. И. Мечниковым в 1883 г., прошел путь от описания феноменологии процесса до расшифровки его морфобиохимических основ. В соответствии с современными взглядами к профессиональным фагоцитам относятся: нейтрофилы, моноциты и их тканевые формы — макрофаги, эозинофилы. Эти клетки объединены в единый функциональный тип благодаря наличию у них ряда общих структурно-метаболических свойств и стереотипности поведения в фагоцитарном процессе. Морфобиохимическая специализация фагоцитов заключается в присутствии у них развитого лизосомного (гранулярного) аппарата, являющегося депо физиологически активных веществ антибиотического действия, среди которых ведущую роль в умерщвлении (киллинге) микроорганизмов играет группа катионных белков и полипептидов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидный проницаемостьувеличивающий протеин, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефенсины и др.). Наряду с фагоцитами многие эпителиальные клетки животных продуцируют также широкий спектр антимикробных пептидов и белков, обеспечивающих их резистентность к инфекции.

В настоящее время уже определены первичные структуры более 900 индивидуальных антимикробных пептидов и белков, принадлежащих к разным гомологическим семействам. Все эти соединения составляют важный молекулярный механизм врожденного иммунитета животных. Обладая антимикробной активностью, эти соединения характеризуются относительно низкой токсичностью по отношению к собственным клеткам макроорганизма (организма-хозяина). Антимикробные пептиды в

перспективе могут рассматриваться в качестве дополнения и замены в медицинской и ветеринарной практике конвенциональным (общепринятым) антибиотикам микробного происхождения, к которым очень быстро формируется резистентность бактерий (антибиотикоустойчивость бактерий). В связи с этим структурно-функциональное изучение пептидных антибиотиков животного происхождения создает предпосылки для разработки и производства химически или биотехнологически синтезированных гомологов этих соединений, которые могли бы найти применение в медицине и ветеринарии. Большинство этих пептидов по своим электрохимическим свойствам являются катионными (основными, щелочными) молекулами. Наряду с основными аминокислотами (аргинин, лизин, гистидин) эти пептиды содержат в своей структуре значительное число остатков аминокислот, несущих гидрофобные боковые группы (валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин, фенилаланин, триптофан). Причем, как правило, в функционально-активной молекуле антибиотических пептидов аминокислотные остатки, несущие основные и гидрофобные боковые группы, пространственно разобщены, что определяет амфипатические (амфифильные) свойства нативных молекул (амфипатический характер их структуры). Последнее свойство рассматриваемых молекул является одним из необходимых структурных условий, обеспечивающих их функционирование в качестве эффективных мембранодезорганизующих веществ, направленных на клетки-мишени.

Исследования в растворах структуры антибиотических пептидов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) позволили идентифицировать среди них несколько основных классов (групп): α -спиральные (LL37, магейнины, цекропины, буфорин), цистинсодержащие β -складчатые (α -, β -, θ -дефенсины, дефенсины насекомых, дрозомидин, протегрины, тахиплезины, лактоферрицин В), пептиды с невыраженной вторичной структурой (PR39, бактенецины, гистатины, индолицидин).

Структура и антимикробные свойства α -дефенсинов. Изучение природы и функциональных свойств антимикробных веществ нейтрофилов привело к открытию в их гранулярном аппарате группы лизосомных катионных белков небольшой мо-

лекулярной массы, получивших в настоящее время название дефенсинов. Последний термин отражает основное функциональное назначение рассматриваемых пептидов — способность обеспечивать защиту макроорганизма от возбудителей инфекционных болезней. В свете биохимических и морфологических данных, накопленных в настоящее время, под лизосомными катионными белками следует понимать обширную группу гранулярных антимикробных протеинов лейкоцитов с основными (щелочными) свойствами их молекул, которая включает в себя в качестве составного компонента и дефенсины. При анализе электрофореграмм кислоторастворимых белков нейтрофилов некоторых видов животных и человека обращает на себя внимание своеобразие белковых спектров лейкоцитов кролика, морской свинки и курицы, которые характеризуются присутствием низкомолекулярных катодных компонентов, опережающих по электрофоретической подвижности лизоцим. Эта группа полипептидов и получила в настоящее время наименование дефенсинов. Сходные катионные полипептиды были обнаружены в нейтрофилах крыс, коров и хомячков. Дефенсины как физиологически активные вещества отличает высокая микробоцидная активность, что и послужило основанием для их всестороннего физико-химического изучения.

Благодаря использованию методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и гель-фильтрации удалось получить в очищенном состоянии 6 компонентов дефенсинов кролика, полностью установить их первичную структуру. Отличительным признаком молекул дефенсинов кролика является высокое (от 5 до 10 остатков) содержание в их составе аминокислоты аргинина, что в значительной степени определяет их катионный заряд, высокую изоэлектрическую точку ($p > 10,5$) и, как следствие, опережающую остальные кислоторастворимые белки нейтрофилов электрофоретическую подвижность в направлении к катоду.

Следует обратить внимание на относительно высокое содержание в их составе (до 30 мол%) аминокислот с гидрофобными боковыми цепями (изолейцин, пролин, лейцин, валин), что, по-видимому, имеет немаловажное значение в реализации функциональных свойств дефенсинов.

Другая особенность первичной структуры дефенсинов заключается в наличии 6 остатков аминокислоты цистеина, участвующих в образовании 3 внутримолекулярных дисульфидных мостиков, придающих глобулоподобной молекуле пептида повышенную устойчивость к переваривающему действию многочисленных протеиназ гранулярного аппарата нейтрофилов и очагов воспаления и стабилизирующих вторичную структуру пептидной молекулы, которая представлена тремя антипараллельными тяжами, образующими 3-складчатый слой. (При этом первый цистеин образует S-S-связь с последним цистеином (1-6 S-S-связь), второй с четвертым (2-4 S-S-связь) и третий с пятым (3-5 S-S-связь).) Благодаря тому, что первый цистеин вступает в образование дисульфидной связи с шестым цистеином (1-6 S-S-связь), молекула дефенсина приобретает циклическую структуру. Эта особенность их строения подтверждена кристаллографическим и ЯМР-спектроскопическим исследованиями. В дополнение к этому выявлено пространственное разделение в свернутой глобуле остатков аминокислот, несущих боковые положительно заряженные и гидрофобные группы, что дает основание характеризовать молекулу как амфипатическую. Подобная амфипатическая (амфифильная) структура дефенсинов делает их активными мембранотропными соединениями, способными не только к взаимодействию с фосфолипидами за счет электростатических свойств своей молекулы, но и внедрению в липидный бислой благодаря гидрофобным взаимодействиям.

Дефенсины нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов) человека были выделены, очищены и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам в 1985 г. Общий план их строения сходен с таковым дефенсинов кролика, для которого характерно консервативное расположение 6 остатков цистеина, 1 — глицина, 2 — аргинина и глутаминовой кислоты. Однако основные фракции дефенсинов человека являются менее катионными (только 4 остатка аргинина) и более гидрофобными (5 остатков ароматических аминокислот, включая триптофан) молекулами по сравнению с гомологичными пептидами из других видовых источников.

Первичная структура дефенсинов человека и кролика была подтверждена в молекулярно-генетических исследованиях по

клонированию их генов и изучению закономерностей их экспрессии в клетках. Дефенсины человека синтезируются в промиелоцитах костного мозга в форме молекулы-предшественницы, состоящей из 94–100 аминокислот. В ходе 6–24-часового процессинга препродефенсина HNP-1 происходит последовательное отщепление от его N-концевой части сначала гидрофобного сигнального пептида, затем в 2 этапа анионного профрагмента с образованием конечной, функционально активной молекулы дефенсина. Биологический смысл установленной последовательности посттрансляционного процессинга молекулы препродефенсина заключается в предупреждении аутоксического действия дефенсинов до момента их упаковки в азурофильные гранулы в аппарате Гольджи.

В настоящее время расшифрованы первичные структуры дефенсинов из нейтрофилов морской свинки, крысы, хомячка и обезьяны, молекулы которых построены по единому структурному принципу, что позволяет отнести все рассмотренные полипептиды к одному гомологическому классу веществ — α -дефенсинам. По-видимому, к семейству α -дефенсинов можно отнести и пептид из кожных покровов морской миноги, принадлежащей к классу круглоротых, подтипу позвоночных, типу лордовых, который был выделен и секвенирован в 1996 г. Первичная структура пептида включает 6 остатков цистеина, образующих 3 внутримолекулярных дисульфидных мостика, и блок из 3 аргинильных остатков. Эта молекула имеет черты структурного сходства с дефенсинами кролика и крысы, хотя в ней отсутствует остаток Е.

В нейтрофилах человека дефенсины составляют 5–7% клеточного белка, кролика — до 18%. Эти полипептиды локализованы преимущественно в азурофильных гранулах нейтрофилов человека и кролика, хотя в следовых количествах представлены и в специфических.

Необходимо отметить, что нейтрофильные гранулоциты являются не единственными клетками организма человека и млекопитающих, содержащими α -дефенсины. Еще в начале 1980-х гг. два компонента кроличьих дефенсинов были выявлены и в азурофильных макрофагах — MCP-1 и MCP-2 соответственно. Позднее была выявлена мРНК дефенсинов и расшифрована

первичная структура этих полипептидов из клеток Панета, локализованных в покровном эпителии слизистой тонкого кишечника мышей. Эти дефенсины получили в литературе наименование криптидинов, поскольку они локализованы в клетках кишечных крипт. Есть доказательства присутствия дефенсинов в клетках эпителия тонкой кишки человека. Клеточно-тканевая топография дефенсинов однозначно свидетельствует в пользу их участия в качестве универсальных антимикробных агентов в формировании резистентности организма к инфекции.

В условиях *in vitro* продемонстрированы бактерицидная, микоцидная и вирусоцидная активности дефенсинов, что позволяет говорить об этой группе полипептидов как об антибиотиках животного происхождения с широким спектром антимикробного действия. В специальном иммуногистологическом исследовании была доказана важная роль дефенсинов в инактивации возбудителя экспериментального сифилиса у кроликов.

С помощью приемов геной инженерии в геном макрофагов мыши встроили ген дефенсина человека, экспрессия которого в трансфецированной клетке была подтверждена определением пептидных молекул иммуноцитохимическим и иммуноферментным методами. Далее оценивали способность исходных и трансфецированных макрофагов мыши подавлять размножение фагоцитированных дрожжевых клеток грибка, и было установлено, что только в макрофагах, продуцирующих внутриклеточно дефенсин человека, наблюдается снижение роста и размножения дрожжевых клеток. Интересно отметить, что этот эффект проявляется при концентрациях дефенсина на 4 порядка меньших, нежели имеющих место в зрелых нейтрофилах человека (~ 50 мкг/ 10^7) и альвеолярных макрофагах кролика (6,5–20 мкг/ 10^7 клеток).

О значимости энтеральных дефенсинов мыши в формировании противoinфекционной резистентности на уровне кишечного тракта свидетельствуют эксперименты с животными, у которых генетическими методами делетирован ген металлопротеиназы матрилизин-7. Эта протеиназа в клетках Панета тонкого кишечника ответственна за процессинг продефенсинов и дефенсины, которые после секреции из этого типа клеток обес-

печивают резистентность к инфекции на уровне кишечного тракта. Животные с нокаутом по гену матрилизина-7 характеризуются повышенной чувствительностью к сальмонеллезной инфекции по сравнению с мышами дикого типа. В другой работе были получены трансгенные мыши с дополнительным геном дефенсина человека, который экспрессировался в клетках Панета экспериментальных животных наряду с генами эндогенных дефенсинов кишечника мыши, известных как крип-тидины. Трансгенные животные приобретали повышенную резистентность к летальной для мышей дикого типа инфекционной дозе.

В морфологических исследованиях, проводимых под руководством профессора В. Е. Пигаревского в 70–90-е гг. XX в. в НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, неоднократно оценивалась роль дефенсинов как антимикробных агентов нейтрофилов при фагоцитозе и воспалении. В ходе этих исследований был разработан цитохимический метод полуколичественного определения дефенсинов и структурно-родственных им пептидов в нейтрофильных гранулоцитах человека и экспериментальных животных, который получил название лизосомально-катионного теста. Тест нашел широкое клиническое применение для оценки состояния внутриклеточной микробоцидной активности нейтрофилов при различных формах инфекционной патологии.

Наряду с антимикробным действием α -дефенсина в культуральных условиях могут проявлять и цитотоксические свойства в отношении опухолевых и нормальных клеток (тимоцитов, спленоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, эндотелиоцитов и эритроцитов) собственного организма. Предполагают, что дефенсина являются одним из молекулярных агентов, ответственных за реализацию антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении герпесинфицированных клеток. Нельзя исключить участия HNP 1-3 в противовирусной защите. У небольшой группы пациентов, для которых характерно носительство вируса иммунодефицита человека без видимого проявления заболевания, при клиническом исследовании было неожиданно установлено, что их $CD8^+$ Т-лимфоциты синтезируют дефенсина HNP 1-3. Для больных с быстро

прогрессирующей формой заболевания не характерна экспрессия дефенсинов в цитотоксических лимфоцитах. Благоприятное для некоторых пациентов течение заболевания связывают со способностью их цитотоксических лимфоцитов продуцировать дефенсины, обладающие прямым вирусоцидным действием по отношению к оболочечным вирусам. Антивирусное действие HNP 1-3 также может быть связано со способностью пептидов избирательно связываться по лектиновому типу взаимодействий с галактозой, входящей в состав поверхностных структур вириона HIV1 или (и) белка CD-4 Т-лимфоцитов, в результате чего нарушается процесс адгезии и пенетрации вируса в клетки-мишени.

В какой степени цитотоксическая активность дефенсинов реализуется в условиях организма — это вопрос, который является предметом проводимых исследований. Внеклеточная локализация части дефенсинов при фагоцитозе и воспалении является убедительно документированным фактом. Однако благодаря быстрому и избирательному взаимодействию их с некоторыми плазменными белками, являющимися ингибиторами сериновых протеиназ и получившими в литературе название серпинов, цитотоксичность дефенсинов вне клетки может быть нейтрализована. В этих условиях они могут оказывать на структуры организма другие воздействия, не приводящие уже к повреждающим эффектам. Другим фактором, определяющим преимущественное воздействие внеклеточно локализованных дефенсинов на микроорганизмы очагов воспаления, кожи и слизистых поверхностей, а не на клетки собственного организма, является липидный состав плазмалеммы бактерий. В частности, в ее составе находится большое количество кислых фосфолипидов (фосфатидилглицерола и кардиолипина), которые практически отсутствуют в цитоплазматической мембране эукариотических клеток. Эти фосфолипиды не только маркируют поверхность мембраны бактерий, но и «притягивают» к ней дефенсины за счет более сильных электростатических взаимодействий между положительно заряженными группами пептида и фосфатными группами фосфолипидов. Таким образом реализуется относительная селективность воздействия дефенсинов на микроорганизмы при внеклеточной

локализации антибиотического пептида (АП). В фаголизосомах же нейтрофилов дефенсины однозначно участвуют в инактивации (киллинге) фагоцитированных микроорганизмов, являясь одним из ведущих молекулярных факторов, обеспечивающих успешность фагоцитоза.

β -дефенсины. Первый представитель другого семейства дефенсинов, известных в настоящее время как β -дефенсины, был выделен из ресничного эпителия трахеи крупного рогатого скота и в литературе известен под названием трахеальный антимикробный пептид (ТАР). Большая группа пептидов этого семейства была выделена и структурно охарактеризована из нейтрофилов крупного рогатого скота. Расположение цистеинов и их сочетание в образовании дисульфидных связей оказались отличными от таковых для ранее охарактеризованных α -дефенсинов из нейтрофилов кролика, морской свинки, человека и крысы, а потому было решено выделить пептиды с подобными структурными особенностями в отдельное семейство β -дефенсинов. Необходимо подчеркнуть, что по своим вторичным и третичным структурам β -дефенсины, несмотря на ряд особенностей аминокислотной последовательности и аранжировки дисульфидных связей, оказались практически идентичными классическим, или α -дефенсинам. Поэтому не случайно они обладают, как правило, и сходной с α -дефенсинами антимикробной активностью.

В 1995 г. β -дефенсин был выделен из эпителия языка коров, продукция этого пептида возрастала при повреждении, ведущем к воспалению органа. Его структура оказалась гомологичной, но не идентичной ТАР и β -дефенсинам из нейтрофилов коров, в связи с чем он был назван антимикробным пептидом языка (LAP). Показано, что мРНК этого пептида обнаруживается в эпителиях кожи лица, респираторного (трахеи, бронхов, легких) и репродуктивного трактов самцов и самок, молочеполовой и пищеварительной систем крупного рогатого скота.

В настоящее время молекулярно-генетическими методами выявлены, выделены и охарактеризованы гены, ответственные за индуцибельный синтез энтеральных дефенсинов (EBD) эпителия тонкой кишки коров, которые хотя и относятся к

β -семейству, но по своей первичной структуре отличны от ранее описанных дефенсинов из нейтрофилов. Картину разнообразия структур дефенсинов и особенностей их продукции в различных клеточно-тканевых структурах у крупного рогатого скота дополняют данные об их конститутивном синтезе в альвеолярных макрофагах. Методом полимеразной цепной реакции выявлена экспрессия гена дефенсина в эпителиальных клетках тонкой кишки, легких и мочеполового тракта мыши. Молекулярно-генетическими методами выявлено присутствие генов β -дефенсинов в клетках свиньи и козы.

Структурно-родственные β -дефенсинам крупного рогатого скота пептиды были выделены и секвенированы из псевдоэозинофилов (клетки структурно и функционально гомологичные нейтрофилам млекопитающих) кур.

Первые сведения об антимикробных пептидах гетерофилов кур были получены еще в 1970-е гг. Было установлено, что в их гранулярном аппарате содержится, по меньшей мере, три низкомолекулярных основных пептида, причем первичная структура этих пептидов оставалась нерасшифрованной. В процессе изучения резистентности кур породы Бройлер-6 к инфекции и зависимости ее от белкового спектра псевдоэозинофилов была установлена интересная закономерность во взаимодействии хозяин-паразит: резистентность кур к инфекции находилась в прямой зависимости от содержания в их гетерофилах дефенсиноподобных пептидов. Группы животных с дефицитом рассматриваемых веществ характеризовались сниженной резистентностью к инфекции, в этих партиях наблюдался максимальный падеж птицы. Было осуществлено выделение и изучение структурно-функциональных свойств рассматриваемых пептидов. Удалось получить в высокоочищенном виде три полипептида, аминокислотный состав которых характеризовался наличием большого количества остатков основных аминокислот (лизина, аргинина) и цистеина.

Секвенирование пептидов выявило следующие особенности их структуры: высокое содержание остатков лизина и аргинина, наличие шести остатков цистеина, образующих три дисульфидных мостика. Структурная организация этих полипептидов отлична от таковой классических дефенсинов человека,

кролика и крысы. Галлинацины (так были названы секвенированные полипептиды), на основании характера расположения цистеиновых остатков в молекуле, следует отнести к группе β -дефенсинов антибиотических полипептидов, выделенных впервые из эпителия трахеи и нейтрофилов коров. Первичные структуры наиболее основных компонентов Gal-1 α и Gal-1 различаются только по трем позициям: в положениях 10 и 20 у первого вместо серина располагается аспарагин и тирозин соответственно, а в положении 32 тирозин заменен на гистидин. Подобные замещения определяют более катионный характер молекулы Gal-1 α по сравнению с Gal-1 и их опережающую электрофоретическую подвижность по направлению к катоду.

Все три полипептида оказались активными антибактериальными агентами. Антигрибковую активность проявили в условиях тестирования только Gal-1 α и Gal-1. Можно предположить, что отсутствие микоцидной активности у Gal-2 обусловлено менее катионным зарядом его молекул. В свете полученных данных об антимикробной активности галлинацинов находит частичное объяснение факт повышенной чувствительности к инфекции тех кур, для которых установлен дефицит этих антибиотических полипептидов в гетерофилах (псевдоэозинофилах).

Были выделены и секвенированы два пептида из гетерофилов кур (СНР-1 и СНР-2), которые практически оказались по структуре идентичны галлинацинам 1 и 1 α , а также три пептида из гетерофилов крови индюшки (ТНР-1, ТНР-2, ТНР-3). Различия между структурами Gal-1 и СНР-1 выявлено только по одной С-концевой аминокислоте (аргинин вместо триптофана). Не исключено, что подобные расхождения в результатах анализа являются следствием не технических ошибок, а связаны с существующими в природе особенностями их структуры, характерными для различных пород кур. Ранее подобная структурная микрогетерогенность в пределах отдельных фракций была установлена для дефенсинов, выделенных из нейтрофилов разных линий и пород крыс.

Новый интерес к исследованиям, связанным с выделением и анализом структурно-функциональных свойств β -дефенсинов, был инициирован обнаружением в плазме крови человека

пептида (hBD-1) рассматриваемого семейства. Далее было показано, что ген hBD-1 экспрессируется как минимум на уровне транскрипции (образования мРНК) во многих органах: слюнные железы, трахея, простата, плацента, тимус, тестикулы, тонкий кишечник; мРНК дефенсина hBD-1 продуцируется непрерывно в культуре эпителиальных нормальных клеток человека из трахеи, бронхов, легких и молочной железы.

Другими группами исследователей молекулярно-генетическими методами выявлены транскрипты гена hBD-1 в эпителии легких и гена, экспрессируемого в эпителии трахеи человека hTAP, и ответственного за синтез пептида, практически идентичного трахеальному пептиду (TAP) из эпителия крупного рогатого скота. Кроме того, в кератиноцитах кожи человека выявлена мРНК, ответственная за возможный синтез дефенсина hBD-2, гомологичного, но не идентичного пептиду hBD-1. Все эти данные свидетельствуют о том, что барьерные эпителии многих органов и тканей человека потенциально способны продуцировать дефенсины преимущественно β -семейства. Это, по-видимому, свойственно и клеткам эпителия языка и мочеполового тракта мышей, языка, респираторного и пищеварительного трактов свиньи, а также речного буйвола и овцы.

θ -дефенсины. θ -дефенсины, в отличие от дефенсинов других типов, относятся к макроциклическим пептидам, циклическая структура которых формируется пептидными, а не дисульфидными, как у α - и β -дефенсинов, связями. Этот тип дефенсинов был впервые выделен из нейтрофилов крови обезьяны и из клеток костного мозга этого же вида обезьян. Первым описанным циклическим дефенсином стал RTD-1, полученный американскими исследователями. RTD-1 представляет собой антимикробный пептид, содержащий три дисульфидных связи, в котором пептидный остов молекулы естественным образом замкнут в макроцикл (кольцо). Авторы показали, что полипептидная цепь RTD-1 (18 аминокислот) транскрибируется с двух различных генов и зрелая молекула θ -дефенсина образуется путем белковой рекомбинации. Особенностью антимикробного действия θ -дефенсина является способность умерщвлять микроорганизмы при повышенной ионной силе (0,1 M), тогда

как α - и β -дефенсины в этих условиях резко снижают свою антибиотическую активность.

Из клеток костного мозга обезьян были выделены циклические антимикробные пептиды RTD-2 и RTD-3, названные так по аналогии с RTD-1. Показано, что RTD-2 и RTD-3, так же как и RTD-1, состоят из 18 аминокислот и образуются в результате ковалентного соединения пептидными связями двух молекул-предшественниц.

Однако в отличие от RTD-1, предшественники которого транслируются с двух различных генов (демидефенсин-1 и демидефенсин-2), RTD-2 и RTD-3 образуются путем объединения двух идентичных нанопептидных фрагментов, кодируемых одним геном — демидефенсином-1 для RTD-2 и демидефенсином-2 для RTD-3. Таким образом, впервые показано существование не описанного ранее посттрансляционного механизма формирования разнообразия первичных структур белково-пептидных соединений антимикробной природы, когда в образовании трех молекул антимикробных пептидов (RTD-1, RTD-2, RTD-3) участвуют пептидные производные только двух генов.

Несмотря на структурное разнообразие дефенсинов рассматриваемых подгрупп, все они представляют собой, как правило, одновременно катионные и амфипатические молекулы с пространственно разобщенными гидрофильными положительно заряженными и гидрофобными боковыми группами аминокислотных остатков, благодаря чему они могут проявлять сродство как к липофобным, так и липофильным соединениям и жирам. Эти структурные особенности всех рассматриваемых групп дефенсинов лежат в основе проявляемой ими антимикробной активности.

МЕХАНИЗМЫ АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ

Большинство пептидов, обладающих микробицидной активностью (дефенсины, протегрины, цекропины, маггйнины, пептид LL-37, бактенецины и др.), рассматриваются как мембраноактивные агенты, хотя имеются данные, свидетельствующие о том, что не только мембранные структуры, но и внутриклеточные компоненты могут быть мишенями для

антимикробных пептидов. Конечным результатом микробоцидного действия рассматриваемых пептидов является деполяризация мембран, нарушение их целостности, ведущее к утечке ионов из клетки и нарушению процессов жизнедеятельности микроорганизмов, приводящее к их гибели.

Изучению взаимодействия антибиотических пептидов с мембранами прокариотических и эукариотических клеток, а также модельными мембранами в настоящее время посвящено много работ, но механизм их антимикробного действия пока до конца не понят. Рассмотрим наиболее общепринятые в настоящее время концепции механизмов антимикробного действия антибиотических пептидов как мембранотропных агентов.

Большинство антимикробных пептидов имеют амфипатическую (амфифильную) структуру с поверхностно гидрофобными и положительно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков. Подобная организация третичной структуры антимикробных пептидов *a priori* предполагает возможность их взаимодействия как с отрицательно заряженными молекулами (кислые фосфолипиды мембран, липополисахариды, тейхоевые кислоты, кислые гликозаминогликаны, гепарин, нуклеиновые кислоты, кислые белки (серпины, например), так и липофильными молекулами (алифатические хвосты жирных кислот в составе мембран, липид А липополисахарида). Следует подчеркнуть, что основные компоненты микробных стенок — пептидогликаны и липополисахариды — являются отрицательно заряженными молекулами, поэтому взаимодействие с ними играет важную роль в связывании (сорбции) антимикробных пептидов к клеткам-мишеням. Летальный же эффект антибиотических пептидов, скорее всего, связан с их способностью нарушать структурную целостность цитоплазматических мембран микробных клеток, что установлено морфологически. D-энантиомеры α -спиральных антимикробных пептидов обладают, как правило, антимикробной активностью, идентичной природным L-пептидам, что свидетельствует об отсутствии стереоспецифичности в их взаимодействии с компонентами микробных оболочек.

Накопленные в настоящее время экспериментальные данные дают основание для следующих представлений о механиз-

мах антибиотического действия дефенсинов. Выявлено несколько общих закономерностей в характере действия дефенсинов на стрептококки, эшерихия коли и кандиды. Положительный заряд молекул дефенсинов определяет их высокое сродство к отрицательно заряженным компонентам (тейхоевые кислоты, липополисахариды, фосфолипиды) клеточной оболочки микроорганизмов. Благодаря электростатическому взаимодействию происходит сорбция полипептидов на поверхности микробных клеток. В пользу ведущей роли электростатических сил на первом этапе этого процесса свидетельствуют данные об ослаблении или даже отмене антимикробного действия дефенсинов в присутствии полианионов (ДНК, РНК, полифосфаты, гепарин, липополисахариды) или повышении ионной силы среды выше значения 0,1. Все эти факторы в той или иной степени подавляют сорбцию пептидов на поверхности клеток-мишеней. В этом отношении поведение дефенсинов сходно с таковым, описанным для ядерных основных белков — гистонов и протаминов.

Дефенсины способны увеличивать проницаемость (пермеализовать) наружной и цитоплазматической мембраны *E. coli* для ионов и ряда других низкомолекулярных веществ цитоплазмы. Это потенциалзависимый процесс, так как HNP-3 поражает только метаболически активные клетки и практически не воздействует на деполяризованные 2,4-динитрофенолом мембраны. Однако более основные дефенсины кролика воздействуют на микробы независимо от мембранного потенциала клеток-мишеней. Эти данные совпадают с результатами исследований по воздействию дефенсинов на искусственные липидные бислои (мембраны), в которых был продемонстрирован потенциалзависимый характер пермеализации этих структур.

Обычно в водных растворах и при взаимодействии с мембранами дефенсины лейкоцитов человека образуют димеры, которые непосредственно атакуют клетки-мишени. Дефенсиновый димер по форме напоминает корзину с аполярным основанием и полярной вершиной, образуемой двумя N-концевыми и двумя C-концевыми аминокислотными остатками. Это возможно вследствие циклической структуры дефенсиновых мономеров, формируемых дисульфидной связью между первым (1) и последним (6) цистеиновыми остатками молекулы. Амфипатичный

димер дефенсина HNP-3 обладает способностью как к сорбции на поверхности мембран за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов, так и к внедрению в двойной липидный слой за счет гидрофобных взаимодействий липофильной части пептидного ассоциата с алкильными (алифатическими, углеводородными) хвостами жирных кислот.

Наличие в структуре дефенсинов значительного числа неполярных боковых цепей гидрофобных аминокислот обуславливает возможность их внедрения в липофильную фазу бислоя мембран бактерий и грибов. За счет гидрофобных взаимодействий с углеводородными хвостами жирных кислот осуществляется внедрение антимикробных пептидов в мембраны. Как было выяснено в экспериментах с использованием дыхательных ядов (цианид, 2-п-гептил-4-гидроксихинолин-N-оксид), состояние обмена веществ микробной клетки заметно сказывается на ее чувствительности к действию дефенсинов. Активно метаболизирующие бактерии и грибы являются лучшей мишенью для поражающего действия дефенсинов по сравнению с клетками, находящимися в стационарной фазе роста культуры или в условиях анаэробнозиса.

Этот парадоксальный феномен может свидетельствовать о значении трансмембранного потенциала клеток-мишеней в реализации антимикробного действия дефенсинов. По-видимому, в процессе пенетрации полипептидов через мембраны важную роль играют ориентация электрического поля плазмалеммы и величина ее мембранного потенциала. Благодаря тому, что внутренняя поверхность мембран по отношению к внешней заряжена отрицательно, возможен электрофорез катионных (особенно амфипатических) веществ через цитоплазматическую мембрану внутрь микробной клетки. Это свойство электрического поля мембран является третьим важным фактором, определяющим эффективность антимикробного действия дефенсинов. Процесс внедрения и прохождения дефенсинов через мембрану сопровождается нарушением ее структурной целостности с образованием пор, что имеет следствием изменение осмотического барьера клеток-мишеней, вытекание из них жизненно важных компонентов (ионов K^+ , Ca^{2+} , фосфорсодер-

жащих соединений, аминокислот, нуклеотидов, коферментов), деполяризацию (диссипацию) мембранного потенциала. При этом дезорганизация мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану, приводит к подавлению дыхания, окислительного фосфорилирования, репликации, транскрипции и синтеза белков, т. е. ключевых метаболических процессов микробных клеток. В условиях нарушения структурной целостности мембран вода имеет тенденцию накапливаться в клетках и вызывает набухание, которое может привести к их разрыву. Результирующей всех этих структурно-метаболических изменений под действием дефенсинов является гибель микроорганизмов.

Мы сознательно остановились на рассмотрении механизмов антимикробного действия дефенсинов, поскольку они в значительной степени свойственны многим природным и синтетическим положительно заряженным полимерам, несмотря на наличие у последних ряда специфических структурных свойств. Модификации нативных структур (матриц) антимикробных пептидов позволяют понять особенности механизмов их цитотоксического действия. Увеличение числа положительных зарядов в молекулах химически синтезированных пептидов усиливает их бактерицидную активность и снижает гемолитическую. Подобный подход оправдал себя в функциональном анализе производных магейнина-2, лактоферрицина В и индолицидина. Увеличение в составе пептидов аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми группами приводит к усилению как гемолитической, так и бактерицидной активности этих соединений. Кроме того, продемонстрирована зависимость избирательности взаимодействия магейнина-2 с бактериальными мембранами по сравнению с мембранами млекопитающих от состава липидов мембран-мишеней. Содержание в первых кислых липидов (фосфатидилглицерин, кардиолицин, фосфатидилсерин) существенно выше, чем во вторых. В частности, магейнин-2 освобождает более эффективно калцеин из липосом, образованных фосфатидилглицерином, в то время как меллитин — классический гемолитический пептид — более активен (более чем в 100 раз по сравнению с магейнином) в отношении липосом, составленных из цвиттерионного фосфатидилхолина.

Освобождение из липосом такого большого зонда, как калцеин, свидетельствует об образовании в них под воздействием анализируемых пептидов значительных по размерам пор. Образование таких пор предполагает трансмембранную локализацию антимикробных пептидов.

Для подавляющего большинства антимикробных пептидов в процесс связывания их с мембранами не вовлечены рецепторные механизмы. В пользу такого заключения свидетельствует факт, что синтетические пептиды, построенные из D-аминокислот, так же эффективно связываются с бактериальными мембранами и проявляют свое микробицидное действие, как и их природные стереоизомеры, состоящие из L-аминокислот.

Связывание антимикробных пептидов с мембранами происходит, главным образом, за счет *электростатического взаимодействия* положительно заряженных пептидов с кислыми компонентами мембран. Эффективность этого связывания зависит от состава мембран и обуславливает избирательное действие большинства антимикробных пептидов по отношению к бактериальным клеткам, но не к эукариотическим, отличающимся по липидному составу мембран. В состав мембран эукариотических клеток входят в основном нейтральные цвиттеррионные фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, сфингомиелин, тогда как бактериальные мембраны содержат большое количество кислых фосфолипидов — фосфатидилглицерина, кардиолипина. Кроме того, наружная мембрана грамотрицательных бактерий состоит из анионного липополисахарида, поверхность грамположительных бактерий включает другие отрицательно заряженные компоненты липотейхоевой кислоты. Таким образом, отрицательный заряд поверхности бактериальных клеток значительно выше, чем эукариотических, что и определяет значительно более эффективное связывание катионных антимикробных пептидов с анионными мембранами бактерий.

За стадией связывания антимикробных пептидов с клеткой-мишенью следует их *встраивание в мембрану*, приводящее к образованию поры, через которую происходит утечка ионов и других компонентов клетки, или к формированию ионного канала, или к другим нарушениям мембранных структур. Пока

механизм этого встраивания антимикробных пептидов в клеточные мембраны полностью не выяснен, но в экспериментах на модельных мембранах получены данные, позволяющие разработать несколько возможных путей взаимодействия пептидов с мембранами. Наиболее распространенными в настоящее время являются две модели взаимодействия пептидов с мембранами — модель «ковра» и модель «сборки бочки».

Модель «сборки бочки» предложена для дефенсинов и протегринов, формирующих трансмембранные каналы. Процесс образования такой «бочки» происходит следующим образом: пептиды в форме мономеров связываются с мембраной; при увеличении концентрации связанных с мембраной мономеров они начинают взаимодействовать друг с другом, образуют димеры, тримеры и т. д., и далее встраиваются в мембрану, формируя пору так, что гидрофобные поверхности пептидов взаимодействуют с липидным кором мембраны, в то время как гидрофильные участки обращаются к внутренней поверхности «бочки», образуя пору для гидрофильных соединений. При нарастании концентрации пептида все новые мономерные молекулы принимают участие в образовании поры, увеличивая ее размер. Необходимо отметить, что в данном процессе критическим моментом является агрегация мономерных пептидных молекул на поверхности мембраны, в процессе которой они ориентируются гидрофильными участками друг к другу, что предшествует встраиванию их в мембрану. Встраивание в мембрану одиночной амфипатической молекулы энергетически невыгодно, так как ее полярные участки должны бы были приходиться в соприкосновение с гидрофобными цепями жирных кислот липидов мембраны. Таким образом, в данной модели перфорации мембран клеток-мишеней ключевую роль играют гидрофобные взаимодействия и в меньшей степени величина положительного заряда пептидов.

Другая модель — *ковровый механизм* нарушения структуры мембраны — имеет в основе гидрофильные взаимодействия молекул. Этот механизм был предложен для молекул пептидов, которые имеют конформацию амфипатической α -спирали (т. е. боковые цепи аминокислот с положительным зарядом располагаются вдоль одной поверхности β -спирали, а боковые цепи гидрофобных аминокислот — вдоль другой), таких

как дермасептин, цекропин, человеческий кателицидин, LL-37 и др., а также, как предполагается, и для некоторых мембранолитических пептидов с β -структурной организацией молекулы. Согласно этой модели, литические пептиды находятся в контакте с головками кислых фосфолипидов на протяжении всего процесса деструктурирования мембраны.

Данная модель включает четыре стадии: первая — связывание молекул пептида, имеющего, как правило, высокий положительный заряд и находящегося в форме мономера, с головками фосфолипидов мембраны, а также с липополисахаридом грамотрицательных бактерий или тейхоевыми кислотами грамположительных; вторая — размещение молекул пептидов на поверхности мембраны так, что их гидрофильные поверхности оказываются направленными либо к головкам фосфолипидов, либо к водному раствору; третья — вращение молекул пептида, приводящее к реориентации их гидрофобных участков по направлению к гидрофобному ядру мембраны; четвертая — дезинтеграция мембраны вследствие нарушения структуры липидного бислоя. Стадия, предшествующая дезинтеграции мембраны, может сопровождаться образованием в ней отверстий, через которые могут проходить как ионы, так и более высокомолекулярные соединения. Такие процессы были показаны при действии дермасептина и магейнина; образующиеся при этом поры получили название тороидальных, или «ход червя». В отличие от пор, рассматриваемых в предыдущей модели, образованных только молекулами пептидов, тороидальная пора построена как из молекул пептидов, так и из липидных молекул. Через образовавшиеся тороидальные поры пептидные молекулы могут проходить через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и далее через внутреннюю мембрану.

В пользу развиваемых представлений о механизмах антимикробного действия рассматриваемых пептидов свидетельствуют и данные о молекулярных основах резистентности бактерий к этой группе соединений. Выявлены штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивость которых к действию дефенсинов, протегринов и других антибиотических пептидов связана с модификацией структур клеточной стенки и цитоплазматической мембраны микроорганизмов, снижающих их общий отрицательный

заряд поверхности. В частности, было установлено, что у этих штаммов наблюдается повышенное включение аминокислоты D-аланина в состав тейхоевых кислот путем их эстерификации. Другой вариант модификации связан с ковалентным присоединением к мембранному фосфатидилглицеролу дополнительных остатков аминокислоты L-лизин. Включение D-аланина и L-лизина в состав оболочки стафилококков приводит к заметному снижению отрицательного заряда поверхности микробной клетки и, как следствие, уменьшает электростатическое связывание с ней катионных пептидов, являющееся необходимым условием их микробоцидного действия. У грамотрицательной бактерии *Salmonella enterica*, устойчивой к действию катионного антибиотика полимиксина, также выявлена структурная модификация в составе ведущего компонента наружной мембраны липополисахарида, заключающаяся в ковалентном присоединении к липиду А аминокислоты арабинозы, протонированная аминогруппа которой снижает отрицательный заряд поверхности микроба. Все рассмотренные модификации обеспечивают формирование резистентности микроорганизмов к пептидам катионной природы, блокируя инициальную фазу взаимодействия бактерий с пептидами.

В арсенале микробной резистентности к антибиотическим пептидам могут быть задействованы и протеазы. В частности, к таковой относится Pho-P-регулируемая протеаза наружной мембраны *S. enterica*, обеспечивающая повышенную резистентность бактерий к α -спиральным антимикробным пептидам, благодаря их активному протеолизу. Некоторые штаммы *Neisseria gonorrhoeae* являются высокорезистентными к протеинам и LL-37, что связано со способностью бактериальных клеток активно выводить пептиды, связавшиеся с их поверхностью, используя механизмы активного переноса веществ во внеклеточную среду.

ЛАКТОФЕРРИН

Лактоферрин, негемовый железосвязывающий гликопротеин, впервые обнаруженный в молоке коров, рассматривается в настоящее время в качестве одного из неотъемлемых компонентов биохимической системы защиты животных от

инфекции. В очищенном состоянии лактоферрины молока коров и человека представляют одноцепочечные белки с молекулярной массой около 80 кДа, способные в присутствии бикарбонатных ионов образовывать прочный комплекс с двумя атомами Fe^{3+} , окрашенный в красный цвет. В связи с этим в ранней литературе лактоферрин (ЛФ) часто называли «красным белком». Лактоферрин широко представлен в клеточно-тканевых образованиях организма млекопитающих, он выявлен в большинстве барьерных эпителиев пищеварительного, респираторного и мочеполового трактов и их секретах, а также в экзокринных железах и их секретах (молоке, слюне, слезах, желчи, семенной и цервикальной жидкости, соке желудка, кишечника и поджелудочной железы). В 1969 г. ЛФ впервые был идентифицирован иммунохимически в гранулярном аппарате нейтрофильных гранулоцитов (НГ) человека и морской свинки. В ходе дальнейших исследований было однозначно показано, что ЛФ является маркерным белком специфических гранул НГ. Структурная идентичность ЛФ молока и нейтрофильных гранулоцитов методами белковой химии впервые доказана для белков человека и при сравнительном анализе физико-химических свойств гомологичных белков свиньи. Первичная структура ЛФ молока человека была расшифрована в 1984 г. Функционально ЛФ представляют собой природные комплексоны (хелаторы) клеток и жидких сред организма, прочно связывающие и транспортирующие катионы металлов переменной валентности (Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Mn^{3+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}). В естественных условиях они чаще всего взаимодействуют с ионами железа, меди и цинка. Реакция связывания ионов железа протекает с обязательным участием бикарбонатных анионов. При этом образуется комплекс красного цвета с максимумом поглощения в видимой области при $\lambda = 460-470$ нм.

Комплексообразующая способность ЛФ лежит в основе детоксицирующей, транспортной и антимикробной функций этих белков. Антимикробная активность ЛФ является однозначно установленным фактом. Причем в преобладающем числе исследований продемонстрировано микробостатическое действие белка. Создавая и поддерживая дефицитную по катионам железа и других металлов переменной валентности среду, ЛФ ин-

яется одним из ведущих молекулярных факторов, сдерживающих размножение и рост бактерий и низших грибов на поверхности барьерных эпителиев в условиях фаголизосом нейтрофильных гранулоцитов. В частично насыщенном железом состоянии (по данным разных авторов, эта величина колеблется от 10 до 30% от максимально возможной) лактоферрин, посредством связывания ионов металлов переменной валентности из среды и поверхностных структур оболочек микроорганизмов лишает последние жизненно важных микроэлементов, входящих в состав цитохромов дыхательной цепи, каталаз, пероксидаз и супероксиддисмутаза, сдерживая таким образом рост и размножение бактерий и грибов и снижая их резистентность к токсическому действию химически реактивных производных кислорода. Естественно, что насыщенный железом ЛФ не проявляет в рассматриваемых условиях микростатической активности. Удержание железа лактоферрином и трансферрином во внутренней среде животного организма является одним из ведущих механизмов его защиты от инфекции и опухолевого роста. В рамках развиваемой концепции В. Н. Кокряков постулирует, что в природе существует жесткая конкуренция за необходимое для роста и размножения железо между клетками бактерий, низших грибов, простейших и опухолей, с одной стороны, и клетками организма-хозяина — с другой. В связи с этим в клетках, тканях и жидких средах организма-хозяина эволюционно вырабатывается набор молекулярных механизмов удержания (секвестрирования, депонирования) железа, которые обеспечивают его резистентность к инфекции и опухолевой прогрессии. Лактоферрин и трансферрин как раз и являются ведущими молекулярными компонентами рассматриваемой системы врожденного иммунитета (естественной резистентности). Из типичических и экспериментальных наблюдений известно, что гипферриемия плазмы крови в сочетании с гипертрансферринемией препятствуют развитию инфекции в организме. Введение в организм экзогенного железа усиливает у больных и экспериментальных животных инфекционный процесс. С целью усиления железосвязывающего процесса в животном организме рекомендуется умеренное ограничение железа и меди в диете, введение железосвязывающих белков (лактоферрин,

трансферрин, ферритин) и других хелаторов, ИЛ-1 терапию, которая индуцирует плазменную гипоферремию.

Наряду с микростатическим действием было установлено и *прямое бактерицидное действие* ЛФ в отношении некоторых видов микрофлоры. Это свойство присуще только ненасыщенному железом ЛФ (аполактоферрину), как и в случае проявления его микростатической активности. Однако механизм подобного действия остается во многом неясным. Можно предположить, что в условиях этих экспериментов бактерицидность аполактоферрина являлась результатом ряда изменений в структуре оболочек бактерий. Например, известна способность ЛФ выщеплять (высвобождать) молекулы липополисахаридов (эндотоксинов) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий. По мнению авторов, это происходит в результате связывания лактоферрином Mg^{2+} и Ca^{2+} (строго не доказанное), которые стабилизируют наружную мембрану. Подобным дестабилизирующим образом действует на мембраны известный хелатор ЭДТА.

Наряду с этим возможно и прямое электростатическое взаимодействие слабоосновных молекул ЛФ с карбоксильными группами 2-кето-3-дезоксидоктоновой кислоты (КДО) сердцевинного полисахарида и фосфатными остатками липида А, входящих в молекулы липополисахарида, завершающееся выщеплением последней из наружной мембраны и нарушением ее целостности и барьерной функции. Подобным образом на грамположительные бактерии действует пептидный антибиотик микробного происхождения полимиксин В. Само по себе рассмотренное воздействие ЛФ на структуру наружной мембраны оболочки грамотрицательных бактерий не может привести к цитотидному эффекту. Есть основания предполагать, что в процессе дезорганизации оболочечной структуры бактерий может иметь место активация микробных энзимов (вскрытие их латентной активности), например фосфолипаз, гликаназ, приводящая к аутоповреждению клеток, с которыми взаимодействует лактоферрин. Сходный механизм антимикробного действия реализуется частично и бактерицидным проникающе-увеличивающим белком из нейтрофильных гранулоцитов человека и кролика.

В пользу существования избирательного взаимодействия ЛФ и эндотоксина свидетельствуют результаты эксперимента, в котором парентерально введенный ЛФ коровы защищал мышей, инфицированных летальной дозой *E. coli*. Не исключены и другие варианты трактовки протективного эффекта гетерологичного ЛФ в организме мышей, например, как проявление эндотоксин-нейтрализующей активности белка.

Наконец, бактерицидные свойства ЛФ в отношении некоторых видов микроорганизмов могут быть объяснены образованием коротких основных (катионных) пептидов из N-концевых участков белка путем ограниченного протеолиза. В ходе кислотного гидролиза ЛФ крупного рогатого скота был выделен пептид, представляющий фрагмент N-концевой части молекулы из ее первых 54 аминокислотных остатков, а при обработке пепсином — более короткий участок. Последний получил в литературе название лактоферрицин В. Оба пептида обладают существенно большим микробицидным действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии и грибы, нежели исходная молекула. Установлено наличие дисульфидной связи в лактоферрицине В, а в его функциональном гомологе из ЛФ молока человека — лактоферрицине Н — два S-S-мостика. Интересно, что идентичный лактоферрицину В пептид выделен из содержимого желудка крыс, которых в течение 4 дней поддерживали на специальной диете, содержащей 40% коровьего лактоферрина. Это первое свидетельство образования антимикробных пептидов из ЛФ в условиях *in vivo*. Механизм антимикробного действия рассматриваемых пептидов сходен, скорее всего, с таковым дефенсинов, протегринов, бактеницина и других антибиотических пептидов животного происхождения.

Таким образом, столь разнообразными путями ЛФ может вовлекаться в процесс инактивации фагоцитированных или выходящих на поверхности барьерных эпителиев микроорганизмов. Необходимо учитывать, что в реальных условиях организма ЛФ как составной элемент системы молекулярной защиты от инфекции вступает в кооперативные взаимодействия усиливающего характера с другими факторами врожденного иммунитета, такими как лизоцим, протеиназы пепсинового типа, кислородзависимая миелопероксидазная система.

ЛФ в интактном состоянии, будучи слабым микробоцидным агентом, тем не менее, создает условия, препятствующие размножению микроорганизмов и способствующие реализации антимикробных свойств лизоцима и миелопероксидазной системы. Причем рассматриваемые процессы кооперации антимикробных белков могут иметь место не только в фаголизосомах нейтрофильных гранулоцитов, но и на поверхности слизистых покровов и в некоторых секретах (слезы, слюна, молоко) организма.

Клинические наблюдения свидетельствуют в пользу обособности представлений о важной антимикробной функции ЛФ. Выявлены больные с рецидивирующими инфекционными заболеваниями, часто стафилококковой этиологии, в нейтрофильных гранулоцитах которых отсутствуют специфические гранулы и их составные компоненты, в частности ЛФ. При этом поглотительная и дегрануляционная функции таких НГ не нарушены, но в них существенно подавлена способность инактивировать фагоцитированные бактерии. Снижение бактерицидной активности НГ больных гранулоцитарной лейкемией, которые исследователи также связывают с дефицитом в их гранулярном аппарате ЛФ. Недостаточность ЛФ во внутренней среде организма может приводить к нарушению ряда процессов гуморально-клеточной кооперации клеток иммунной системы, в которых предполагается регуляторное участие лактоферрина, продуцируемого нейтрофильными гранулоцитами.

Наряду с антимикробной активностью ЛФ в различных модельных условиях способен стимулировать НК-клетки, антителозависимую клеточную цитотоксичность, активированные лимфокинами киллерные клетки, нейтрофильные гранулоциты и макрофаги. Все эти клетки в той или иной степени отвечают за поддержание необходимого уровня как антимикробной резистентности, так и противоопухолевой защиты организма. ЛФ усиливает адгезивность, хемотаксис и дыхательный взрыв нейтрофильных гранулоцитов. Системное влияние ЛФ на защитные функции организма может быть опосредовано его способностью подавлять продукцию моноцитами и макрофагами гранулоцит-моноцит колонестимулирующего фактора, которая была установлена в культуральных условиях и *in vivo*.

В связи с этим свойством ЛФ может рассматриваться в качестве одного из негативных регуляторов миелопоэза. Все это вместе взятое свидетельствует о широком функциональном поле ЛФ в рамках клеточно-молекулярных механизмов, отвечающих за реакции врожденного и приобретенного иммунитета.

БАКТЕРИЦИДНЫЙ УВЕЛИЧИВАЮЩИЙ ПРОНИЦАЕМОСТЬ БЕЛОК

Поиски антимикробных факторов нейтрофилов, избирательно действующих на грамотрицательные бактерии, были стимулированы наблюдениями, установившими различный характер ультраструктурных изменений фагоцитированных бактерий в зависимости от особенностей строения их клеточной оболочки. Так, если поглощение и инактивация грамположительных бактерий сопровождается быстрыми и обширными деструктивными изменениями микробных клеток, то начальные стадии фагоцитоза кишечной палочки протекали без ее существенной структурно-функциональной дезорганизации.

Было осуществлено выделение лизин-богатых белков из нейтрофилов человека и кролика с молекулярной массой в пределах 50–60 кДа, которые в условиях *in vitro* оказывали цитостатическое действие преимущественно на грамотрицательные виды бактерий. Установленная способность этих белков подавлять размножение и увеличивать проницаемость наружной мембраны бактерий послужила основанием для наименования их как бактерицидные проницаемостьувеличивающие белки (БПУ-белки).

БПУ-белки составляют до 1% от общего белка нейтрофилов человека и кролика и содержатся в азурофильных гранулах. Клонирование генов и воссоздание на основе генной структуры аминокислотной последовательности белков из нейтрофилов человека и крупного рогатого скота выявило значительную степень сходства их первичных структур (> 60%). Изоточки обоих белков находятся в щелочной области значений рН (рI – 9,5), что позволяет отнести их к поликатионным веществам. Другой значительной особенностью этих белков является высокое содержание в их составе гидрофобных аминокислот (46 мол%).

Белки состоят из катионной, лизинобогатой N-концевой части и очень гидрофобной слабо заряженной C-концевой половины. Относительно гидрофильный пролин-богатый участок, чувствительный к действию протеаз, разделяет эти две основные части молекулы БПУ-белка. После ограниченного протеолиза молекулы белка из него образуются 25 кДа-аминотерминальный и 30 кДа-карбокситерминальный фрагменты.

Холобелок в наномолярных концентрациях ингибирует рост и размножение многих видов грамотрицательных бактерий и не оказывает цитотоксического действия на грамположительные бактерии и эукариотические клетки.

Цитотоксическое действие БПУ-белка на грамотрицательные бактерии реализуется в две стадии. На первой стадии белки в концентрации 10^{-8} – 10^{-9} М при нейтрально-щелочных значениях pH вызывают в течение первых минут контакта с чувствительными бактериями (*E. coli*, *S. typhimurium*) обратимое подавление способности микробов к размножению. Это явление совпадает по времени со связыванием белка с наружной мембраной и сопровождается временным увеличением проницаемости внешней (наружной) мембраны грамотрицательных бактерий для гидрофобных антибиотиков (актиномицин Д, рифампицин), в норме не проникающих в клетку, и активацией катаболических ферментов (фосфолипазы A_2 , пептидогликаназа) микробной стенки. Интересно, что, несмотря на потерю микроорганизмами способности к делению, некоторые их физиологические функции, связанные с деятельностью внутренней (плазматической) мембраны (транспорт ионов K^+ , макромолекулярные синтезы), остаются неизменными на протяжении первых 20–30 мин взаимодействия бактерицидного белка с микробной поверхностью. Электронно-микроскопическое изучение морфологических изменений в обработанных БПУ-белком микробных клетках выявило только незначительное утолщение их наружной мембраны при практически полной сохранности внутренних структур бактерий.

Как было установлено в специально проведенном исследовании, первостепенное значение в реализации антимикробных свойств БПУ-белка имеет N-концевой фрагмент его молекулы. Полученный путем протеолиза или биотехнологически реком-

бинантный аминотерминальный фрагмент проявляет те же антибактериальные свойства, что и холобелок. Карбокситерминальный фрагмент не проявляет существенных антимикробных свойств.

N-концевая часть молекулы с молекулярной массой около 25 кДа характеризуется высоким положительным зарядом (+16) и гидрофобностью, обеспечивающими повышенное сродство белка к липополисахариду (эндотоксину) наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Очищенные природные и рекомбинантные (rBPI55) холобелки, как и их аминотерминальные фрагменты (nBPI25, rBPI23) в условиях *in vitro* и *in vivo* ингибируют основные ЛПС-опосредованные эффекты благодаря их высокой эндотоксинсвязывающей способности. Неспецифическое электростатическое (заряд-заряд) взаимодействие основных групп ($e-NH_2$ -лизина, гуанидиновая аргинина) белка с кислотными компонентами (в первую очередь, по-видимому, с 3-дезоксид-D-маннооктулозоновой кислотой) липополисахарида внешней мембраны грамотрицательных бактерий является первым необходимым условием реализации конечного биологического эффекта. Надфизиологические (40–80 мМ) концентрации Mg^{2+} или Ca^{2+} , препятствующие связыванию белка с поверхностью бактерий, блокируют и проявление его антимикробных свойств. Интересно, что резистентные к действию БПУ-белка штаммы грамотрицательных и грамположительных бактерий не способны адсорбировать его на своей поверхности. Чувствительность различных штаммов и видов грамотрицательных бактерий находится в прямой зависимости от степени сорбции на них бактерицидного белка. Шероховатые штаммы, несущие на своей поверхности больше анионных групп по сравнению с гладкими штаммами, связывают БПУ-белок из среды эффективнее, они и более подвержены его антимикробному действию. Можно отметить, что активности холобелка и его аминотерминального фрагмента в отношении шероховатых штаммов практически одинаковы, но рекомбинантный вариант N-концевой части молекулы (rBPI23) почти в 50 раз активнее БПУ-белка в отношении гладких штаммов, что связано, по-видимому, с облегченным доступом меньшего по размерам рекомбинантного фрагмента к местам инициального связывания с ЛПС-молекулами.

Белок воздействует на широкий спектр видов грамотрицательных бактерий, включая как инкапсулированные, так и не содержащие капсул микроорганизмы. Чувствительность бактерий к белку в значительной степени зависит от структуры их оболочечных липополисахаридов, в особенности их полисахаридной цепочки, длинные цепи снижают сродство БПУ-белка к ЛПС вследствие затруднения доступа к коровой анионной области молекулы эндотоксина.

В связи с особой значимостью присутствия ЛПС в оболочке грамотрицательных бактерий в реакции избирательного действия БПУ-белка на эту группу микроорганизмов следует кратко рассмотреть современное представление о структуре *эндотоксинов*. Липополисахарид (эндотоксин) наружной мембраны является «визитной карточкой» грамотрицательных бактерий. В составе клеточной стенки бактерий он вместе с белками и липидами формирует надмолекулярный комплекс, известный как O-антиген.

Липополисахарид состоит из связанных амидной связью полисахарида и липида А. Полисахаридная часть ЛПС ориентирована на поверхность микробной клетки и в значительной степени определяет серологическую специфичность O-антигена. Полисахарид в свою очередь состоит из антигенной боковой цепи, представляющей собой полимер из различных сочетаний абеквзы, маннозы, рамнозы, галактозы и глюкозы, которая, как правило, выступает над поверхностью клеточной оболочки и сердцевинной (коровой) части, которая в качестве основных структурных компонентов содержит несколько молекул 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (сокращенно КДО), гексозу, этаноламин и фосфорную кислоту. Три остатка КДО образуют структурный блок, связывающий двухвалентные катионы Mg и Ca. Комплекс КДО с катионами определяет в значительной степени некоторые структурно-функциональные свойства внешнего слоя наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Удаление катионов с помощью таких хелатообразующих агентов, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), приводит к разрыхлению наружной мембраны, освобождению (солюбилизации) из нее части молекул липополисахарида и изменению ее барьерных функций. В норме непроницаемая для

гидрофобных соединений, в подобных условиях она начинает пропускать их внутрь клеточной стенки. Сердцевинный полисахарид ковалентно связан с липидом А, локализованным во внешнем слое наружной мембраны. Таким образом, структура наружной мембраны асимметрична, поскольку липополисахарид локализован исключительно в ее внешнем слое.

Липополисахариды (эндотоксины) в свободном состоянии являются биологически активными соединениями, определяющими многие нежелательные стороны патогенеза инфекционных заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями. В частности, при взаимодействии с клетками иммунной системы организма-хозяина они вызывают избыточную продукцию химически реактивных производных кислорода нейтрофильными гранулоцитами и цитокинов (ИЛ-1, ФНО α и др.) моноцитами/макрофагами. В высоких концентрациях эти соединения могут приводить вместо защиты от инфекции к системному воспалению и инициировать повреждения наиболее важных жизнеобеспечивающих систем макроорганизма.

Совокупность этих патологических проявлений известна в литературе и медицинской практике как *эндотоксический шок*, и борьба с этим синдромом представляет важную клиническую проблему. В связи с этим способность ВПУ-белка избирательно взаимодействовать и нейтрализовать ЛПС может служить основанием для его использования в медицинской практике. Уже в течение ряда лет ведутся работы в ньюйоркском университете и калифорнийской фармацевтической фирме «Хота» по разработке эффективного антиэндотоксического препарата на основе ВПУ-белка. Было установлено, что не только природный ВПУ-белок, но и рекомбинантная форма N-концевой части (rVP123), полученная биотехнологическим способом, обладают высоким сродством ($K = 2 - 5$ nM) к изолированным липополисахаридам многих грамотрицательных бактерий, как в условиях *in vitro*, так и в цельной крови, что является очень важным с медицинской точки зрения. При этом имеет место блокада способности ЛПС запускать ряд реактивных процессов в клетках иммунной системы, в том числе и освобождение цитокинов. На уровне организма подобный эффект обеспечивает его защиту от летальной дозы ЛПС.

Интересно, что структурно-гомологичный БПУ-белку острофазовый ЛПС-связывающий белок плазмы крови человека (ЛПС-связывающий белок, ЛСВ) лишен подобной активности. Он в противоположность БПУ-белку усиливает активность липополисахаридов как индукторов провоспалительных факторов.

Сочетание таких важных функциональных свойств у БПУ-белка, как блокада провоспалительного действия ЛПС и прямое бактерицидное действие на грамотрицательную микрофлору, является основанием для его клинического применения. Проведены клинические испытания на добровольцах рекомбинантной формы N-концевого фрагмента БПУ-белка (rBP123 или Neuprex); препарат оказался нетоксичным и лишенным иммуногенности. Кроме того, он эффективно подавлял ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов, реактивность нейтрофильных гранулоцитов и нежелательные проявления в системе гемостаза. В настоящее время осуществляется пробное применение в клинике rBP123 с целью снятия менингококковой эндотоксемии и последствий геморрагической травмы. Необходимо отметить то обстоятельство, что защитные свойства белка и его рекомбинантного N-фрагмента проявляются как внутри, так и вне специализированных клеток, в связи с чем он может рассматриваться как эффективное протективное средство и в парентеральном варианте применения.

Последствия электростатического взаимодействия катионного белка с поверхностными областями клеточной оболочки грамотрицательных бактерий могут быть разнонаправленными. Предположительно, имеет место конкурентное вытеснение ионов Mg и Ca из наружной мембраны. Обычно эти ионы играют важную цементирующую роль в формировании плотного слоя наружной мембраны, обогащенного липополисахаридами, путем образования поперечных солевых мостиков между его отдельными молекулами. Разрыхление липополисахаридного слоя приводит к обнажению гидрофобных областей наружной мембраны и облегчает таким образом проникновение через них липофильных молекул (например, актиномицина Д). Такая последовательность физико-химических взаимодействий белка с внешними структурами микробной клетки соответствует экспериментально установленным фактам.

По-видимому, процессу нарушения проницаемости мембран благоприятствует наличие в составе БПУ-белка структурных участков, обогащенных гидрофобными аминокислотами (в частности, пролином). Подобные белковые домены могут образовывать в липидном бислое мембран сквозные поры, наличие которых приводит к нарушению селективной проницаемости и утечке из клеток жизненно важных элементов и макромолекул. В пользу возможности существования такого характера взаимодействий в ходе поражения микробной клетки говорят данные опытов, в которых в качестве мишеней использовали бактерии с повышенной вязкостью наружной мембраны, отличающиеся от мембран контрольных штаммов увеличенной концентрацией насыщенных жирных кислот. Такие штаммы бактерий проявляли повышенную устойчивость к антимикробному действию БПУ-белка. Следовательно, сочетание в структуре рассматриваемого белка свойств поликатионной и гидрофобной молекул делает его высокоэффективным *мембранонарушающим агентом*, функционирующим в роли поверхностно-активного вещества. Одним из следствий нарушения структурной целостности оболочки бактерий является активация в ней цитолитических процессов, ведущих к последующему распаду фосфолипидов мембран и пептидогликанового скелета.

Заключительная (необратимая) стадия действия БПУ-белка сопряжена со структурной дезорганизацией внутренней (цитоплазматической) мембраны и блокадой в ней транспортных и энергетических процессов.

Активность БПУ-белка в инактивации нейтрофильными гранулоцитами млекопитающих грамотрицательных бактерий усиливается еще рядом белково-пептидных соединений, выявленных в фагоцитах. В псевдоэозинофилах кролика обнаружены два структурно родственные белка с молекулярной массой около 15 кДа. Ни один из этих белков не проявляет антибактериальных свойств, однако одна из изоформ усиливает в несколько раз эффекты ранней обратимой фазы воздействия БПУ-белка на бактерии. В то же самое время они подавляют устойчиво ингибирующую активность БПУ-белка. Оба белка проявляют ЛПС-связывающую способность и структурно гомологичны белкам CAP-18 кролика и кателину из лейкоцитов

свиньи. Наряду с этим выявлен синергизм антимикробного действия БПУ-белка человека с катепсином G и эластазой и дефенсинами.

Кооперативные взаимоотношения БПУ-белка с другими факторами антимикробной защиты, по-видимому, не ограничиваются только белками лейкоцитарного происхождения. В частности, он избирательно активирует фосфолипазы бактериальной оболочки *E. coli*, что приводит к взаимоусиливающему антимикробному действию белков. Фосфолипазы A2 из нейтрофилов, сыворотки и очагов воспаления также усиливают дозозависимым образом антимикробную активность БПУ-белка. Кроме того, переход от первой (обратимой) фазы ко второй (необратимой) заметно ускоряется в присутствии терминальных компонентов комплемента, что может рассматриваться в качестве примера кооперации различных молекулярных факторов врожденного иммунитета.

СЕРПРОЦИДИНЫ

Компонентами гранулярной антимикробной системы нейтрофилов и моноцитов/макрофагов являются сериновые протеиназы с оптимальной ферментной активностью в нейтрально-щелочной области значений pH.

Протеиназа с субстратной специфичностью, подобной *химотрипсину*, была выделена из нейтрофилов человека и ряда других животных. В настоящее время установлено, что в нейтрофилах человека содержится группа химотрипсиноподобных протеиназ, состоящих из 3–4 изозимов, которые характеризуются положительным зарядом своих молекул (pI - 11), практически идентичными аминокислотными составами и иммунохимическими свойствами. Из особенностей аминокислотного состава белка следует обратить внимание на высокую долю в нем аргинина (13–14 мол%) и дикарбоновых аминокислот (19–20 мол%), свободные карбоксильные группы которых в значительной степени амидированы. Подобный состав аминокислот определяет катионный характер белковых молекул. Молекулярные массы выделенных белков, по данным электрофореза, в присутствии додецилсульфата натрия находятся в пре-

делах 25 000–29 500 Да. Для всех белковых изоформ характерна химотрипсиноподобная ферментативная активность в отношении искусственных субстратов (например, этилового эфира бензоилтирозина) с оптимумом рН в диапазоне 7,0–7,5.

Избирательное подавление энзиматической активности рассматриваемых протеиназ α -антихимотрипсином, диизопропилфторфосфатом и фенолметилфторсульфонилем позволяет однозначно отнести их к сериновой группе протеолитических ферментов.

Вследствие отсутствия идентичности в субстратной специфичности и кинетике катализа между панкреатическим химотрипсином А, с одной стороны, и химотрипсиноподобными ферментами из нейтрофилов и селезенки человека — с другой, для последней группы белков было предложено наименование «катепсин G», которое в настоящее время общепринято.

Естественными субстратами катепсина G (КФ 3.4.21.20) являются казеин, фибрин и фибриноген, компоненты компонента (C1, C3, C4, C5), коллаген и протеогликаны. Низкая субстратная специфичность фермента определяет его важную биологическую роль в разнообразных физиологических и патофизиологических процессах организма человека и животных. Антимикробная активность катепсина G показана в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также грибов. Микробицидное действие белка существенно не зависит от его протеолитической активности, поскольку оно сохранилось при ингибировании фермента диизопропилфторфосфатом или его температурной инактивации в течение 10 мин при 60–70°C.

По-видимому, антимикробные свойства катепсина G связаны с его функционированием в качестве поверхностно-активного вещества, которое определяется в первую очередь поликативным характером его молекул. В пользу этого представления говорит зависимость бактерицидного эффекта от ионной силы инкубационной среды. При концентрации NaCl, равной 0,3 M и выше, антимикробное действие белка резко снижается. Электростатическая адсорбция катепсина G на поверхности бактерий является необходимым условием реализации антимикробных свойств белка, но не единственным. Было показано, что

полное насыщение белком поверхности *S. aureus* и *E. coli* имеет место при слабо бактерицидных концентрациях. Значит, какие-то дополнительные факторы, кроме феномена адсорбции, участвуют в реализации антимикробной активности катепсина G.

По-видимому, проникновение белка во внутренние структурные области бактерий важно для осуществления им цитотоксического действия. Существуют косвенные доказательства перитрационной способности рассматриваемого бактерицидного агента.

Во-первых, грамотрицательные бактерии, имеющие в составе своей клеточной оболочки дополнительную наружную (внешнюю) мембрану, оказываются более резистентными к действию белка по сравнению с грамположительной флорой. Так, при концентрации белка 10^{-6} М более 90% клеток *S. aureus* погибают, в то время как для равного эффекта при использовании *E. coli* в качестве мишеней необходима доза в $2,5 \times 10^{-6}$ М.

Во-вторых, воздействие катепсина G на микробы сопровождается подавлением в них синтеза белка, РНК и ДНК-молекул, образование которых осуществляется во внутренних компартаментах клеток. Наконец, катепсин G резко снижает поглощение кислорода микроорганизмами, что свидетельствует о его воздействии на структурно-функциональные взаимоотношения в области цитоплазматической мембраны. Безусловно, все наблюдаемые изменения в метаболизме бактерий свидетельствуют о подавлении их жизнеспособности, что в совокупности приводит в конечном счете к гибели микробов.

Эластаза. Другим представителем сериновых протеиназ в нейтрофилах и моноцитах/макрофагах является эластаза. Эластаза нейтрофилов (КФ 3.4.21.37) локализована в азурофильных гранулах и может освобождаться как в фагосомную вакуоль, так и во внеклеточное пространство, участвуя в многочисленных процессах, часто разнонаправленных по значению для сохранения жизнедеятельности организма. Это одноцепочечный гликопротеин с катионным характером своей молекулы (pI-9). В клетке эластаза представлена 3-4 изоформами, отличающимися по электрофоретической подвижности вследствие вариабельности в составе белкового и углеводного ком

понентов своих молекул. Эти изоформы имеют близкие значения молекулярных масс (33 000, 34 000, 36 000 Да) и аминокислотного состава. Эластазы нейтрофилов характеризуются высоким содержанием остатков аргинина и значительной степенью амидирования в них дикарбоновых аминокислот, что, в частности, определяет изоточку ферментов в щелочной области значений рН. Сравнение лейкоцитарной эластазы с панкреатической говорит в пользу умеренной степени гомологии (43%) их первичных структур. Оптимум ферментативного действия белка находится в диапазоне рН 8–9. Так же, как и катепсин G, эластаза ингибируется диизопропилфторфосфатом и относится к группе сериновых протеиназ. Фермент обладает широкой специфичностью по отношению к белковым субстратам, он расщепляет эластин, коллаген, фибрин и фибриноген, компоненты комплемента (C3, C5), кининогены, гемоглобин и протеогликаны. В настоящее время полностью определена первичная структура эластазы нейтрофилов человека.

Эластаза относится к группе антимикробных факторов нейтрофилов со слабой бактерицидной активностью. Считается, что ее роль сводится к способности вызывать инициальные сублеточные изменения в структуре клеточных оболочек бактерий, которые повышают чувствительность последних к воздействию МПО-системы, катепсина G и БПУ-белка.

Показана переваривающая активность эластазы в отношении некоторых белков наружной мембраны *E. coli* и *Acinetobacter 199A*. Разрушение этих бактериальных белков не приводит к летальному исходу, но существенно облегчает доступ в клетку других антимикробных агентов. Кооперативные взаимоотношения отдельных факторов нейтрофилов в процессе фагоцитоза обеспечивают эффекты поражения микроорганизмов. В настоящее время продемонстрировано взаимоусиливающее антимикробное действие эластазы и МПО-системы, эластазы и катепсина G, эластазы и лизоцима, катепсина G и лизоцима.

Аууроцидин, известный также как CAP37, является катионным антимикробным белком, выявленным в азурофильных гранулах нейтральных гранулоцитов, который избирательно активен в отношении грамотрицательных бактерий, что функционально роднит его с БПУ-белком. Он, как и все представители

группы серпроцидинов, является гликопротеином с тремя потенциальными сайтами гликозилирования. Сравнение первичной структуры белка со структурой эластазы из НГ выявило высокую степень гомологии между ними. Однако в азуроцидине в областях молекулы, обычно формирующих активный центр сериновых протеиназ, имеют место замены гистидина на сериан и серина на глицин, которые лишили этот белок энзиматической активности, но способствовали сохранению его бактерицидных свойств. Азуроцидин иммунохимически выявлен и в моноцитах человека, из которых он исчезает подобно другому гранулярному белку — миелопероксидазе в процессе дифференцировки в макрофаги. В кооперации с эластазой и катепсином G он инактивирует бактерии ротовой полости. В отличие от дефенсинов человека, которые проявляют оптимальную антимикробную активность в отношении активно размножающихся и растущих культур при нейтральных значениях pH, азуроцидин активнее действует при закислении среды, независимо от фазы развития и уровня метаболизма клеток-мишеней. Механизм антимикробного действия азуроцидина изучен недостаточно, хотя есть основания предполагать, что летальные для микроорганизмов последствия связаны с воздействием белка на их цитоплазматическую мембрану.

Ген азуроцидина клонирован и секвенирован. По-видимому, белок синтезируется в НГ в форме препроазуроцидина, включающего 19 аминокислот сигнального пептида и 7 остатков прочасти. Гены азуроцидина, протеиназы-3 (PR-3) и эластазы локализованы в хромосоме 19 pter, что свидетельствует как об определенной сопряженности в функционировании этих белков, так и об их общем молекулярно-генетическом происхождении. Протеиназа-3 азурофильных гранул НГ человека структурно гомологична эластазе.

Катепсин G, эластаза, протеиназа-3 (PR-3) и азуроцидин на основе гомологичности первичной структуры и проявляемой ими антимикробной активности объединены в единую структурно-функциональную группу белков, получивших название серпроцидины. Все они являются гликопротеинами с молекулярной массой в пределах 25–29 кДа и содержатся в нейтрофилах человека в относительно заметном количестве: катепсин

G — 2,5 мг/10⁹ клеток, азуроцидин — 2, эластаза — 1,5, протеиназа-3 — 1 мг/10⁹. Наиболее активным в антимикробном отношении представителем этой группы белков является катепсин G, наиболее слабым — эластаза и протеиназа-3, причем их микробцидность в условиях *in vitro* превышает даже таковую дефенсинов человека. Необходимо подчеркнуть, однако, относительность этих данных по антимикробной активности сравниваемых веществ, поскольку в условиях фаголизосом и очагов воспаления много факторов влияют на ее проявление. Например, в клетках, тканях и жидких средах присутствуют многократно избыточные количества ингибиторов сериновых протеиназ (серпины), подавляющих естественно их ферментативную активность, хотя известно, что антимикробное действие катепсина G в значительной степени не зависит от его ферментативной активности, тем не менее высокое сродство ингибиторов к энзиму может лишать его способности к адсорбции на поверхности клеток-мишеней. Этот вопрос требует дальнейшего изучения с целью оценки реального вклада серпроцидинов в антимикробный потенциал нейтрофильных гранулоцитов. Серпроцидины структурно родственны эффекторным молекулам цитотоксических Т-лимфоцитов — гранзимам (гранулярным энзимам), которые ответственны, наряду с перфоридами и, возможно, дефенсидами за киллерную активность клеток, функционирующих уже в рамках приобретенного иммунитета.

Серпроцидины в условиях *in vitro* активны в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, низших грибов, простейших и клеток высших эукариот. Эти эффекты подавляются умеренными концентрациями NaCl (0,1–0,2 М), дивалентными катионами (Ca²⁺, Mg²⁺) и сывороткой, что свидетельствует о количественном сходстве механизмов их антимикробного действия и ряда других антибиотических факторов лейкоцитарного происхождения (дефенсины, лактоферрины и т. д.).

Интересно, что, как и в случае с лактоферрином, некоторые пептиды, высвобождаемые путем ограниченного протеолиза катепсина G (пептид 1–5 и пептид 77–83), обладают широкой антимикробной активностью. В какой степени значим вклад подобных пептидов в формирование антимикробной резистентности на уровне очагов воспаления, говорить пока затруднительно.

Скорее всего, в процессах фагоцитоза и воспаления играют более важную физиологическую роль другие функциональные проявления серпроцидинов. В частности, в низких (пМ) концентрациях азуроцидин является хемоаттрактантом моноцитов. Катепсин G и эластаза НГ аутокринным способом активируют продукцию супероксиданиона клетками. Они облегчают также миграцию НГ из крови в ткани, осуществляя протеолиз компонентов базальной пластинки и межклеточных контактов. Серпроцидин PR-3 способствует процессу агрегации и дегрануляции тромбоцитов. А комплекс катепсинов G с α 1-антихимотрипсином стимулирует продукцию цитокинов. Возможная регулирующая роль серпроцидинов в ряде гуморально-клеточных взаимодействий, определяющих эффективность процессов фагоцитоза и воспаления, является в настоящее время предметом многих исследований.

ЛИЗОЦИМ

Лизоцим (синонимы: мурамидаза, мукопептидгликогидролаза) — один из составных компонентов гранулярной антимикробной системы нейтрофилов человека и животных. Со времени открытия фермента Флемингом в 1922 г. осуществлено всестороннее изучение его структур и антимикробных свойств. Лизоцимы большинства изученных объектов, в том числе молока и нейтрофилов человека, являются катионными белками с высокой изоэлектрической точкой ($p > 10$) и низкой молекулярной массой (~15 000 Да). Общепринятым критерием при отнесении того или иного фермента к классу лизоцимов (КФ 3.2.1.17) является его способность лизировать *in vitro* суспензию клеток чувствительного штамма *Micrococcus lysodecticus*. Бактериолитическая активность лизоцимов лежит в основе метода их идентификации и количественного определения в клетках и жидкостях организма.

Субстратом ферментативного действия лизоцима является гликановый (мукополисахаридный) компонент пептидогликанового комплекса (гликопептида, муреина) клеточной стенки бактерий. Лизоцим гидролизует 1,4 β -связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамином, depo-

лимеризуя таким способом один из ведущих компонентов оболочки бактерий. При определенных условиях лизоцим может осуществлять полное растворение пептидогликанового слоя, превращая бактериальные клетки в сферопласты, которые лизируют вследствие разрыва цитоплазматической мембраны, не выдерживающей высокого осмотического давления.

При испытании в условиях *in vitro* фермент не способен лизировать грамотрицательные бактерии, так как наружная мембрана последних является для белка непреодолимой преградой.

Резистентны к его действию и многие грамположительные микробы вследствие ацетилирования гидроксильных групп гликанов, делающих их «плохим» субстратом для лизоцима. В соответствующих условиях потенциальная бактериологическая активность лизоцима реализуется благодаря присутствию в гранулах нейтрофилов других антимикробных факторов, осуществляющих нарушение структурной целостности клеточной стенки и облегчающих таким образом доступ белка к пептидогликановому слою.

Соединениями, повышающими чувствительность бактерий к действию лизоцима, могут быть дефенсины, БПУ-белок, сериновые протеиназы и МПО-система, которые в процессе дегрануляции оказываются локализованными в фаголизосомах. Предварительная незначительная по времени обработка грамотрицательных бактерий *Acinetobacter 199A* катепсином G, эластазой или лактопероксидазной системой делает исходно резистентные клетки чувствительными к воздействию лизоцима. По-видимому, подобные синергические антимикробные взаимодействия имеют место в условиях фаголизосом нейтрофилов. Есть основания предполагать, что лизоцим включается в цепь реакций, осуществляющих переваривание микробов, после того как действие более эффективных бактерицидных белков приводит к нарушению структурно-функциональной целостности клеточной стенки микроорганизмов.

В свете рассмотренных данных об антимикробной функции лизоцима представляются неожиданными сведения об отсутствии фермента в гранулах нейтрофилов коров, коз, овец, кошек, хомяков и некоторых обезьян. Они ставят под сомнение

важную роль лизоцима в защите микроорганизмов от бактериальной инфекции. Однако можно предположить, что ферменты, сходные с лизоцимом по биологической функции, но несколько отличающиеся от него по субстратной специфичности, присутствуют в нейтрофилах этих видов животных. Совершенствование и разработка новых методов идентификации эндогликозидаз (в частности, лизоцима) позволят в перспективе решить эту проблему.

РЕАКЦИИ ЛИМФОИДНОЙ СИСТЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С СИНТЕЗОМ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ, ПОВЫШЕННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ ЗАМЕДЛЕННОГО И НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТЬЮ

При попадании в организм антигена происходит захват его макрофагами и ретикулярными клетками. *Макрофаги* не имеют рецепторов для распознавания антигенов и не обладают памятью. Тем не менее, они участвуют в иммунном ответе как фагоциты. В макрофагах антиген подвергается обработке лизосомальными ферментами, и антигенная информация в виде фрагментов (комплекс РНК с антигеном) передается иммунокомпетентным клеткам. Предшественники иммунокомпетентных клеток (лейкоцитов и лимфоцитов) продуцируются в костном мозге. Затем часть таких клеток попадает в вилочковую железу (тимус) и после этого расселяется в периферических органах иммунной системы. Путем последовательных клеточных делений образуется популяция клона *T-лимфоцитов*, которые в свою очередь дифференцируются в *T-хелперы* (помощники), *T-киллеры* (эффекторы иммунных реакций) и *T-супрессоры*. Другая часть стволовых клеток порождает предшественников лимфоцитов, которые, проходя через лимфоэпителиальный орган, трансформируются в *B-лимфоциты*. Часть стволовых клеток, находясь в костном мозге, переформируется в зрелые лейкоциты. Эти популяции лимфоцитов выполняют определенные функции. Например, *T-хелперы* вступают во взаимодействие с антигеном и способствуют трансформа-

ции В-клеток в плазмодиты. Т-киллеры являются клетками-эффекторами клеточного иммунитета. Они уничтожают клетки, изменившие свою генетическую структуру вследствие мутаций или поражения антигеном. Т-супрессоры тормозят чрезмерную чувствительность иммунной системы. В-лимфоциты — это клетки-предшественники плазматических клеток, являющихся основными продуцентами *иммуноглобулинов*.

В процессе иммуногенеза осуществляется взаимодействие нескольких типов клеток лимфомиелоидной системы: макрофагов, клеток-предшественников (лимфоцитов). Механизм клеточного взаимодействия при первичной встрече на повторное действие антигена, видимо, проявляется по-разному. Кроме того, имеет значение доза антигена. В результате этого взаимодействия появляются популяции лимфоцитов-эффекторов иммунитета, принимающих участие в *повышенной чувствительности замедленного типа* (ПЧЗТ), популяции В-лимфоцитов, которые трансформируются в плазматические клетки, продуцирующие иммуноглобулины (антитела). Появление иммуноглобулинов наблюдается через 5–7 дней после введения антигена, затем происходит их накопление с последующей стабилизацией их количества. Спустя определенное время количество иммуноглобулинов снижается, и через год их может вообще не быть в сыворотке. Однако животное сохраняет способность к вторичной реакции антителообразования, если оно вновь подвергается действию того же антигена.

Основное место обнаружения иммуноглобулинов — кровь. Но они могут находиться также в лимфе, воспалительном экссудате, в молоке. Продолжительность пребывания антител в организме и их количество зависят от таких факторов, как состояние организма, природа и количество (доза) антигена. Способность клеток определенным образом реагировать синтезом антител в определенном количестве обусловлена наследственностью. Один и тот же антиген у животного одного генотипа вызывает сильную реакцию антителообразования, у другого слабую.

Антигены вызывают синтез иммуноглобулинов, относящихся к различным классам. Классы иммуноглобулинов обозначаются как IgM, IgG, IgA, IgD и IgE отличаются по своим

химическим и биологическим свойствам. Антитела класса IgM отличаются способностью к агглютинации, гемолизу и бактериолизу, опсонизации. Они первые участвуют в иммунном ответе. IgG-антитела оказывают сильное нейтрализующее действие на токсины и вирусы, способны к преципитации и мало участвуют в цитолизе. IgA относятся к сывороточным антителам, их обнаруживают в высоких концентрациях в выделениях некоторых клеток организма: в слюне, молозиве, слезной жидкости, цервикальной и влагалищной слизи. IgE, называемые реагинами, считаются аллергическими.

Имуноглобулины отличаются друг от друга по способности проходить через слой тканей, что зависит от их молекулярного строения. Реакция лимфоидной системы в зависимости от природы и дозы антигена может проявляться в виде гиперчувствительности, которая имеет разные формы проявления и является в основе своей защитной. При попадании в организм микроорганизмов (антигенов — клеток или веществ, несущих на своей поверхности признаки генетически чужеродной информации) в лимфоидных органах возникают специфические изменения. Имунокомпетентные клетки лимфоидных органов (прежде всего Т-лимфоциты) претерпевают определенные изменения и приобретают способность соединяться с антигеном. Развивается гиперчувствительность замедленного типа (ГЧЗТ), при которой чужеродное вещество не уничтожается, а ограничивается барьерной функцией реактивной ткани. Это первая стадия специфической иммунологической перестройки организма. После нее наступает более совершенная форма иммунного реагирования, при которой резорбция и выведение из организма антигена сопровождаются синтезом иммуноглобулинов.

Важной формой защитной реакции является развитие *иммунологической толерантности*. Чужеродный агент при этом сохраняется в организме, однако не локализуется и нейтрализуется, а распространяется по всему организму, в результате отсутствия реакции на него клеток и тканей. Толерантность — это специфическая ареактивность организма в результате предшествующего контакта с антигеном.

При рассмотрении названных форм проявления иммунных реакций во взаимосвязи можно обнаружить, что повышенная

чувствительность замедленного типа представляет собой первую фазу, предшествующую антителообразованию. Иммунологическую толерантность следует считать парадоксальной фазой иммуногенеза, которая сменяет фазу антителообразования в случае повышенной для организма антигенной нагрузки. Указанная последовательность фаз иммунного ответа характеризует эволюционно сложившиеся зависимости. В процессе филогенеза повышенная чувствительность замедленного типа была одной из наиболее ранних форм иммунного реагирования, затем появилась способность к антителообразованию и иммунологическая толерантность.

Для любой реакции существует некий порог. При введении животному небольших количеств антигена возникает ГЧЗТ с местной реакцией ткани. Введение большого количества антигена индуцирует образование антител. Дальнейшее увеличение антигенной стимуляции обуславливает деструктивные процессы, приводящие к толерантности и параличу иммунной системы.

РЕАКЦИЯ АНТИГЕН–АНТИТЕЛО

Антитела, образовавшиеся в ответ на действие антигена, обладают способностью вступать с ним в специфическую связь в организме животного. Защитное действие антител выражается в прямом повреждении микроорганизмов, нейтрализации синтезируемых ими токсинов или изменении (опсонизации) поверхности микробной клетки таким образом, что она становится более привлекательной для фагоцитов, поглощающих ее. В большинстве случаев антитела, действуя на патогенный микроорганизм, как бы фиксируют бактерии, и образовавшийся комплекс активирует ряд других защитных механизмов. После того как антитело связалось с антигеном, фагоциты пожирают образовавшийся комплекс и разрушают его.

Важную роль в реакциях антиген–антитело выполняет *комплемент*. Он способен разрушать большинство антигенов, с которыми уже связалось антитело. Комплемент, действуя на комплекс антиген–антитело, лизирует клеточные стенки бактерий. Кроме того, комплемент усиливает активность фагоцитов, образование гистаминоподобных веществ, влияющих на

развитие воспалительной реакции. Результатом взаимодействия антигена и антитела является лизис или коагуляция антигена. *Лизис* — результат действия растворяющих антител (бактериолизин, цитолизин, гемолизин). *Коагуляция* обеспечивает склеивание микробных тел или осаждение белков антигена (агглютинины, преципитины). Реакция нейтрализации обусловлена действием нейтрализующих антител (антитоксины, вируснейтрализующие антитела, антиферменты). Образующийся комплекс антигена с антителом в течение определенного времени может находиться в организме животного и оказывать на него вредное действие. Комплекс антиген-антитело является для организма антигеном, и на него тоже образуются антитела.

ПРИБРЕТЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ

Приобретенная устойчивость к определенному заболеванию в основном связана с присутствием в крови и тканях антител, образовавшихся в организме ранее, — либо после естественного заражения и переболевания, либо в ответ на введение антигенов. В основе этой устойчивости лежит способность организма по-разному, количественно и качественно, реагировать на поступление антигена в зависимости от того, воздействовал данный антиген однажды или нет. Связана эта устойчивость с В- и Т-лимфоцитами — клетками, обеспечивающими иммунологическую память. Кроме того, основной приобретенной устойчивости является вторичная реакция антителообразования (анамнестическая реакция). Через несколько часов после повторного введения антигена в организм появляется большое количество антител в отличие от реакции антителообразования первичного типа, при которой образование антител происходит сравнительно медленно и в меньшем количестве. Клетки организма приобрели определенный опыт и при повторном заражении значительно быстрее образуют антитела данного типа. Приобретенная устойчивость может быть активной и пассивной.

Активная устойчивость продолжительна по времени, в ее создании участвует сам организм в результате естественного течения заболевания, переболевания. Последующее заражение не вызывает заболевания в связи с тем, что антитела, образовавшиеся после переболевания, защищают организм при повторном заражении. Активная устойчивость может создаваться в

организме искусственным путем, т. е. вакцинацией определенными антигенами.

Пассивная устойчивость также связана с антителами, однако организм животного сам их не синтезирует. Эта устойчивость менее продолжительна по времени, чем активная. Пассивная устойчивость может быть естественной и искусственной. Естественная пассивная устойчивость обусловлена прохождением антител из организма матери в организм плода плацентарно или передачей их через молозиво в первые часы после рождения. Искусственная пассивная устойчивость создается введением сыворотки, содержащей готовые антитела (иммунные сыворотки). Их получают от животных, которым в течение нескольких недель вводят антиген, стимулирующий образование антител. Пассивную устойчивость создают введением иммунных сывороток с профилактической и лечебной целью.

Приобретенная устойчивость может быть связана с повышением чувствительности клеток и тканей организма при повторном введении антигена. Реакции повышенной чувствительности организма или его отдельных систем могут протекать патологически и связаны с присутствием антител (IgE) или сенсибилизированных лимфоцитов. Эти реакции получили название аллергии и могут быть немедленного и замедленного типа. В роли сенсибилизирующих антигенов выступают полные антигены, а также низкомолекулярные соединения (гаптены), которые при соединении с белком превращаются в полные антигены.

Реакции замедленного типа возникают через несколько часов или дней после повторного введения антигена и сопровождаются поражением любой ткани. Аллергические замедленные реакции осуществляются не антителами, а иммунными клетками тимусзависимых популяций. Т-лимфоциты-киллеры способны вызывать цитотоксическое повреждение своих антигенных «клеток-мишеней», при этом они высвобождают многие вещества — медиаторы аллергии замедленного типа. Аллергии замедленного типа в значительной степени повышают эффективность защитных механизмов, обусловленных антителами и фагоцитозом. Благодаря аллергии, антиген сразу же связывается с теми тканями, с которыми он прежде всего вступает в контакт, и, хотя антиген способен вызвать некроз на месте связывания,

по всему организму он не распространяется. В данном случае проявляется локализирующая тенденция в отношении патогена, хотя сама реакция оказывает на организм вредное влияние.

Повреждающее действие защитных по сути аллергических реакций заключается в том, что они, как правило, являются избыточными и поэтому избавляют организм от попавшей вредности ценою болезни. Повышенная чувствительность замедленного типа представляет собой пример, показывающий возможность создания устойчивости в целостном организме путем повышения чувствительности отдельных его клеток и тканей. Состояние повышенной чувствительности отдельных клеток и тканей организма и состояние устойчивости существуют в одном и том же организме, в их основе лежат одни и те же механизмы. Возникают они в результате приспособлений организма, направленных на уничтожение и удаление попавшей вредности. В зависимости от условий взаимодействия с внутренней средой организма каждая из этих реакций может оказывать как защитное, так и повреждающее действие.

Защита организма против микробов и их токсинов имеет комплексное происхождение и обусловлена механизмами наследственной и приобретенной устойчивости. Механизмы наследственной устойчивости сохранились у высших организмов наряду с появлением и совершенствованием механизмов приобретенной устойчивости. При попадании в организм антигена наследственные факторы включаются первыми в их обезвреживание, составляют сущность изначальных этапов иммунного ответа, необходимого для полноценного развития механизмов приобретенной устойчивости. Функция защитных реакций, появляющихся в процессе индивидуального развития, является продолжением и развитием реакций, выработанных в процессе эволюционного развития вида. Комплекс видовых наследственных признаков, обуславливающих устойчивость, становится исходным пунктом следующего этапа, именно устойчивости, приобретаемой в ходе индивидуальной жизни организма. Эта устойчивость формируется в процессе взаимодействия особи с окружающей средой и нередко обеспечивается глубокими структурными изменениями организма. Такие приобретенные в ходе жизни изменения не передаются по наследству, они

наслаиваются на наследственные свойства организма и в совокупности с ними формируют его фенотип.

Система защиты, определяющая способность организма противостоять воздействию патогенных микроорганизмов, связана с генетическим гомеостазом. Это значит, что защитные свойства организма зависят от его анатомо-морфологических и физиолого-биохимических особенностей и защитные реакции проявляются у различных животных по-разному, т. е. имеют определенную специфичность. Известно, что генетически обусловленный биохимизм одной особи существенно отличается по сравнению с другой. Практически нет особей, кроме однойяйцевых близнецов, с одинаковыми (идентичными) анатомо-морфологическими и физиологическими свойствами. Специфичность в проявлении защитных реакций обусловлена не только наследственной гетерогенностью особей, но и антигенными и биохимическими особенностями патогенного организма. Таким образом, характер защитных реакций зависит, с одной стороны, от макроорганизма, с другой — от микроорганизма и его биологических особенностей. Универсального механизма невосприимчивости и освобождения организма от микробов существовать не может.

Поскольку наследственная гетерогенность носит не только межвидовой, но и индивидуальный характер, она сама выступает как важная защитная система. Микроорганизм при переходе от одной особи к другой постоянно сталкивается с новым для него биохимизмом индивида. Анатомо-морфологические и физиолого-биохимические особенности различных видов, пород животных и даже индивидуумов определяют условия, подходящие для развития лишь очень ограниченного числа видов бактерий. Среди большого количества видов микробов, в том числе и патогенных, происходит селекция, так как многие из них не могут существовать в организме. Видовые, породные и индивидуальные различия обуславливают и различную восприимчивость к заражению и заболеванию. Один и тот же возбудитель не находит одинаковых условий в организме различных пород или индивидуумов даже одного и того же вида животных.

Изучение физиологического, биохимического и иммунобиологического статуса животных различных видов и пород с уче-

гом наследственной устойчивости к микробам может помочь найти новые пути искусственного создания устойчивости. Вещество, проникшее во внутреннюю среду организма и нарушившее ее постоянство (гомеостаз), вызывает ряд рефлекторных реакций. Таким образом, нервной системе и ее центральному отделу принадлежит важная роль в поддержании гомеостаза: реагируя на различные изменения внешней и внутренней среды, она так регулирует деятельность органов и систем, что предупреждаются и выравниваются сдвиги и нарушения, которые происходят или могли бы произойти в организме. Можно полагать, что образование антител, так же как и общие защитно-адаптационные реакции, регулируются гипоталамо-гипофизо-адреналокортикоидной системой.

Установлено, что в защитных реакциях принимают участие два антагонистически действующих гормона — кортизон (гидрокортизон) и соматотропный гормон. Кортизон, вырабатываемый корой надпочечников, является противовоспалительным фактором. Он снижает защитно-воспалительную реакцию и угнетает продукцию антител плазматическими клетками. Интенсивность выделения корой надпочечников гидрокортизона находится в зависимости от функции гипофиза и гипоталамических центров головного мозга. Соматотропный гормон или гормон роста, продуцируемый передней долей гипофиза, в отличие от кортизона, активизирует воспалительный процесс, усиливает активность плазматических клеток, т. е. клеток, продуцирующих антитела. Эти примеры свидетельствуют о том, что молекулярные, клеточные и общепфизиологические факторы иммунитета создают единый, гармоничный механизм защиты организма от бактерий, токсинов и других чужеродных агентов.

ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ ЗАЩИТНЫХ СИЛ ОРГАНИЗМА

Повышение защитных сил организма животных составляет важную проблему, над которой в настоящее время работают биологи и ветеринарные врачи. Ветеринарии удалось достичь в этом направлении многого. Однако наибольшие результаты получены благодаря искусственной активной

иммунизации животных вакцинами против многих вирусных и бактериальных инфекций. Под действием чужеродного агента, попадающего в организм, а таковыми в данном случае являются вакцины, происходит прежде всего перестройка клеток, сопровождающаяся продукцией ими антител. Поступление в организм ослабленных вирусов приводит, кроме того, и к появлению интерферона. Синтезированные клетками специфические гамма-глобулины — антитела — начинают осуществлять содружественную с ними, а также и с другими механизмами защитную функцию. Однако общефизиологические механизмы защиты являются фундаментом для создания иммунитета к инфекционным заболеваниям, независимо от применения вакцин, сывороток, антибиотиков, проявляющих свое противомикробное действие. Хотя медицинская и ветеринарная наука и практика достигли в настоящее время больших успехов, искоренив многие инфекционные заболевания и разработав методы предохранительных прививок, все же некоторые из этих болезней пока еще не удалось полностью ликвидировать. Эффективность прививочного иммунитета, созданного великим достижением человеческого гения, зависит от высокой сопротивляемости организма и нормальной деятельности всех его органов и систем.

Прочной базой для высокого естественного сопротивления и устойчивости являются совершенные методы содержания животных — уход, кормление, эксплуатация и прочее. Здоровое животное, находящееся в благоприятных условиях, быстро реагирует на ухудшение условий и стремится устранить или смягчить их влияние. Достижением физиологии, биохимии, патофизиологии и других наук за последние годы явилось получение неоспоримых доказательств того, что отклонение в доставке белка, аминокислот, солей, витаминов, микроэлементов, воды и других компонентов пищи приводит к задержке роста, развития, способности к воспроизводству, к снижению продуктивности и ослаблению устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды и инфекционным началам.

В повседневной практике животноводства необходимо оберегать животных и создавать такие условия содержания, полноценные кормовые рационы, которые помогают животному экономнее расходовать свои защитные силы, что особенно важ-

но для молодняка. С другой стороны, не следует слишком изнеживать молодых животных. Изнеженные животные заболевают в первую очередь. Поэтому приучение к прогулкам создает дополнительный резерв естественной устойчивости. При недостатке солнечных лучей полезно облучение животных специальными ультрафиолетовыми лампами. Перегревание или переоблучение может иметь нежелательные последствия. При первой возможности необходимо широко использовать зеленые корма, богатые витаминами, воду, чистый воздух и солнечные лучи.

КОЛОСТРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ, ФАКТОРЫ ЕГО ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ И КОРРЕКТИРУЮЩИЕ

В молочной железе в период, предшествующий родам, происходят интенсивные иммунобиологические процессы. В первичном молочном секрете, полученном за 5–12 сут. до родов, содержалось значительно больше иммунологических факторов (Т-, В-лимфоцитов, иммуноглобулинов; лизоцима; естественных антител), чем в молозиве, взятом от животных сразу после родов. Имеются сведения о важной роли клеточных и неклеточных элементов внутридольковой соединительной ткани в период дифференцировки и инволюции молочной железы у лабораторных животных. Важно отметить, что подавление деятельности регионарного лимфатического узла (источника лимфоидных клеток) существенно нарушает морфологические процессы и подавляет развитие структуры альвеолы. Закономерности формирования структурной организации альвеолярного отдела молочной железы наиболее демонстративно проявляются при анализе клеточного состава молока. Эффект «очищения» полости протоков и альвеол немедленно проявляется в появлении в составе секрета значительного количества соматических клеток и их обломков. Миграция в полость альвеол лимфоидных клеток отражает их активную роль в организации деструктивных процессов.

Поэтому своеобразие состава молозива и его отличие от зрелого молока определяются *интенсивностью аутоиммунных процессов*. При оценке клеточного состава молозива в первый

день после родов можно судить о полноценности иммунобиологических процессов, предшествующих началу лактационного периода. Высокое содержание в молозиве клеток лимфоидной природы (макрофагов, нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов) и наличие признаков их активации (образование агрегатов из 3 и более клеток) позволяет говорить о высокой эффективности аутоиммунных процессов подготовки молочной железы к лактационному периоду. Слабость иммунной системы или отвлечение резервов иммунной системы на борьбу с другими антигенами приводит к нарушению предлактационной подготовки органа и последующей гипогалактии.

Высокая информативная ценность цитологического анализа молозива может быть использована при разработке способа ранней диагностики гипогалактии, позволяющем прогнозировать течение лактации. Гипогалактия выявляется в первые сутки после родов на основании цитологического анализа молозива. При этом отмечается: отсутствие агрегации лейкоцитов и низкое содержание лимфоидных клеток и малые значения цитохимического индекса по миелопероксидазе и щелочной фосфатазе лейкоцитов. Представленные показатели служат характерным признаком нарушения развития молочной железы и будущей низкой молочной продуктивности.

Молозиво выделяется в первые 5–7 дней лактации и существенно отличается от зрелого молока (табл. 1). Установлено, что молозиво имеет желтовато-белый или слегка розовый оттенок, солоноватый вкус и слабокислую реакцию. Вязкость молозива больше, чем молока. Его удельный вес 1,040–1,080. В состав молозива входят вода, жир, белки, молочный сахар, фосфатиды, минеральные вещества, газы, витамины, ферменты, гормоны и другие вещества. В молозиве белков и минеральных солей больше, чем в молоке.

Молозиво имеет высокую биологическую ценность и калорийность — оно является незаменимой пищей для новорожденных. В молозиве коровы содержится в два раза больше сухих веществ, чем в молоке. Общее содержание белков в молозиве в 1–5 раз больше, чем в молоке, а альбуминов и глобулинов — в 20–25 раз. Минеральных солей в молозиве содержится в 1,5 раза больше, чем в молоке. Значительно в этот период и содержание

Таблица 1

Химический состав молозива и молока в первые 11 дней после отела

Дни после отела	Сухой остаток	Жир	Казеин	Альбумин и глобулин	Сахар	Зола
1	24,58	5,4	2,68	12,4	3,31	1,20
2	22,00	5,0	3,65	8,14	3,77	0,93
3	14,55	4,0	2,22	3,02	3,77	0,82
4	12,76	3,4	2,88	1,80	4,46	0,85
5	13,02	4,6	2,47	0,97	3,88	0,81
6	12,06	3,4	2,48	0,75	3,97	0,80
7	13,12	4,1	2,94	0,62	4,49	0,77
8	12,48	3,3	2,67	0,58	4,89	0,80
9	12,65	3,3	2,78	0,63	4,89	0,79
10	12,53	3,4	2,61	0,69	4,74	0,79
11	12,53	3,4	2,72	0,62	4,74	0,75

млягия, который, обладая послабляющим действием, способствует активации перистальтики кишечника новорожденных и освобождению их от первородного кала (мекония). Белки молозива по своему аминокислотному составу являются даже более полноценными, чем молочные. Вместе с этим в составе молозива новорожденные животные получают *иммуноглобулины*, которые способны всасываться в кишечнике, не разрушаясь. Таким образом, за счет иммунитета, сформированного в организме матери в ходе пассивной иммунизации, детеныш приобретает свой собственный физиологический иммунитет, позволяющий ему в начальном периоде своей жизни защищаться от патогенной микрофлоры. Наряду с иммуноглобулинами молозиво содержит *лизоцим*, оказывающий свое антибактериальное действие.

На протяжении молозивного периода в секрете молочной железы поддерживается высокое содержание *нейтрофилов*, обладающих мощным цитотоксическим действием и способных эффективно фагоцитировать обломки клеток, инородные частицы и микроорганизмы. Удаляемые из молочной железы отмирающие клетки эпителия альвеол и протоков фагоцитируются

макрофагами, а присутствующие в молозиве эозинофилы уменьшают проявления иммунных реакций, нейтрализуя гистамин и кинины. Базофильные лейкоциты наряду со своей способностью к фагоцитозу могут выделять физиологически активные вещества — гепарин и гистамин, обладающие сосудорасширяющим действием. После завершения молозивного периода количество клеток в молоке снижается, и они вновь появляются лишь в конце лактационного и в начале сухостойного периода, когда инволюция железистой паренхимы проходит с использованием подвижных и оседлых макрофагов и место альвеолярной ткани занимает жировая ткань.

В настоящее время развивается теория о передаче и формировании иммунитета у детеныша с помощью и под контролем иммунной системы матери. При этом передача клеток иммунной системы (нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов, тканевых макрофагов) осуществляется посредством молозива. Установлено, что у коров непосредственно перед лактацией имеет место снижение уровня белка в крови и количества некоторых классов лейкоцитов, причем ряд авторов отмечает, что снижение общего белка крови, лейкоцитов и нейтрофилов в молозивный период обусловлено поступлением их в молочную железу и использованием на синтез белков молозива. Число соматических клеток в молозиве возрастает в 10 раз. В сыворотке молока в этот период общее содержание белка увеличивается в 2 раза, возрастает количество иммуноглобулинов и протеозопептонной фракции белка. Повышение количества лейкоцитов крови с одновременной нейтрофилопенией обусловлено поступлением их в молочную железу, причем в секрете число нейтрофилов достигает 60%. Возрастание моноцитов крови при молозивном периоде вызывает увеличение макрофагов в секрете молочной железы. Увеличение количества иммуноглобулинов сыворотки молока в молозивный период при запуске и при мастите коррелирует с появлением в молоке плазматических клеток, что указывает на синтез иммуноглобулинов в молочной железе.

За 3 дня до отела и в первый день после него отмечается существенное снижение, а затем постоянное до 21-го дня лактации увеличение жизнеспособности лейкоцитов. Были выяв-

лены существенные отклонения в числе жизнеспособных лейкоцитов молозива, выделенных в один и тот же день из разных четвертей того же вымени. Возможность проникновения иммунокомпетентных клеток молозива в кровотоки детенышей доказывается при использовании естественной метки клеток самок — полового хроматина. Метод основан на исследовании структурного образования в ядрах клеток — X-хроматина. Этот половой хроматин обнаруживается в ядерных клетках у самок, в клетках самцов его нет. Естественно, что меченые по половому хроматину лейкоциты искали у новорожденных мужского пола. Обнаружение меченных таким образом клеток в кишечной стенке и кровеносном русле детеныша говорит о попадании их с молозивом. Содержание их приблизительно составляет 25% в крови, 1% в лимфе и около 70% в кишечнике. Несомненно, что лейкоциты молозива имеют исключительное значение в создании *местного и общего иммунитета у новорожденных животных*. Известны факты, доказывающие, что после приема молозива число лейкоцитов в крови новорожденных животных увеличивается преимущественно за счет лимфоцитов тимусного происхождения. Лимфатическая система детеныша проводит своеобразную подготовку лимфоидной ткани к приему иммунной информации.

Имуноглобулины — основной фактор защиты в ранний постнатальный период. У новорожденных телят в крови отсутствуют или находятся в очень малом количестве. Плацента коров построена так, что из крови плоду не передаются крупномолекулярные гамма-глобулины, обладающие защитными функциями от различных чужеродных веществ и микроорганизмов. У всех телят при рождении наблюдается гипогаммаглобулинемия. Рождение телят с относительно высоким содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови следует рассматривать как патологию. Неспецифические защитные факторы, такие как комплемент, лизоцим, пропердин и некоторые другие синтезируются организмом новорожденных, но в меньшем количестве, чем у взрослых животных. Значительно слабее у них выражена и фагоцитарная активность, хотя система фагоцитоза развита достаточно хорошо. После приема молозива фагоцитоз у новорожденных значительно активизируется за счет

опсонизации возбудителей гуморальными факторами иммунной защиты.

Для защиты молодого организма в период созревания иммунной системы ему требуются материнские антитела, которые создают основу пассивного (колострального) иммунитета. Их он получает с молозивом матери. Имеются данные о высокой корреляционной зависимости между концентрацией иммуноглобулинов в материнском молозиве и содержанием иммуноглобулинов в сыворотке крови новорожденных телят. Она составляет +0,89. Полученные новорожденными животными колостральным путем материнские иммуноглобулины представляют собой антитела к антигенам, встречающимся в окружающей среде и возникшим эндогенно, а также к антигенам, которыми иммунизировались матери. Пока молодняк содержится в той же среде, что и мать, он защищен от инфекционных и токсических агентов. Интенсивность усвоения иммуноглобулинов, а следовательно, и напряженность колострального иммунитета зависят от многих факторов: биологической полноценности молозива, его количества, времени получения, процесса адсорбции иммуноглобулинов молозива в кишечнике новорожденного. Эти факторы, в свою очередь, зависят от многих причин.

Молозиво — единственный источник иммуноглобулинов, а следовательно, и иммунной защиты в период новорожденности. Основная часть иммуноглобулинов поступает в секрет молочной железы из крови в неизменном состоянии (81%), активизируясь в молозиве за 3–9 дней до отела. Другая часть синтезируется плазматическими клетками молочной железы. Уровень иммуноглобулинов в молозиве в период родов несколько выше, чем в крови.

Иммунологически качественное молозиво обеспечивает организм детеныша всеми необходимыми питательными веществами и защитными факторами, а также способствует заселению пищеварительного тракта молочно-кислой микрофлорой. Такое молозиво коров содержит $7-12 \times 10^9$ г/л лейкоцитов, в том числе лимфоцитов преимущественно тимусного происхождения и 60–70 г/л иммуноглобулинов. Среди них в первые сутки после родов содержатся: иммуноглобулин А около

43 г/л, IgG — 52 г/л, IgM — 4–5 г/л. Такое молозиво имеет плотность 1,06–1,08, кислотность 50–60 град Т. По данным некоторых авторов нормальное количество IgG содержится в молозиве лишь у 36,4–58,6% коров, а IgM — у 12,1–24,13%.

Установлено, что химический состав молозива коров изменяется уже в течение первых 6 часов после отела; концентрация белка снижается на 12,2%, в основном за счет глобулиновой фракции, концентрация которой уменьшается на 32,8%. Спустя 12 часов после отела концентрация белка снижается на 40,2% и составляет 8,8%. Концентрация глобулинов снижается за этот период на 59,3% и составляет 1,89%. Через 36 часов после отела состав молозива приближается к составу молока: сухое вещество — 14,5%, альбумины и глобулины — 0,6%.

На уровень содержания иммуноглобулинов в молозиве влияют различные факторы. Прежде всего, *неполноценное питание стельных коров, время запуска, возраст коров, их клиническое состояние, условия содержания, время года*. При нарушениях обмена веществ у коров в молозиве снижается содержание иммуноглобулинов, кислотность по Тернеру и плотность. По данным некоторых авторов, при плотности молозива меньше 1,06 уровень иммуноглобулинов падает ниже 50 г/л и новорожденный заболевает. Негативно отражается на уровне иммуноглобулина дефицит в рационе сухостойных коров сахара, кротоина, витаминов А, Е, макро- и микроэлементов. Чтобы предупредить гипогаммаглобулинемию у новорожденных животных, в рацион сухостойных коров рекомендуют включать витаминно-минеральные добавки. Содержание в кормах нитратов, масляной кислоты также отрицательно влияет на содержание иммуноглобулинов в молозиве. Снизить отрицательное влияние нитратов, а также масляной кислоты на здоровье животных можно путем введения в рацион сульфата натрия. При этом качество молозива повышается, в нем возрастает количество иммуноглобулинов в 1,5 раза, кислотность на 9,8 град Т.

На качественный состав молозива влияет также *длительность сухостойного периода*. По данным исследователей, при продолжительности сухостойного периода 2 месяца в молозиве первого удоя содержится 15–18 г/% белка, 50 суток — 1–8 г/% и у коров, доившихся до самого отела, — до 3 г/%.

При этом, соответственно, наблюдается и низкое содержание гамма-глобулинов в молозиве коров с сухостойным периодом менее двух месяцев. Поэтому продолжительность сухостойного периода должна быть не менее двух месяцев. Таким образом, несвоевременный запуск и недостаток питательных веществ в рационе сухостойных коров ведет к снижению содержания в молозиве иммуноглобулинов и других защитных факторов в 1,5–2 раза.

В крови новорожденных, получавших молозиво от коров-первотелок, содержится меньше Ig по сравнению с телятами от коров старшего возраста, так как содержание иммуноглобулинов в молозиве зависит от числа лактаций. Так, у коров 1–3-й лактации в молозиве первого удоя Ig на 10–30% меньше, чем у коров 4–5-й лактации. Наибольшее количество иммуноглобулинов содержится в молозиве коров 6–9-й лактации.

Установлено, что содержание иммуноглобулинов классов G и M в первых и последних порциях одного и того же удоя молозива различно. Выпаивание телятам последних порций молозива с более высоким содержанием Ig повышает их содержание в сыворотке крови новорожденных. Состояние здоровья коров непосредственно влияет на качество молозива. Так, у коров, больных маститом, в период, близкий к отелу, в дальнейшем наблюдается снижение иммуноглобулинов, кислотность молозива. В нем содержится большое количество микробов-возбудителей мастита, а также вырабатываемых ими токсинов. Поэтому у телят, полученных от коров, больных маститами, резко снижается резистентность организма. По данным некоторых авторов, у коров, содержащихся под открытым небом во время суровой зимы, уровень иммуноглобулинов в три раза ниже.

Интенсивность усвоения иммуноглобулинов, а следовательно, и напряженность колострального иммунитета зависит от прохождения иммуноглобулинов через желудочно-кишечный тракт новорожденного. Высокий уровень всасывания их у новорожденных связан с избирательной проницаемостью слизистой оболочки, наличием в молозиве ингибиторов трипсина, химотрипсина, препятствующих их гидролизу, а также отсутствием или низким содержанием соляной кислоты в сычуге. Через 36–48 часов всасывание у нормально развитых телят

прекращается. Поступающие с молозивом иммуноглобулины, особенно IgA, в более поздний период выполняют прежде всего местную защиту слизистой оболочки пищеварительного тракта. Имеются данные, что самое высокое всасывание отмечается в первые 6–12 часов.

Рядом ученых установлено, что IgM при нормальных условиях всасываются за 16 часов, IgA — 22 часа, IgG — 27 часов. В первые сутки жизни телят в кишечнике всасывается 90% IgG, 59% IgM и 48% IgA. Всасывание иммуноглобулинов в первые 36 часов жизни снижается: IgA — с 11 до 3%, IgG — с 13 до 5% и IgM — с 14 до 0,1%. Считается, что с отхождением мекония всасывание в кишечнике почти прекращается. Отсюда следует, что чем раньше новорожденный получит первое молозиво, тем более высокий уровень иммуноглобулинов поступит в кровоток, поэтому новорожденному теленку необходимо выпаивать первое молозиво не позднее 1,5 часов после рождения. Период прохождения иммуноглобулинов через слизистую кишечника зимой короче, чем летом. В молозивный период, особенно в первые часы и дни жизни, новорожденного важно оградить от стрессовых ситуаций, поскольку из-за них может ухудшиться или полностью прекратиться адсорбция иммуноглобулинов. Выращивание телят в первые дни на подсосе способствует лучшему обогащению организма Ig. У телят, находившихся на подсосе, некоторые исследователи отмечают достоверно высокий уровень гамма-глобулинов в крови (0,78 против 0,62% в контроле) к концу первого дня жизни. К 5-му дню фагоцитарная активность у них выше на 18,6%, чем у новорожденных, которых содержат в индивидуальных клетках.

Подмечено, что телята, получавшие молозиво через сосковую поилку или из ведра, но оставленные с матерями, усваивали больше иммуноглобулинов, чем телята, получавшие такое же количество молозива, но содержащиеся отдельно. Наиболее интенсивно абсорбция и транспортировка гамма-глобулинов происходит при медленной выпойке и температуре молозива 37–38°C. В то же время термическое воздействие инактивирует биологически активные вещества молозива, поэтому новорожденным необходимо парное молозиво. Норма первой порции и наличие в нем антител влияют на уровень иммуноглобулинов в

крови телят. Считается, что оптимальное количество иммуноглобулинов у новорожденных наблюдается при норме первой порции 1,2–2,0 л. На содержание иммуноглобулинов в плазме крови новорожденных влияют породные и генетические различия родительских пар. Так, установлено, что телята от коров черно-пестрой породы лучше усваивают Ig, чем от красной датской, а телята фризской породы более, чем телята айрширской и джерсейской. При одинаковых условиях выращивания в крови бычков больше Ig, чем в крови телочек, т. е. процесс абсорбции у бычков более интенсивен.

Факторы микроклимата оказывают также влияние на формирование колострального иммунитета у новорожденных телят. В профилакториях с высокой влажностью и большой концентрацией вредных газов (CO_2 , NH_3 и др.) у телят ухудшается всасывание иммуноглобулинов. По данным исследователей, в хорошо вентилируемых профилакториях уровень Ig в крови телят составляет 25,5 мг/мл, а в плохо вентилируемых — только 18,6 мг/мл. Причиной низкой всасываемости Ig могут быть также плохое состояние здоровья матери или внутриутробная недоразвитость плода. Стимуляция родов кортикостероидами снижает концентрацию иммуноглобулинов в молозиве и всасываемость его в кишечнике телят.

Выпаивание телятам в первые сутки их жизни средств, стимулирующих работу секреторного аппарата пищеварительного тракта (физраствора, желудочного сока и др.), приводит к появлению свободной соляной кислоты, увеличению кислотности и ферментативной активности сычужного содержимого. Лактоглобулины, а также клеточные элементы молозива в этих условиях теряют свои биологические свойства и перевариваются. Это лишает организм новорожденного их защитного действия от условно-патогенной микрофлоры. Особенно опасна дача этих препаратов до первого поения телят молозивом. На всасываемость иммуноглобулинов в кишечнике также отрицательно влияют низкий показатель pH крови и высокое содержание в организме молочной кислоты и углекислоты. Исследователями установлено, что телята, родившиеся с pH плазмы крови ниже нормы (нормальный показатель pH телят 7,35–7,45), в первые 8 часов жизни при двукратной даче вволю мо

дозива выпивают меньше и пьют без аппетита. Количество Ig крови суточных телят с рН плазмы 6,90–7,15 и 7,35 составляет соответственно 24,5 и 37,9 мг/мл. Следовательно, нормализация кислотно-щелочного равновесия у новорожденных телят является одним из важным факторов, способствующим повышению напряженности колострального иммунитета.

Установлена прямо пропорциональная зависимость заболеваемости новорожденных животных от уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови в суточном возрасте. Время действия колострального иммунитета, отмечает ряд авторов, обусловлено периодом полураспада иммуноглобулинов, теак, у IgM он составляет 3–5 дней, IgG — 10–21 день, IgA — 4–6 дней. Из-за распада иммуноглобулинов уровень колостральных антител через указанные сроки начинает снижаться. В среднем к месячному возрасту у них заканчивается период колострального иммунитета, а уже с двухнедельного возраста развивается активный иммунитет.

После приема молозива в возрасте 1–5 дней концентрация иммуноглобулинов у здоровых животных должна быть 15–20 г/л и выше. При концентрации иммуноглобулинов менее 15 г/л или содержании общего белка ниже 55 г/л следует считать, что у животных имеется недостаточность иммуноглобулинов (гипогаммаглобулинемия). Устранение причин иммунодефицита, особенно в молозивный период, направлено на повышение естественной резистентности новорожденных телят. В последние годы в связи со сложной экологической обстановкой, нехваткой и несбалансированностью корма, нарушениями технологии содержания эта проблема встала очень остро. Молодняк с признаками иммунной недостаточности составляет группу повышенного риска к различным заболеваниям, что приводит к их отходу. А те животные, которые выживают, в дальнейшем имеют пониженную продуктивность.

Напряженность колострального иммунитета можно корректировать, используя способы, влияющие на содержание иммуноглобулинов в крови новорожденных, указанные ранее, а также и другие. Разработаны способы повышения уровня колострального иммунитета путем рационального применения *иммунопрепаратов*, таких как глюкозо-цитратная кровь крупного

рогатого скота, аллогенная иммунная сыворотка крови коров, аллогенный иммуноглобулин. Установлено, что при применении этих биологических средств у реципиентов повышается напряженность колострального иммунитета, факторы неспецифической резистентности, улучшаются обменные процессы, функционирование органов и систем. Материнский иммунитет, передаваемый новорожденному через молозиво, может быть усилен, считают исследователи, *активной иммунизацией коров* биологическими препаратами из возбудителей, участвующих в этиологии и патогенезе различных инфекций у телят разного возраста. При недостатке в молозиве иммуноглобулинов профилактировать первый возрастной иммунодефицит можно путем дачи внутрь цельной крови, неспецифического глобулина, дачей экстракта гамма-глобулина молозива, специфических иммуноглобулинов сывороток, которые в первые дни всасываются из кишечника как материнские.

Применение *озонирования молозива* коров, используемого для выпойки телятам, повышает абсорбционную способность иммуноглобулинов кишечником новорожденных животных и повышает их иммунный статус. Установлено, что иммунодефициты у телят в период новорожденности можно предупредить через материнский организм путем применения сухостойным коровам специальных подкормок, состоящих из макро- и микроэлементов, биологически активных веществ. При этом повышается качество, иммунная полноценность молозива, а следовательно, и жизнеспособность, иммунологическая реактивность приплода, а также последующая продуктивность матери новорожденного.

Многочисленными исследованиями установлено, что иммуномодуляторы (биогенные стимуляторы) способствуют активизации анабиотических процессов в организме. Это объясняется воздействием их на нейроэндокринную и гипофизарно-кортикальную систему и увеличение гонадотропного и адренотропного и других гормонов. В результате повышается естественная резистентность животных в ранний период жизни.

Повысить иммунный статус организма и тем самым сохранность новорожденных телят можно с помощью *ультрафиолетового облучения крови*, а также использованием этого спосо-

ба с применением биологически активных природных веществ. В их ряду стоят как природные электролиты, так и электроактивированные растворы. Следовательно, в формировании колострального иммунитета нет мелочей, которыми можно пренебречь. Так, нарушение норм кормления, использование кормов, низких по питательности и санитарным качествам, а также несоблюдение условий содержания и эксплуатации стельных коров вызывают внутриутробное недоразвитие плода. В то же время все эти факторы влияют на биологическую полноценность молозива. Не соблюдая все аспекты, влияющие на процесс абсорбции, такие как технология выпойки, технология содержания новорожденных, время выпойки, учет состояния здоровья новорожденных, а также генетических факторов, невозможно сформировать у новорожденных напряженного колострального иммунитета, который обеспечил бы иммунную защиту организма на ранних стадиях постэмбрионального развития.

Интенсивность напряженности колострального иммунитета можно создавать, не только выполняя основные ветеринарно-санитарные, зооигиенические и зоотехнические требования содержания и кормления беременных животных и новорожденного молодняка, но и используя биологически активные препараты, способствующие увеличению иммуноглобулинов в крови у новорожденных телят.

Молозиво не только повышает в крови новорожденных содержание белков иммуноглобулинов. Вместе с молозивом детеныш получает важную защиту против микробов — наряду со строго специфическим действием антитела обладают еще определенной опсонизирующей активностью по отношению к другим возбудителям с более или менее близким антигенным строением. Поэтому иммуноглобулины молозива могут выполнять функцию узнавания, включая тем самым в действие фагоцитарную защиту против возбудителей, с которыми мать даже не была в контакте. Кроме того, колостральным антителам приписывают также защитное действие в желудочно-кишечном тракте. Иммуноглобулины и другие макромолекулы могут проходить в неизменном виде через стенку кишечника новорожденного. У домашних животных такая проницаемость стенки кишечника утрачивается уже в первые дни жизни, у телят —

рогатого скота, аллогенная иммунная сыворотка крови коров, аллогенный иммуноглобулин. Установлено, что при применении этих биологических средств у реципиентов повышается напряженность колострального иммунитета, факторы неспецифической резистентности, улучшаются обменные процессы, функционирование органов и систем. Материнский иммунитет, передаваемый новорожденному через молозиво, может быть усилен, считают исследователи, *активной иммунизацией коров* биологическими препаратами из возбудителей, участвующих в этиологии и патогенезе различных инфекций у телят разного возраста. При недостатке в молозиве иммуноглобулинов профилактировать первый возрастной иммунодефицит можно путем дачи внутрь цельной крови, неспецифического глобулина, дачей экстракта гамма-глобулина молозива, специфических иммуноглобулинов сывороток, которые в первые дни всасываются из кишечника как материнские.

Применение *озонирования молозива* коров, используемого для выпойки телятам, повышает абсорбционную способность иммуноглобулинов кишечником новорожденных животных и повышает их иммунный статус. Установлено, что иммунодефициты у телят в период новорожденности можно предупредить через материнский организм путем применения сухостойным коровам специальных подкормок, состоящих из макро- и микроэлементов, биологически активных веществ. При этом повышается качество, иммунная полноценность молозива, а следовательно, и жизнеспособность, иммунологическая реактивность приплода, а также последующая продуктивность матери новорожденного.

Многочисленными исследованиями установлено, что иммуномодуляторы (биогенные стимуляторы) способствуют активизации анабиотических процессов в организме. Это объясняется воздействием их на нейроэндокринную и гипофизарно-кортикальную систему и увеличение гонадотропного и адренотропного и других гормонов. В результате повышается естественная резистентность животных в ранний период жизни.

Повысить иммунный статус организма и тем самым сохранить новорожденных телят можно с помощью *ультрафиолетового облучения крови*, а также использованием этого спосо-

ба с применением биологически активных природных веществ. В их ряду стоят как природные электролиты, так и электроактивированные растворы. Следовательно, в формировании колострального иммунитета нет мелочей, которыми можно пренебречь. Так, нарушение норм кормления, использование кормов, низких по питательности и санитарным качествам, а также несоблюдение условий содержания и эксплуатации стельных коров вызывают внутриутробное недоразвитие плода. В то же время все эти факторы влияют на биологическую полноценность молозива. Не соблюдая все аспекты, влияющие на процесс абсорбции, такие как технология выпойки, технология содержания новорожденных, время выпойки, учет состояния здоровья новорожденных, а также генетических факторов, невозможно сформировать у новорожденных напряженного колострального иммунитета, который обеспечил бы иммунную защиту организма на ранних стадиях постэмбрионального развития.

Интенсивность напряженности колострального иммунитета можно создавать, не только выполняя основные ветеринарно-санитарные, зоогигиенические и зоотехнические требования содержания и кормления беременных животных и новорожденного молодняка, но и используя биологически активные препараты, способствующие увеличению иммуноглобулинов в крови у новорожденных телят.

Молозиво не только повышает в крови новорожденных содержание белков иммуноглобулинов. Вместе с молозивом детеныш получает важную защиту против микробов — наряду со строго специфическим действием антитела обладают еще определенной опсонизирующей активностью по отношению к другим возбудителям с более или менее близким антигенным строением. Поэтому иммуноглобулины молозива могут выполнять функцию узнавания, включая тем самым в действие фагоцитарную защиту против возбудителей, с которыми мать даже не была в контакте. Кроме того, колостральным антителам приписывают также защитное действие в желудочно-кишечном тракте. Иммуноглобулины и другие макромолекулы могут проходить в неизменном виде через стенку кишечника новорожденного. У домашних животных такая проницаемость стенки кишечника утрачивается уже в первые дни жизни, у телят —

чаще всего через сутки, у поросят — через 2 дня. Поэтому телята при неправильных методах выпаивания могут не получать достаточного количества иммуноглобулинов.

Причиной недостаточного иммунитета у новорожденных и молодняка может быть также скармливание молозива с низкой иммунобиологической ценностью, что происходит из-за более ограниченного контакта с антигенами, как это вообще характерно для современных животных. В этом случае качество молозива часто бывает хуже в связи с низким содержанием иммуноглобулинов и узким спектром антител.

Постнатальный период развития большинства животных и птиц характеризуется пониженной реактивностью организма, слабым проявлением неспецифических гуморальных факторов, недостаточной защитной силой кожного покрова и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта.

На ранних этапах онтогенеза наблюдается своеобразная ареактивность, проявляющаяся в пониженной способности организма вырабатывать антитела. В связи с меньшей резистентностью телят зимнего и особенно весеннего сезона рождения следует уделять повышенное внимание зооигиеническим условиям их жизни и кормлению, в частности, срокам выпойки и качеству (белковому и витаминному составу) молозива, особенно в первые сутки после рождения. При переходе на кормление молоком фракция гамма-глобулина постепенно снижается, а молодой организм, тем временем приспособившись, использует свои собственные защитные средства.

Многочисленные данные указывают на прямую зависимость между состоянием здоровья маточного поголовья и молодняка. На фермах, где отмечается большой отход животных, можно наблюдать своеобразный порочный круг или взаимосвязанную цепь, первым и главным элементом которой является ослабленная, нездоровая мать, вторым — больной диспепсией приплод, а последним — больной бронхопневмонией растущий молодняк. Причем теряется значительное количество молочной и мясной продукции, создаются трудности в ремонте маточного скота.

ЗАЩИТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ИММУНИТЕТА ПРИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Основные интересы медицинских вирусологов в изучении противовирусного иммунитета сосредоточены на раскрытии природы и защитной роли неспецифических и специфических гуморальных и клеточных факторов, используемых организмом человека для подавления агрессии болезнетворных вирусов. Для экспериментального изучения этих вопросов широко используют моделирование вирусных инфекций на различных видах позвоночных животных, эволюция которых привела к развитию наиболее важных и родственных человеку механизмов клеточных и гуморальных защитных реакций.

Разработка проблемы противовирусного иммунитета происходила в течение последних лет под влиянием двух ведущих положений.

1. Признание качественного своеобразия гуморальных и клеточных факторов неспецифической противовирусной защиты, вытекающего из уникальных особенностей биологической природы и свойств вирусов. Являясь потомками и реликтами наиболее элементарных форм живой материи, сохранившихся в эволюции в качестве строгих внутриклеточных паразитов животных, растений и одноклеточных микробов, вирусы радикально отличаются по ряду основных биологических признаков от бактерий, микоплазм, риккетсий и хламидий. Это накладывает печать большого своеобразия и на природу защитных реакций организма, особенно выраженного на примере механизмов неспецифической резистентности. К числу таких отличий биологии вирусов относятся: уникальный механизм репродукции,

осуществляющийся без парного деления материнской частицы, с ведущим участием вирусных нуклеиновых кислот; наличие в составе вирионов лишь одного из двух известных типов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК); отсутствие собственных рибосом, а также ферментов, обеспечивающих продукцию энергии; способность РНК или ДНК, искусственно изолированных из некоторых наиболее элементарных по структуре вирусов, начинать и завершать самостоятельную репродукцию. Существование вирусов начинается с процесса интеграции вирусных РНК или ДНК с ДНК клеток хозяина. К числу кардинальных особенностей вирусов относится также исключительно совершенная форма их паразитизма, при которой ряд вирусоспецифических энзимов не вносится в зараженную клетку в готовом виде, кодируется вирусным геномом уже в процессе репродукции, составляя значительную часть генетической информации возбудителя.

2. Признание основного участия в развитии специфических защитных реакций кооперативного взаимодействия клеток лимфоцитарно-макрофагальной иммунологической системы, с помощью которой обеспечивается сохранение генетического постоянства внутренней среды организма позвоночных против любых чужеродных антигенов.

С прямым участием клеток лимфоцитарно-макрофагальной системы связано выполнение таких ведущих функций неспецифической и специфической защиты, как синтез интерферона и бета-ингибиторов, мобилизация макрофагального фагоцитоза и пирогенных реакций, формирование секреторных и сывороточных антител, развитие защитных воспалительных реакций при основном участии Т-лимфоцитов и макрофагов. Как клеточные, так и гуморальные защитные реакции направлены на подавление репродукции болезнетворных вирусов и на устранение их основного резервуара в чувствительных клетках.

Все указанные исполнительные механизмы клеточной и гуморальной защиты функционируют в организме в тесной зависимости от нейрогуморальной, гормональной, сердечно-сосудистой и других физиологических систем, регулирующих количественный уровень и напряженность защитных реакций. Однако непосредственное обеспечение постоянства генетического состава внутренней среды осуществляется при участии

высокоспециализированных клеточных и гуморальных механизмов иммунологической системы.

По современной классификации вирусы позвоночных распределены примерно в 20 различных семейств, которые различаются между собой по типу нуклеиновой кислоты, количеству генов, анатомической структуре и ряду других признаков. Состав вирусов внутри большинства хорошо изученных семейств достаточно обособлен и характеризуется отсутствием отчетливых антигенных связей между представителями разных семейств, что указывает на вероятную самостоятельность их эволюции. Переходу доклеточных форм жизни на паразитическое существование должно было предшествовать появление более приспособленных к клеточным формам жизни, полностью истребивших основные ресурсы доклеточного живого белка. В этих условиях в природе сохранились только те представители доклеточной жизни, которые смогли перейти на паразитическое существование в клетках многообразных видов микробного, растительного и животного мира. Паразитическое существование благоприятствовало сохранению в длительной эволюции уникальной генной организации вирусов, характеризующейся наличием ограниченного числа генов в составе вирусных нуклеиновых кислот и кодируемых ими белковых молекул (полипептидов).

За последние годы иммунология превратилась в самостоятельную науку, занятую изучением общих механизмов сохранения генетического постоянства внутренней среды организма. Это обеспечивается с помощью распознавания и обезвреживания чуждых организму антигенов внешнего или внутреннего происхождения. Сохранив свои традиционные интересы к проблеме заразных болезней и внешних аллергенов, иммунология значительно расширила предмет изучения в сторону заболеваний неинфекционной природы. Поводом к тому явилось раскрытие важной роли иммунологических механизмов в патогенезе ряда врожденных и хронических заболеваний сосудов, крови, суставов, почек, соединительной ткани, центральной нервной системы, кожи, тимуса, лимфоидных органов. Намечился прогресс и в изучении иммунологических механизмов контроля злокачественных опухолей, влияния возрастных факторов на частоту спонтанных мутаций и их иммунологического подавления. Развивая классические

положения о природе иммунологической несовместимости при переливании крови, иммунология раскрыла сходные механизмы в явлениях несовместимости при трансплантационной хирургии.

Значительному расширению интересов иммунологии в области неинфекционной патологии способствовали недавние теоретические открытия, обосновавшие кооперативное участие в основных явлениях специфического иммунитета двух самостоятельных групп клеток — макрофагов и малых лимфоцитов.

Фагоцитарная теория И. И. Мечникова еще на заре XX в. связала природу неспецифической защиты животных от патогенных микроорганизмов с участием макрофагов и других групп фагоцитарных клеток. Современная иммунология доказала связь основных механизмов приобретенного иммунитета с участием двух различных групп малых лимфоцитов. Одна из них обеспечивает продукцию антител В-зависимыми лимфоцитами костного мозга, другая группа тимусзависимых лимфоцитов участвует не только в продукции антител, но и в разрушении и удалении чуждых организму трансплантатов, опухолевых и зараженных вирусами клеток и отвечает за явления замедленной сверхчувствительности.

Клонально-селекционная теория использовала новые факты об участии лимфоцитов в развитии специфического иммунитета для объяснения происхождения антител, иммунологической памяти, явлений иммунологической толерантности, иммунопатологических и аутоиммунных болезней.

Благодаря этим открытиям иммунология превратилась в одну из узловых наук, оказывающих большое влияние на многие клинические дисциплины, а также на теоретические исследования в области биологии, генетики, биохимии, микробиологии.

ВРОЖДЕННАЯ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ И ПРИОБРЕТЕННЫЙ ИММУНИТЕТ

Внимание врачей и ученых привлекали две основные категории защитных реакций — врожденной неспецифической резистентности и приобретенного иммунитета.

Первая касалась врожденной (естественной) резистентности к различным заразным болезням, распространявшейся на

целые виды животных или на отдельные их подгруппы. Известно, что люди обладают врожденной устойчивостью к ряду вирусных заболеваний, опасных для многих видов окружающих нас домашних животных (чума собак, свиней, рогатого скота), а животные невосприимчивы ко многим заразным болезням человека (видовая резистентность).

Многие вирусные инфекции вызывают заболевания лишь у небольшой части заразившихся людей, у большинства же процесс развивается в бессимптомной, субклинической форме, стимулирующей развитие прочного иммунитета. Таковым является полиомиелит, поражающий не более 0,2–1% заразившихся детей, таковы многие арбовирусные инфекции (клещевой японский энцефалит). При гриппе и эпидемическом паротите клиническая форма болезни регистрируется не более чем у половины инфицированных людей, у всех остальных болезнь протекает бессимптомно благодаря высокому уровню неспецифической защиты.

Вторая категория явлений — приобретенный иммунитет, он развивается у людей и животных, переболевших определенными инфекциями, а также подвергнутых искусственной активной или пассивной иммунизации. Хорошо известно, что люди, переболевшие оспой, чумой, корью, свинкой, приобретают на всю жизнь устойчивость к перенесенной болезни. Эта устойчивость строго специфична и не распространяется на какие-либо другие инфекции.

Еще в конце прошлого века началась упорная работа по выявлению природы защитных механизмов, обеспечивающих благополучие организма при первой встрече с заразной болезнью. И. И. Мечников, сделавший особенно много в этой области, говорил, что «тайна иммунитета скрыта за семью замками». Один из них, раскрытый его трудами, показал, что невосприимчивость организма к заразным болезням часто объясняется деятельностью специальных клеток, которые захватывают и уничтожают заразные микробы. Такие клетки Мечников назвал фагоцитами, а самый процесс захватывания и переваривания микробов — фагоцитозом.

У низших одноклеточных организмов, таких как амебы и инфузории, фагоцитоз связан с процессом питания и пищеварения

клетки. У более сложно организованных многоклеточных животных, например у прозрачной и хорошо доступной для наблюдения под микроскопом личинки морской звезды, фагоцитоз осуществляется специальными подвижными клетками. Вкол в тело такой личинки деревянную или стеклянную занозу, Мечников наблюдал под микроскопом, как к инородному телу приближались амебовидные лейкоциты. Они окружали занозу и формировали вокруг нее защитный воспалительный вал, составленный из большой массы подвижных лейкоцитов. Если в тело той же личинки ввести живых микробов, то лейкоциты захватывали и переваривали их при помощи своих ферментов.

Изучая высшие организмы теплокровных животных, Мечников обнаружил и здесь многочисленные группы фагоцитирующих клеток, сосредоточенных в крови, селезенке, костном мозгу, печени, лимфатических узлах, на внутренней стенке сосудов и т. д. Неподвижные фагоциты входят в состав так называемой макрофагальной (ретикуло-эндотелиальной) системы, которая играет важную роль в борьбе организма с болезнетворными микробами.

Вскоре было показано, что участие в защите организма ретикуло-эндотелиальной системы связано не только с фагоцитарной клеточной активностью, но и с продукцией специальных защитных белковых молекул — антител.

Нобелевская премия по биологии и медицине за 1908 г. была присуждена совместно И. И. Мечникову за обоснование фагоцитарной теории иммунитета и немецкому микробиологу Паулю Эрлиху за развитие гуморальной теории иммунитета, доказавшей важную защитную роль антител. Эрлих и другие «гуморалисты» показали, что ретикуло-эндотелиальная, или, точнее, макрофагально-лимфоцитарная система помогает организму не только в разрушении микробов при участии фагоцитарных клеток. Здесь вырабатываются специальные белковые вещества — антитела, активно нейтрализующие микробные токсины (антитоксины), разрушающие микробные клетки (бактериолизины), подготавливающие микроб к фагоцитозу (опсонины, бактериотропины), а также особо важные для борьбы с вирусами антитела, подавляющие вирусную репродукцию (вируснейтрализующие антитела).

Образование антител могут вызвать и другие белковые вещества (антигены), чужеродные для организма, например ткани различных органов, сыворотки животных и т. д., если эти антигены вводятся не через кишечник, а под кожу, в кровь, внутривенно.

Защитные факторы неспецифической резистентности против вирусных инфекций. Организм человека и позвоночных животных мобилизует для борьбы с вирусными агентами совокупность врожденных и приобретенных защитных механизмов, направленных на подавление главного орудия вирусной агрессии — репродукции возбудителей в чувствительных клетках. Искусственное вычленение отдельных факторов неспецифической резистентности или иммунитета, необходимое для оценки их индивидуальной защитной роли, не должно заслонять основного положения о единстве и гармонической согласованности их действия в целостном организме.

Развитие вирусной инфекции приводит к нарушениям внутренней среды организма, для устранения которых раньше всего используются врожденные и быстро приобретаемые механизмы неспецифической защиты. Наряду с этим начинается подготовка в соответствии с природой возбудителя непрерывно возрастающих в активности специфических механизмов.

Иммунологическая защита начинается с подавления вирусной агрессии с помощью таких неспецифических клеточных и гуморальных механизмов, как интерферон, фагоцитоз зараженных вирусами клеток, реакция. Преимущественную роль играют те факторы противовирусной резистентности, которые не только предсуществуют в организме до начала вирусной инвазии, но быстро мобилизуются и значительно усиливаются в своей активности уже в раннем периоде развития вирусного процесса, подобно фагоцитозу, интерферону и лихорадочной реакции. Исключением является система комплемента, не участвующая в самостоятельном подавлении вирусной агрессии, но потенцирующая активность бета-ингибиторов.

Высочайший внутриклеточный паразитизм вирусных агентов лежит в основе неповторимых особенностей защитных механизмов противовирусной резистентности и иммунитета, выполняющих сравнительно ограниченную задачу — предупреждение

проникновения вирионов в чувствительные клетки, вне которых вирусы менее вредны. Если такие чувствительные клетки отсутствуют в организме человека или животных, развитие вирусного процесса становится невозможным — создается состояние абсолютной устойчивости (резистентности), которая может быть врожденной или же приобретается с возрастом. Такая резистентность отличается исключительной прочностью, не ослабляющейся после воздействия многих вредных факторов.

Природа *клеточной резистентности* к тем или другим вирусам еще недостаточно раскрыта и может объясняться различными причинами, препятствующими биосинтезу вирионов на любом этапе их репродукции (нарушение адсорбции на клеточную оболочку, невозможность депротенизации проникших в клетку частиц и др.).

Когда организм хозяина располагает комплексом клеток, способных поддержать размножение вирусных агентов, вступают в действие дополнительные защитные факторы, мешающие репродукции возбудителя в чувствительных клетках.

Здесь относятся:

1) интерферон — уникальный приобретенный фактор неспецифической резистентности, продуцируемый лимфоцитами и многими другими клетками организма, подавляющий активность размножения большинства вирусов, опасных для определенного вида животных;

2) фагоцитоз при участии макрофагов, направленный на захват и уничтожение зараженных вирусом клеток, менее эффективный против оголенных вирионов;

3) лихорадочная реакция, губительно влияющая на размножение высоко термолабильных вирусов;

4) сывороточные ингибиторы вирусной репродукции, препятствующие проникновению и размножению вирусов в чувствительных клетках.

Неспецифические факторы защиты, вступающие в действие в наиболее ответственный ранний период развития вирусной инфекции, способствуют подавлению репродукции возбудителей и устранению инфекционного процесса задолго до созревания механизмов специфического иммунитета. Такое положение существует при гриппе и других остро протекающих респира-

торных инфекциях, нередко заканчивающихся выздоровлением через 3–5 дней, хотя мобилизация антител и других факторов специфической защиты еще не достигла ощутимого уровня.

Тяжесть возникшей инфекции зависит от вирулентности возбудителя, количества пораженных клеток, их возрастных особенностей и важности для организма. Решающую роль в смягчении вирусной инфекции играет быстрая мобилизация ряда врожденных или заново формирующихся неспецифических факторов защиты. Сюда относятся вируснейтрализующие ингибиторы крови и барьерных жидкостей, вредная для вирусов лихорадочная реакция и особенно индуцируемый вирусами синтез интерферона во входных воротах инфекции. К ним присоединяется постепенно наращиваемая активность клеточных (фагоцитарных и лимфоцитарных) факторов защиты, устраняющих скопления зараженных вирусами чувствительных клеток.

Особо интенсивная количественная динамика свойственна клеточным и гуморальным факторам специфической защиты, характеризующимся геометрическим приростом числа В- и Т-лимфоцитов в процессе их бласттрансформации и связанным с этим быстрым увеличением концентрации антител, а также киллерной активности Т-лимфоцитов и макрофагов.

Развитие вирусных инфекций сопровождается, хотя и далеко не регулярно, формированием иммунитета, опирающегося на кооперативное участие антител, продуцируемых В-лимфоцитами, на развитие сенсibilизированных клонов Т-лимфоцитов и макрофагов, участвующих как в синтезе антител, так и в разрушении зараженных вирусами клеток.

Напряженность и длительность приобретенного иммунитета у людей находится в прямой корреляции с показателями репродукции различных вирусов в лимфоцитах человека. Интенсивно размножающиеся вирусы кори, свинки, полиомиелита, вирусных энцефалитов стимулируют формирование многолетнего иммунитета, тогда как не способные к размножению вирусы гриппа и некоторых ОРЗ стимулируют развитие более кратковременной специфической защиты.

Как неспецифические, так и специфические защитные факторы противовирусной резистентности и иммунитета направлены не столько на разрушение вирионов в различных секретах

и межклеточных жидкостях, как это происходит при антибактериальном иммунитете, сколько на предупреждение опасности репродукции возбудителя в различных группах чувствительных клеток. При участии вируснейтрализующих антител или сходных с ними по механизму действия термолabileльных вируснейтрализующих бета-ингибиторов успешно блокируются начальные этапы вирусной репродукции, обеспечивающие прикрепление вируса к оболочке восприимчивой клетки и его внедрение в цитоплазму. В случае внедрения вируса в цитоплазму клетки они быстро реагируют на произошедшее нарушение продукцией интерферона, задерживающего репликацию вирусных нуклеиновых кислот. Лихорадочная реакция, сопровождающая вирусные заболевания, способствует усилению продукции интерферона, подавлению синтеза вирусных белков и термическому повреждению зрелых вирионов.

Особенности противовирусного иммунитета у теплокровных животных и человека целесообразно условно разделить, в плане постепенного усложнения основных защитных механизмов, на следующие главные формы естественной врожденной и приобретенной резистентности:

- факторы неспецифической резистентности восприимчивого организма;
- факторы естественной (видовой) резистентности;
- факторы приобретенной специфической защиты.

Факторы естественной (видовой) резистентности. Первой линией обороны организма от вирусов являются анатомические барьеры, способные подавить в самом начале инфекции инвазию возбудителей при участии неповрежденной кожи и особенно слизистых оболочек с их мощным выделительным реснитчатым аппаратом и высокоактивными секретами. Сюда относятся и такие важные химические барьеры, как желудочный сок и желчь, быстро убивающие вирусы, чувствительные к низкому рН и к растворителям липидов внешней оболочки вирионов. Секреты слизистых оболочек содержат термолabileльные бета-ингибиторы, наделенные широким спектром инактивирующей активности против миксовирусов, герпеса и др.

Если эта защита недостаточна, а организм восприимчив, разовьется локализованная или генерализованная инфекция.

Естественная (видовая) врожденная резистентность проявляется абсолютной устойчивостью людей к многим вирусным заболеваниям животных, а последних — к заболеваниям людей. Аналогичная степень резистентности нередко развивается с возрастом. Так, новорожденные сирийские хомяки проявляют высокую чувствительность к онкогенным вирусам (полиома, аденовирусы), белые мыши к вирусам Коксаки, которая быстро утрачивается после рождения. Главной причиной врожденной или возрастной резистентности является отсутствие у организма клеточных систем, способных поддерживать размножение вирусных агентов. Создающаяся в этих случаях абсолютная устойчивость не может быть устранена или ослаблена с помощью таких провоцирующих воздействий, как облучение рентгеном, охлаждение, ожоговая травма, введение иммунодепрессантов, столь эффективных в провоцировании бактериальных инфекций.

Причину непреодолимой клеточной резистентности к определенным вирусам пытались объяснить несоответствием метаболизма резистентных клеток условиям синтеза возбудителя или же неспособностью вирусов к внедрению в нечувствительные клетки. Оба предположения оказались несостоятельными, поскольку механизм пиноцитоза способствует универсальному проникновению любых вирусов как в чувствительные, так и в резистентные клетки. С другой стороны, введение в культуры резистентных клеток или в резистентный организм искусственно извлеченных из ряда пикорна и арбовирусов инфекционных нуклеиновых кислот приводило к регулярному развитию одного полного цикла зрелого вируса, что опровергает положение о несоответствии метаболизма резистентных клеток синтезу непатогенных вирусов. Одна из основных причин резистентности клеток может быть связана с невозможностью депротеинизации («разведения») вирусов в естественных условиях их взаимодействия с невосприимчивыми клетками, также с нарушением других этапов репродукции вирусов (адсорбция вируса на оболочку клеток, трансляция вирусных белков, сборка всех компонентов, выход вирионов из клетки).

Факторы неспецифической резистентности восприимчивого организма. При наличии в клетках условий для репродукции вирусы могут встретиться с рядом неспецифических защитных факторов, способных подавить дальнейшее размножение и генерализацию возбудителей задолго до мобилизации специфических механизмов борьбы.

К числу основных неспецифических защитных факторов относится прежде всего продукция зараженными клетками лейкоцитарного интерферона.

Защитная роль интерферона (ИФ). Продукция ИФ, защитного клеточного белка, с молекулярным весом около 30 000, является универсальной, эффективной и немедленной ответной реакцией любых систем чувствительных клеток позвоночных животных на внедрение вирусов. Наибольшая продукция ИФ обеспечивается лимфоцитами и является уникальным фактором приобретенной неспецифической резистентности, нетоксичным для организма, с высокой профилактической активностью для любых групп чувствительных клеток своего вида. Проявляет строгую видовую клеточную специфичность в сочетании с почти универсальным подавлением репродукции большинства известных вирусов человека и животных в клеточных культурах и в организме. В естественных условиях вирусной инфекции синтез ИФ индуцируется вирусной нуклеиновой кислотой, а в искусственных условиях также с помощью ряда синтетических полинуклеотидов и двунитчатых нуклеиновых кислот, устойчивых к клеточным нуклеазам. Интенсивность продукции ИФ обратно пропорциональна вирулентности (цитотоксичности) вируса и наиболее активна у маловирулентных аттенуированных живых вакцин при температуре, повышенной до 40°C.

Защитное действие ИФ направлено на прекращение процесса трансляции вирусной мРНК и синтеза вирусного белка. Предполагают, что подавление синтеза вируса осуществляется не самим ИФ, а индуцируемым им другим клеточным белком.

Продолжительность индукции ИФ зависит от времени репродукции введенного вируса, составляя 7 дней после введения живых вакцин против гриппа, 10–12 дней — свинки и кори, 21–28 дней — после пероральной вакцинации против полиомиелита.

Искусственно введенный в кровь лейкоцитарный ИФ быстро исчезает из циркуляции, уменьшаясь в концентрации на 97% в час и выделяясь в количестве около 2% исходной дозы через почки. Прямая связь между образованием интерферона и выздоровлением таких быстро протекающих доброкачественных инфекций, как грипп и вирусные ОРЗ, при которых кривая продукции ИФ находится в отчетливой корреляции с развитием и тяжестью болезни. Количество ИФ возрастает при доброкачественном и падает при тяжелом течении болезни. Продукция ИФ прекращается при выздоровлении, когда вступают в действие факторы специфического иммунитета, завершающие стерилизацию организма от вирусных агентов и предупреждающие возможность рецидива вирусной инфекции.

Защитная роль интерферона подтверждается возможностью экспериментального предупреждения вирусных инфекций путем искусственной индукции образования собственного (эндогенного) интерферона введением различных стимуляторов типа живых вирусных вакцин, нуклеиновых кислот, полианионов и полисахаридов, а также готового лейкоцитарного ИФ.

Наряду с обычным ИФ (первого типа), синтезируемым при первичном воздействии вирусных индукторов на клетки иммунной системы, известен более активный иммунный ИФ (второго типа), образующийся в условиях повторного воздействия идентичного индуктора на сенсibilизированные Т-лимфоциты и макрофаги. Иммунный ИФ отличается от синтезированного при первичном взаимодействии по ряду молекулярно-биологических свойств и по значительно возросшей противовирусной активности.

Образование иммунного интерферона является ярким примером сочетанного участия неспецифических и специфических факторов противовирусного иммунитета.

В наиболее ответственный ранний период развития болезни, предшествующий формированию специфического иммунитета, неспецифическая защита восприимчивого организма с помощью интерферона дополняется и усиливается участием ингибиторов крови и барьерных жидкостей, а также температурного фактора, способствующих более легкому течению вирусной инфекции и выздоровлению.

Т-вирусьнейтрализующие бета-ингибиторы. Ингибиторы вступают с вирусом в обратимый нейтральный комплекс, из которого удается полностью реактивировать вирус после непродолжительного контакта (1–2 ч) с 0,25% трипсином. Более длительный контакт вируса с бета-ингибиторами в присутствии кофактора приводит к необратимой инактивации вируса. Сам кофактор лишен биологической активности, но резко усиливает действие бета-ингибитора, вызывая необратимые повреждения вирусной частицы.

Активность сывороточных факторов находится в обратной зависимости от вирулентности испытуемого вируса для гомологичного вида животных.

Известно, что понижение температуры тела лабораторных животных понижает метаболизм, циркуляцию периферической крови, иммунологические и воспалительные реакции. Все это способствует развитию стресса и отягощению вирусных инфекций. Напротив, повышение температуры тела способствует смягчению вирусных инфекций. Температурный оптимум репродукции, чувствительность к нейтрализующему воздействию стресса и отягощению вирусных инфекций у большинства вирусов соответствует 37°C репродукция подавляется при 39–40°C, особенно резко у маловирулентных вирусов.

Повышенная температура тела способствует продукции ИФ и усилению резистентности животных к вирусам и специфических реакций иммунитета, что объясняет благоприятное влияние лихорадочной реакции на выздоровление от вирусных инфекций. Интенсивная витаминизация, температурный защитный фактор приобрели значительный интерес как ценный метод усиления продукции интерферона, что повышает устойчивость животных к вирусным инфекциям.

РОЛЬ ФАГОЦИТАРНЫХ ФАКТОРОВ В ПРОТИВОВИРУСНОМ ИММУНИТЕТЕ

Под контролем метода иммунофлуоресценции показан интенсивный и быстрый фагоцитоз гистиоцитами печени мышей различных вирусов, введенных в кровяное русло. Механизм этого явления связан не с фагоцитозом вирусов, а с

интенсивной способностью макрофагов и лимфоцитов, а также эритроцитов и тромбоцитов адсорбировать вирусы на своей поверхности. Несмотря на незавершенный характер фагоцитоза вирусов из-за высокой их устойчивости к лизосомальным протеазам и другим ферментам фагоцитарных клеток, изоляция возбудителей в цитоплазме макрофагов препятствует их репродукции и быстро завершается инактивация под воздействием температуры тела.

Ограниченное участие фагоцитарных факторов в защите против вирусных инфекций подтверждает также отсутствие или слабое развитие воспалительных реакций в легочной ткани иммунных животных, подвергнутых массивной реинфекции. В равных условиях повторное введение в легкие иммунных животных бактерий или агентов из группы орнитоза сопровождается мобилизацией фагоцитарных клеток, осуществляющих основное разрушение возбудителей. Поэтому фагоцитарные факторы играют соподчиненную роль в подавлении вирусных инфекций в иммунном организме, уступающую по значению защитной роли специфического гуморального и клеточного лимфоцитарного иммунитета.

В последние годы для изучения фагоцитоза вирусов широко используют хорошо контролируемую модель макрофагов перитонеальной полости или селезенки, культивируемых в синтетических средах. В культуре макрофагов происходит интенсивный фагоцитоз и разрушение бактерий и микробов группы Бедсония (например, возбудителей менингопневмонии и пневмонии белых мышей). Модель культивируемых макрофагов оказалась неактивной против вирусов даже достаточно крупных размеров (вирусы осповакцины, паротита, кори, гриппа). Фагоцитоз хорошо воспроизводится в случае введения в культуру макрофагов фрагментов зараженных вирусами клеток, которые интенсивно захватываются и проникают в их цитоплазму. Однако это не нарушает жизнеспособности фагоцитированных вирусов в цитоплазме макрофагов.

Отмытые от антител макрофаги перитонеального экссудата иммунизированных мышей дифференцируют клетки куриных фибробластов, зараженных гомологичным или гетерологичным вирусом. Клетки с гомологичным вирусом

фагоцитируются много интенсивнее, чем клетки с гетерологичным вирусом.

Мобилизация фагоцитарных клеток в брюшной полости иммунных мышей способствовала понижению их смертности от вируса Лангат, если последний вводили не в виде свободных частиц, а в виде суспензии зараженных куриных фибробластов.

В этих условиях макрофаги проявляют дифференцированное отношение к возбудителю в зависимости от генетических особенностей хозяина. Так, различная возрастная устойчивость людей к вирусу простого герпеса связана с высоким уровнем барьерной функции. Макрофаги новорожденных интенсивно диссеминируют репродуцирующий вирус на чувствительные клетки, тогда как макрофаги взрослых прочно удерживают размножившийся вирус и не передают контактирующим макрофагам и другим чувствительным клеткам.

В последние годы раскрыта важная роль пиноцитоза вирусов в проникновении вирусных частиц не только в чувствительные, но и в резистентные клетки. Для ряда вирусов пиноцитоз явился важным механизмом заражения чувствительных клеток, в связи с чем многие авторы считают его особой формой фагоцитоза вирусов. Подобно тому, как фагоцитоз бактерий оказывается разновидностью нормального питания мезенхимных клеток, пиноцитоз вирусов они считают вариантом белкового питания.

Распространение понятия фагоцитоза на явления пиноцитоза реально по следующим соображениям — фагоцитарные процессы носят выраженный защитный характер, при завершеном фагоцитозе происходит полное разрушение поглощенных бактерий, при незавершеном фагоцитозе их изоляция бесполезна для зараженного организма. В то же время пиноцитоз не осуществляет защитных функций, а является этапом функции вирусов, обязательным звеном патогенеза вирусной инфекции — преддверием гибели или нарушения жизнедеятельности чувствительной клетки. Процессы фагоцитоза не сопоставимы по своей высокой эффективности с весьма низкой активностью пиноцитоза, уступающего во много раз фагоцитозу как по общему количеству захваченных частиц, так и по регулярности этого процесса. Фагоцитарные реакции строго спе-

циализированы в отношении состава участвующих в них клеток, тогда как явления пиноцитоза универсальны и распространяются на все разновидности чувствительных к вирусу тканей, включая сюда нервные, эпителиальные клетки.

Фагоцитарные реакции направлены против сравнительно крупных частиц клеточной организации. Объектом пиноцитоза являются частицы молекулярных размеров, не способные вызвать реакции со стороны фагоцитарных клеток.

Известные сейчас 20 основных семейств царства вирусов (6 семейств ДНКового и 14 семейств РНКового подцарства) можно условно разделить по особенностям развивающегося иммунитета у людей или животных на 5 различных групп. В *первую* из них входит группа высоко иммуногенных вирусов, таких как возбудитель оспы, кори, ветряной оспы, паротита, краснухи, многих арбовирусных инфекций, полиомиелита и др., сочетающих интенсивное и кратковременное размножение в различных органах хозяина с быстрой и эффективной мобилизацией механизмов гуморальной и клеточной специфической защиты. Происходит полная и радикальная стерилизация организма от внедрившихся вирусов, сопровождающаяся развитием многолетнего, обычно пожизненного иммунитета, исключая опасность повторных заражений.

Вторая, столь же многочисленная группа вирусов с умеренной иммуногенной активностью, также вызывает острое и циклическое, но менее генерализованное взаимодействие, завершающееся быстрой стерилизацией организма с развитием менее напряженного и продолжительного иммунитета, срок которого ограничен несколькими годами или даже месяцами. Сюда относится большая часть респираторных и часть кишечных вирусов, способных вызывать повторную инфекцию идентичной этиологии.

Третья весьма обширная по составу группа персистирующих вирусов представлена двумя основными подгруппами. Представителями первой подгруппы являются некоторые высоко иммуногенные вирусы, такие как корь или ветряная оспа, преодолевшие в связи с их высокой нейротропностью губительное воздействие специфических факторов иммунитета и закрепившиеся в ганглиях и нейронах спинного мозга в форме латентного

вирусоносительства. Рецидивирующее под влиянием неизвестных условий размножение вируса кори вызывает смертельное осложнение — острый склеротизирующий панэнцефалит, встречающийся не чаще, чем у одного из 100 000 переболевших корью детей. Периодическое обострение латентного носительства вируса ветряной оспы приводит к достаточно частым рецидивам инфекции с синдромом опоясывающего лишая. Как объяснить успешное переживание вирусов кори и ветряной оспы при наличии весьма напряженного гуморального иммунитета? Циркулирующие в крови и спинномозговой жидкости вируснейтрализующие антитела не инактивируют вирусы, локализованные внутри нейронов и распространяющиеся по нервным стволам от клетки к клетке. Этому способствует патология специфической клеточной защиты (аплазия тимуса и другие недостатки лимфатической системы).

К этой же категории персистенции высоко иммуногенных вирусов следует отнести вирус клещевого энцефалита. Если персистирование возбудителей самостерилизующихся инфекций, таких как вирусы кори или ветрянки, является достаточно редким осложнением в естественных условиях развития инфекции, то моделирование этого процесса в искусственных условиях клеточных культур, лишенных всяческих специфических гуморальных и клеточных факторов защиты, осуществимо в экспериментальных условиях практически с любым вирусом.

Вторая подгруппа включает представителей строго персистирующих возбудителей из семейства арена- и герпес-вирусов, у которых хроническое или латентное течение естественно развивающихся и экспериментально вызванных инфекций является их типичным признаком. Прототипом этой подгруппы персистирующих вирусных инфекций может служить семейство арена-вирусов с 10 различными видами, среди которых особенно широко используется модель лимфоцитарного хориоменингита мышей, передающегося как вертикально от зараженных самок, так и горизонтально при постнатальном инфицировании по контакту восприимчивых животных.

Низкая эффективность гуморального иммунитета проявляется в группе вирусов либо в связи со строгим внутриклеточ-

ным распространением возбудителей (от клетки к клетке, внутри нейронов), либо формированием дефектных антител, представленных иммуноглобулинами с низкой или негативной активностью. Соединяясь с вирусом, эти антитела формируют неполноценные иммунные комплексы из вирусов и антител, вызывающие закупорку почечных гломерул и мелких сосудов. Клеточный иммунитет, развивающийся под воздействием персистирующих вирусов, характеризуется частым формированием патологического комплекса, при котором как антитела, так и сенсibilизированные лимфоциты и макрофаги превращаются в отрицательный фактор, не подавляющий, а провоцирующий усиление репродукции возбудителей и тяжести болезни, в связи с чем их пассивный перенос провоцирует отягощение болезненного процесса, а воздействие иммунодепрессантов оказывает положительное влияние.

На другом полюсе находится *четвертая* группа вирусов, ответственных за медленно прогрессирующие инфекции. Их вирусы, полностью лишённые иммунологической активности, не способны стимулировать развитие гуморальных и клеточных реакций. Заболевания характеризуются многолетним инкубационным периодом и прогрессирующим поражением нейронов и серого вещества без каких-либо признаков воспалительной реакции в любой стадии этих уникальных хронических инфекций.

Вирусы скрепи овец и коз, энцефалопатии норок, болезней Крейцфельд–Якоба и Куру у человека лишены всякой иммуногенности, не чувствительны к интерферону и не способны его индуцировать, не реагируют на воздействия, как стимулирующие, так и подавляющие иммунный ответ. Природа возбудителя скрепи и других представителей этой группы еще не расшифрована. Согласно одному предположению, возбудитель скрепи представляет небольшую молекулу свободной нуклеиновой кислоты, защищенную от посторонних воздействий тесной связью с клеточными мембранами. Другое предположение объясняет своеобразие возбудителей медленно прогрессирующих вирусных инфекций антигенной идентичностью белков вируса и его хозяина. Паразит строит свое белковое покрытие из готовых белков человека, мышцы. Поэтому организм хозяина

лишен возможности контролировать размножение вируса, не вызывающего каких-либо антигенных реакций.

Последняя, *пятая*, группа вирусов представлена онкогенными вирусами ДНКовой и РНКовой природы, вызывающими у восприимчивых животных развитие злокачественного роста в форме генерализованных опухолей. Основой патогенеза является интеграция вирусных ДНК или ДНКовых копий вирусной РНК с геномом клетки хозяина, что приводит к опухолевой трансформации нормальных клеток. Иммунологическая защита обеспечивается преимущественным участием клеточно-обусловленных факторов, реализующих распознавание чужеродных опухолевых клеток и их удаление с помощью лимфоцитарно-макрофагальной системы.

В случае выделения вирусов, ответственных за развитие лейкозов и других форм злокачественных опухолей, у человека могут развиваться методы иммунопрофилактики, аналогичные успешному предупреждению опухолей у сирийских хомячков, вызванных вирусами полиомы, SV₄₀ онкогенными аденовирусами.

Причины столь широких колебаний эффективности приобретенного противовирусного иммунитета — от пожизненной защиты до полного ее отсутствия и болезни — недостаточно раскрыты и могут объясняться особенностями взаимодействия различных групп вирусов с лимфоцитарно-макрофагальной системой восприимчивых животных и людей.

УСЛОВИЯ АКТИВНОСТИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ И СПЕЦИФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ЗАЩИТЫ

Эффективность защитных механизмов против вирусных инфекций зависит в первую очередь от периода заболевания, который может быть связан с началом его развития, с выздоровлением или же с повторной реинфекцией. Понятно, что предшествующие *факторы неспецифической резистентности* лучше проявят себя на самом раннем этапе первичного инфекционного процесса, когда специфические механизмы еще не успели сформироваться. Главная линия обороны при пер-

вичной инфекции реализуется за счет немедленного включения таких неспецифических факторов, как барьерные механизмы кожи и слизистых оболочек, интерферон, фагоцитоз инфицированных клеток, ингибиторы секретов и лихорадочная реакция. Окончательное выздоровление, т. е. прекращение острой стадии болезни с последующей стерилизацией организма от возбудителя, обеспечивается участием специфических механизмов, достигающих состояния высокой активности через 14 дней.

Специфические механизмы защиты вступают во взаимодействие с первично возникшим вирусным процессом сравнительно медленно, когда в организме уже создались массивные очаги внутриклеточного вируса, недоступные для воздействия антител, но подвергающиеся успешной элиминации и уничтожения при участии макрофагов и лимфоцитов иммунной системы.

Специфические механизмы проявляют себя наиболее эффективно при реинфекции, вызванной возбудителем близкой или идентичной структуры. Находясь в состоянии полной готовности, они отражают новую атаку вируса с наибольшим совершенством, немедленно и самостоятельно купируя репродукцию возбудителя при оптимальном участии неспецифических факторов. В этом процессе ведущая роль принадлежит вируснейтрализующим антителам, при вспомогательном участии кооперативного действия макрофагов, В- и Т-лимфоцитов и комплемента. В период инкубации и первых дней болезни вся оборона входных ворот и чувствительных органов обеспечивается врожденными механизмами без участия еще отсутствующих иммунологических ресурсов организма.

Нужно иметь в виду, что доминирование специфической защиты при реинфекции людей и животных, располагающих достаточным иммунитетом, не происходит без включения в борьбу факторов неспецифической резистентности, которые способны ответить на новую атаку вируса быстрой мобилизацией интерферона и иммунных макрофагов.

Продолжительное, часто пожизненное сохранение иммунологической памяти связано с длительным переживанием иммунного клона лимфоцитов, интенсивно и очень быстро

реагирующего на повторную встречу с гомологичным антигеном восстановления продукции антител или состояния гиперчувствительности замедленного типа. Уровень ответных реакций при иммунологической памяти значительно превосходит их интенсивность при первичном взаимодействии, если антиген взят в форме хорошо резорбирующегося растворенного комплекса или инактивированной вакцины. Живые вирусные вакцины при повторном их введении могут не вызвать стимуляции иммунологической памяти («анамнестических реакций», по старой терминологии), поскольку необходимая для этого репродукция вируса немедленно подавляется циркулирующими антителами. Носителями иммунологической памяти являются специальные клоны лимфоцитов, отличающиеся долгой продолжительностью жизни от короткоживущих плазматических клеток, продуцирующих антитела.

Совершенство специфической защиты против различных семейств вирусных агентов зависит от *иммуногенной активности возбудителя*, определяющей результаты еще недостаточно изученного взаимодействия вирусов с лимфоцитами и макрофагами. Характер этого взаимодействия может объяснить указанные выше огромные различия в способности организма людей подавлять репродуктивную активность возбудителя, устранять внутри- и внеклеточные резервуары возбудителя и формировать длительный иммунитет.

Взаимодействие различных групп вирусов с В- и Т-лимфоцитами человека *in vitro* может сопровождаться их репродукцией с сохранением или гибелью сенсibilизированного клона или же не давать репродукции даже при стимуляции деления лимфоцитов фитогемагглютинином. Особенное внимание привлекает интересный факт, согласно которому все вирусы, наделенные высокой иммуногенностью (оспа, корь, паротит, желтая лихорадка), хорошо размножаются в лимфоцитах из крови человека. Вирусы второй группы, наделенные умеренной иммуногенностью (грипп, парагрипп и др.), в тех же лимфоцитах не репродуцируются. Эти различия в репродукции высоко- и умеренно иммуногенных вирусов в пуле лимфоцитов из циркулирующей венозной крови заслуживают внимания не только как причины регулярной виремии при оспе, кори, паротите

и отсутствия или редкости виремии при гриппе, парагриппе, риновирусной инфекции. Выяснение этих различий в репродукции высоко и умеренно иммуногенных вирусов первой и второй группы на модели иммунокомпетентных Т- и В-лимфоцитов, участвующих в защитных реакциях против конкретных вирусов, поможет раскрыть еще не выясненные механизмы долговременной иммунологической защиты, а также персистенции вирусов человека и животных.

Одной из возможных причин прочного многолетнего иммунитета может оказаться интеграция нуклеиновой кислоты интенсивно репродуцирующегося вируса с ДНК специфического клона лимфоцитов, в результате которой ведущие антигенные детерминанты возбудителя продолжают длительно синтезироваться и после элиминации соответствующего вируса. Возможно, что у вирусов второй группы интеграции не происходит и сохранение проантител, иммунокомпетентных Т-лимфоцитов оказывается столь же кратковременным, как при стимуляции иммуногенеза инактивированными вирусами первой или второй группы.

Интенсивная репродукция в лимфоцитах большинства персистирующих вирусов может приводить к разрушению или глубокому травмированию соответствующих им специфических клонов, что и определяет дальнейшее выключение защиты или же ее частичный паралич, неодинаково выраженный для тимузависимых и независимых лимфоцитов.

Тесная связь между Т-лимфоцитами подтверждается наличием у различных клеток двух противоположных функций: одни усиливают, а другие подавляют иммунный ответ.

Уровень противовирусной активности распределенных в организме Т-лимфоцитов и макрофагов еще очень слабо изучен. По некоторым данным, клеточные популяции, взятые непосредственно из тимуса, селезенки и лимфатических органов иммунизированных животных, обладают значительно меньшей цитотоксической активностью, чем Т-лимфоциты и макрофаги крови из воспалительных инфильтратов, в которых избирательно стимулируются наиболее активные представители иммунокомпетентных клеток. Одинаковое положение занимают Т-лимфоциты и макрофаги трахеально-бронхиального секрета

животных, иммунизированных интраназально, активно участвующие вместе с секреторными антителами в формировании местного иммунитета. Стимуляция иммунологической системы под воздействием вирусных антигенов имеет свои ограничения.

Поэтому стимуляция иммунного ответа не является единственной альтернативой защитных реакций организма. Часто возникает обратная необходимость подавления клеточных реакций без воспроизведения иммунологической толерантности как механизма врожденного генетического несовершенства иммунологической защиты. Иммунологическая супрессия достигается естественной саморегуляцией интенсивности ответных реакций при участии Т-лимфоцитов — супрессоров. Этим ограничивается вредное влияние полноценного иммунологического ответа на развитие иммунопатологических болезней, а также на отторжение искусственных пересадок органов и тканей.

Супрессорные клетки (макрофаги и прилипающие к стеклу Т-лимфоциты) снимают стимулирующий пролиферацию эффект фитогемагглютина, подавляют активность лимфоцитов к продукции антител и киллерному эффекту. Спленоциты мышей, зараженных вирусами саркомы или лейкемии, резко ослабляют их активность к своему антигену или ФГА. Выделяя фракцию клеток, прилипающих к стеклу, удавалось ингибировать добавлением этих клеток активность нормальных спленоцитов. Супрессорные клетки нарушают развитие замедленной сверхчувствительности к неонкогенным вирусам и способствуют утрате хелперной функции Т-лимфоцитов.

ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Участие сенсibilизированных Т-лимфоцитов и макрофагов в развитии вирусных инфекций проявляется наиболее демонстративно формированием периваскулярных воспалительных инфильтраций мононуклеарными клетками в участках размножения вируса и повреждения чувствительных клеток. При остро протекающих самостерилизующихся инфекциях, сопровождающихся развитием иммунитета, воспали-

тельные реакции обычно трактовались как неспецифический ответ на клеточные повреждения. В действительности воспалительные процессы играют в этом случае высоко полезную защитную роль, являясь специфической клеточно-обусловленной иммунной реакцией на вирусную инфекцию. При хронических персистирующих вирусных инфекциях развитие воспалительных реакций отсутствует или заторможено, причем формирование их носит выраженный иммунопатологический характер.

Важная защитная роль воспалительных реакций легко подтверждается в следующих экспериментах на сингенных мышях, воспроизводящих развитие острых циклических инфекций и прочного иммунитета после заражения вирусами осповакцин, гриппа, клещевого энцефалита или же провоцирующих хроническую персистирующую инфекцию с формой защиты (лимфоцитарный хориоменингит и др.).

Применение иммунодепрессантов (циклогексимид, антилимфоцитарная сыворотка, облучение рентгеном, тимэктомия) подавляет развитие воспалительных реакций, резко отягощая поэтому течение самостерилизующихся вирусных инфекций, но весьма заметно облегчая тяжесть персистирующих болезней. Известно, что иммунодепрессанты угнетают бласттрансформацию Т- и В-лимфоцитов и деление иммунных макрофагов, парализуя при этом и формирование гуморального иммунитета.

Адаптивный перенос лимфоцитов и макрофагов от иммунных мышей зараженным сингенным животным способствует, как и перенос антител, значительному облегчению тяжести развивающегося вирусного процесса. Аналогичное мероприятие у животных с персистирующей хронической формой вирусной инфекции провоцирует ее отягощение.

Изучение клеточного состава воспалительных инфильтратов при острых иммунизирующих инфекциях указывает на доминирование в них сенсibilизированных Т-лимфоцитов, которые избирательно концентрируются в очагах скопления вируса в зараженных клетках.

Показана более высокая защитная активность лимфоцитов и макрофагов, полученных из воспалительных трахеобронхиальных

или перитонеальных инфильтратов, чем из селезенки сингенных мышей, первично подготовленных внутрибрюшинной иммунизацией вирусом гриппа А и реинфицированных повторно интраназально (под легким эфирным наркозом) либо внутрибрюшинным путем. Наиболее высокую защиту обеспечивало в этих условиях введение иммунной сыворотки, превосходившее эффект раздельно или совместно введенных лимфоцитов и макрофагов.

Быстрое обогащение воспалительных инфильтратов моноцитарными клетками крови показано на модели малопатогенного нейротропного вируса. Проводилось маркирование клеток крови (за разные сроки до и после заражения) введением в кровь меченного по H^3 тимидина. Ауторадиографическое изучение крови и мозга установило существенную разницу в активности между моноцитарными клетками крови и воспалительного очага (25 и 90% соответственно). Это указывало либо на происходящее в очаге быстрое деление моноцитарных клеток, либо на селективный их приток в очаг воспаления.

Возможно, что первоначальная быстрая миграция лимфоцитов в зону воспалительного очага является неспецифическим процессом. Возрастающее взаимодействие специфически sensibilizированных лимфоцитов с вирусными антителами стимулирует выделение лимфоцитарных медиаторов, избирательно усиливающих миграцию дополнительных масс мононуклеарных клеток в сторону воспаления.

Особенно важен процесс подавления миграции макрофагов медиаторами Т-лимфоцитов, что обеспечивает удержание в зоне воспалительного очага наиболее важных и высоко активных макрофагов.

Деление специфических защитных факторов на гуморальные и клеточные является достаточно условным, учитывая, что продукция антител неразрывно связана с совместным участием основных клеточных групп иммунной системы. Однако возможность изолированного получения и практического использования отдельных классов антител обеспечивает точную дифференцированную оценку их защитной роли раздельно от лимфоцитов и макрофагов.

Наиболее убедительным показателем постоянного сочетанного участия антител и иммунокомпетентных клеток макро-

фагально-лимфоидной системы в защите против вирусных инфекций является регулярное развитие реакций, происходящих с участием компетентных клеток. Исследования последних начальный период реакций, связанный с участием лимфоцитарных клеток, быстро сменяется усилением удельного веса иммунокомпетентных а также макрофагов, стимулированных возбудителем. Воспалительные инфильтрации в зоне поражения представляют в связи с этим нарастающую аккумуляцию иммунокомпетентных до более активных в осуществлении защитных лейкоциты селезенки, лимфатических органов.

Известно, что воздействие активных иммунокомпетентных клеток, таких как антилимфоцитарная сыворотка или адъюванты, сопровождается в первую очередь подавлением защитных реакций, с участием которых связана особенно специфическая, а возможно и неспецифическая защита в угрожаемых зонах взаимодействия возбудителя с организмом.

Защита восприимчивого организма против вирусных инфекций обеспечивается сочетанным участием как специфических факторов, способных ограничить репродукцию возбудителя болезни. Иммунитет, обусловленный факторами неспецифической резистентности, характеризуется взаимодействием с вирусными агентами не сразу, а только после внедрения возбудителя, носит временный характер и своеобразие по сравнению с аналогичной неспецифической антибактериальной защитой.

Это касается в первую очередь влияния на организм возбудителя, определяющей интенсивность его действия в чувствительных тканях и уровень его действия вируса на клетки-мишени и на организм в целом от территории первичного удара.

До сих пор недостаточно выяснены механизмы клеточной непереносимости, по-видимому, обусловленные различными видами возбудителя. В одних случаях трудности адсорбции и проникновения, в других (особенно важным) нарушен процесс деградации возбудителя.

большинства возбудителей воспалительных заболеваний. Исследования иммунокомпетентных клеток показали, что в зоне поражения неспецифическим возбудителем непрерывным воздействием лимфоцитов, макрофагов, а также более пораженных клеток, происходит концентрация клеток, выполняющих защитные функции, чем в здоровом организме.

Исследования на животных, особенно на депрессантах, показали, что применение клофосфамидов, а также других иммунодепрессантов, способствует снижению защитных функций организма.

Исследования на животных показали, что в зоне поражения вирусных инфекций неспецифическая резистентность характеризуется подавлением или отсутствием защитных функций организма, обусловленных взаимодействием возбудителя с организмом. Это касается в первую очередь влияния на организм возбудителя, определяющей интенсивность его действия в чувствительных тканях и уровень его действия вируса на клетки-мишени и на организм в целом от территории первичного удара.

Исследования показали, что в зоне поражения вирусных инфекций неспецифическая резистентность характеризуется подавлением или отсутствием защитных функций организма, обусловленных взаимодействием возбудителя с организмом.

Исследования показали, что в зоне поражения вирусных инфекций неспецифическая резистентность характеризуется подавлением или отсутствием защитных функций организма, обусловленных взаимодействием возбудителя с организмом.

называемое раздевание на два основных биополимера — НК и белок, в третьих — процессы транскрипции и трансляции, в четвертых — сборка или выходение вирионов из зараженной клетки. Если мобилизация различных способов защиты человека и животных происходит в строгом соответствии с особенностями вируса и его репертуаром, то уровень тяжести вирусной инфекции зависит в одинаковой степени и от организма. В этом вопросе важная роль принадлежит клеточной резистентности, с участием которой не только решается вопрос о том, быть или не быть клеточной инфекции, но и в какой форме она разовьется — в бессимптомной или манифестной; если в бессимптомной, то в какой именно — созреванием вируса до зрелых частиц или же в менее совершенной форме abortивной инфекции, когда у вируса гриппа обнаружена репликация только отдельных генов, кодирующих синтез соответствующих им полипептидов. Вирулентность возбудителя играет очень важную роль в отношении судьбы вирусной акции, однако в период эпидемий гриппа, полиомиелита, паротита принято считать, может быть, и неправильно, что уровень вирулентности вирусов является величиной постоянной для каждого штамма и что колебания в тяжести и форме индивидуальных заболеваний зависят от состояния индивидуального иммунитета, определяется совокупностью защитных механизмов неспецифической резистентности. Наряду с клеточной резистентностью в этой кооперации участвуют особенно эффективно фагоцитоз зараженных вирусами клеток и система интерферона.

Макрофагальный фагоцитоз играет важную роль в осуществлении прямого захвата и энзиматического переваривания бактериальных агентов при участии макрофагов и полинуклеаров в сочетании с опсонинами и бактериотропинами. Фагоцитарные механизмы играют важную роль и в защите против вирусных инфекций, однако их мишенью являются не сами вирионы, а зараженные ими клетки. В этой связи полиморфноядерные лейкоциты, активные в фагоцитозе тканевых элементов, не играют существенной роли и в защитных реакциях против вирусных инфекций, каковая принадлежит макрофагам, фиксированным в селезенке, печени, легких и других органах, а также моноцитам. Макрофагальному фагоцитозу принадлежит важное участие в

захвате, изоляции и последующей инактивации скоплений вирусных частиц, сосредоточенных в альтерированных эпителиальных, соединительнотканых, лимфоидных и других клетках.

Интенсивность и эффективность этого процесса прогрессивно нарастает по мере усиления неспецифического фагоцитоза кооперации с Т-лимфоцитами, которые инактивируют зараженные клетки и делают их более доступными для захватывания макрофагами. Адсорбируя антитела, макрофаги превращаются в более зрелые иммунные фагоциты, играющие выдающуюся роль в освобождении организма от мощных резервуаров вируса в пораженных клетках и в регуляции защитных киллерных и других функций Т- и В-лимфоцитов.

Важную роль в фагоцитарной защите играют моноциты крови. Они созревают в процессе деления своих предшественников в костном мозгу и задерживаются в крови лишь на короткое время (порядка одного дня), после чего мигрируют в селезенку, печень и другие органы для замены фиксированных макрофагов. Если организм поражен вирусной инфекцией, моноциты крови быстро притекают вместе с Т-лимфоцитами в очаги репродукции возбудителя и организуют защитные воспалительные реакции.

Нередко вирусы размножаются в макрофагах, что резко ослабляет их защитную роль. Таковы возбудители многих хронических персистирующих вирусных инфекций, при которых клетки иммунной системы — макрофаги и лимфоциты — доступны для репродукции вирусов, что создает особо благоприятные условия для подавления специфических защитных механизмов и перехода инфекционного процесса в хроническое состояние.

Резкое усиление интенсивности первоначальной неспецифической фагоцитарной защиты за счет включения специфических факторов связано с пролиферацией и накоплением иммунных клонов В- и Т-лимфоцитов, а также с повышением активности макрофагов, переходящих в иммунное состояние за счет адсорбции антител.

Аналогичная преемственность между неспецифическими и специфическими механизмами наблюдается в отношении важнейшего защитного противовирусного фактора — интерферона (ИФ).

Непрерывный умеренный биосинтез ИФ поддерживается за счет пролиферации Т-лимфоцитов и бессимптомных инфекций, вызванных респираторными, кишечными и другими вирусами (особенно часто у детей). Уровень ИФ резко возрастает в первые дни острых вирусных инфекций, что зачастую обеспечивает купирование инфекционного процесса на 3–4-й день острого периода за счет интенсивной продукции ИФ и макрофагального фагоцитоза. Значительно усиливается биосинтез качественно более активного клеточного ИФ при реинфекции гомологичным вирусом, мобилизующим выработку 100 и более кратных количеств этого ингибитора специфическими сенсибилизированными Т-лимфоцитами и макрофагами. На примере с ИФ подтверждается тесное взаимодействие между неспецифическими и специфическими защитными факторами, а также весьма значительное усиление первоначальной умеренной продукции ИФ за счет участия специфически сенсибилизированных Т-лимфоцитов.

Существенное усиление умеренной исходной эффективности фагоцитоза зараженных вирусами клеток и интерферона в период выздоровления или реинфекции отражает сходство динамики этих механизмов с антителами и клеточно-обусловленными иммунологическими факторами, подчеркивая их тесную взаимосвязь с процессом выздоровления и защиты. Следующим активным фактором неспецифической противовирусной защиты являются неспецифические вирусингибирующие бета-ингибиторы нормальных сывороток и секретов людей и животных. Их вируснейтрализующая активность, в отличие от антител, быстро исчерпывается в разведениях 1:5 — тогда как антигенагглютинирующая активность сохраняется в разведениях 1:160 и выше. Помимо сывороток людей, бета-факторами богаты сыворотки кроликов, морских свинок, белых мышей. Они выделяются при фракционировании по Жону в составе липопротеинов, составляющих около 10% общей массы сыворотки, имеют подвижность, по данным электрофореза, быстрых гамма- или медленных бета-глобулинов, с константой седиментации 10–198. Молекулярная масса, по данным ультрацентрифугирования в градиенте сахарозы, составляет 80–100 кДа. Наиболее чувствительными к инактивирующему воздействию

сывороточных ингибиторов оказались вирусы гриппа серотипов А и В, другие орто- и парамиксовирусы, кишечные вирусы. Среди ДНК природы чувствительность к бета-ингибиторам проявляют аденовирусы и вирусы герпеса.

В динамике заболевания людей гриппом не отмечается количественного прироста уровня бета-ингибиторов в периоде выздоровления, как это установлено для интерферона или для активного макрофагального фагоцитоза. Содержание бета-ингибиторов больных гриппом людей может понижаться, может восстанавливаться, но заметного и регулярного прироста концентрации защитного фактора не наблюдается. Полезный профилактический эффект бета-ингибиторов обеспечивается их индивидуальной концентрацией в сыворотке и секретах к моменту встречи с возбудителем. Содержание их колеблется в разные периоды года, достигая наивысших концентраций летом и осенью, доходя до минимального уровня зимой и весной. Введение витаминов (С и др.) способствует повышению уровня ингибиторов в крови лабораторных животных, что, по-видимому, объясняет сезонные колебания их защитной активности у населения.

ИФ, сывороточные ингибиторы менее активны в эксперименте при взаимодействии с высоко вирулентными вирусами, однако сохраняют способность положительно влиять на заболеваемость и тяжесть клинического течения в период крупных эпидемий гриппа.

Если комплекс неспецифических защитных факторов оказывается недостаточным для подавления репродукции вирусного агента в чувствительных клетках, в действие вступают специфические механизмы противовирусного иммунитета, опирающиеся на кооперативное участие сывороточных и секреторных антител, а также иммунокомпетентных лимфоцитов и макрофагов. Их функции направлены на быстрое ограничение дальнейшей генерализации возбудителя и на освобождение организма от скоплений крупных концентраций вируса в зараженных чувствительных клетках. Для этого вируснейтрализующие антитела *блокируют инвазию вируса в клетки*, оставшиеся незараженными. Т-лимфоциты и макрофаги удаляют сформированные резервуары вируса во входных воротах инфекции и во всех органах за их границами.

Специфические факторы защиты формируются синхронно под воздействием развивающейся вирусной инфекции еще в инкубационном периоде и во время развития острой формы болезни, достигая полезной для организма активности на 5–7-й день после окончания инкубационного периода. В это время в крови больного определяются в непрерывно возрастающей концентрации антитела класса М как показатель менее эффективной острой фазы гуморального иммунитета. Они быстро заменяются к 10–14-му дню болезни антителами класса IgG, наиболее активного и долговременного фактора специфической гуморальной защиты, сохраняющегося при большинстве самостерилизующихся острых циклических вирусных инфекций в течение многих последующих лет. Во входных воротах синхронно формируются секреторные иммуноглобулины класса IgA, избирательно адсорбирующие на наружную оболочку восприимчивых клеток мерцательного эпителия и формирующие здесь труднопроходимый барьер для инвазии вируса. Существует вполне отчетливое разделение защитных функций между секреторными и сывороточными антителами: первые выполняют важную противозидемическую задачу — предупреждение захвата входных ворот и формирование здесь очага рассеивания вируса во внешнюю среду. Сывороточные антитела подавляют виремию, препятствуя генерализации вируса в другие чувствительные органы и нейтрализуя его токсические белки. Накопление секреторных и сывороточных антител происходит синхронно под воздействием идентичного инфекционного процесса, в связи с чем более точное обследование сывороточных антител представляет достаточно достоверную информацию о состоянии секреторной защиты, формирующейся наиболее активно в ответ на репродукцию возбудителя или живые вакцины. Важная защитная роль секреторных IgA проявляется также в купировании опасности реинфекции во входных воротах, где происходит накопление заразного материала и его распространения на новые группы восприимчивого населения.

Ценным дополнением к обычному иммунитету являются доказательства возможности переноса состояния повышенной гиперчувствительности с помощью активных лимфоцитов иммунизированных животных без участия в этом процессе им-

мунной сыворотки. Иммунологическая роль лимфоцитов подчеркнута физиологическими наблюдениями о непрерывной рециркуляции лимфоцитов из крови к лимфатическим железам, а отсюда через отводящие лимфатические сосуды и главный лимфатический проток обратно в ток крови.

Открытие в 1961 г. роли *тимуса* в подготовке специальной популяции иммунокомпетентных тимусзависимых лимфоцитов, участвующих в отторжении генетически чужеродных кожных трансплантатов, привело к разработке методики тимэктомии, доказав важную роль Т-лимфоцитов в киллерных реакциях, а также (совместно с В-лимфоцитами) в синтезе антител. Анализ врожденных недостатков иммуногенеза у детей, таких как синтез гамма-глобулинов, установил их органическую связь с функциональными дефектами иммунной системы, оказывающими влияние на течение вирусных инфекций. Это влияние выражено при нарушениях синтеза антител, но более плачевно при дефектах в функции тимуса. В последние годы было доказано, что клеточно-обусловленные реакции могут являться, как и антитела, патологическим компонентом приобретенного иммунитета при хронически протекающих вирусных инфекциях.

Таким образом, главным отличием вирусных инфекций с самостерилизующимся механизмом иммунитета является способность организма радикально подавлять и прекращать начавшуюся репродукцию вирусных агентов, исключив последнюю всесторонним и долговременным поддержанием высокого уровня *факторов специфической защиты*. Некоторым выходом из создавшегося положения для возбудителя, обреченного на тотальное разрушение, может явиться лишь адаптивная изменчивость его поверхностных белков, перестающих реагировать на разрушающее воздействие вируснейтрализующих антител. Такой выгодный маневр особенно регулярно используют вирусы гриппа людей, успешно ускользающие от разрушительного воздействия ими же созданного иммунитета за счет глубоких приспособительных изменений своей антигенной структуры.

Подавляющая масса вирусов, способных к стимуляции эффективного противовирусного иммунитета, лишена столь опасной приспособительной изменчивости, в связи с чем они

Специфические факторы защиты формируются синхронно под воздействием развивающейся вирусной инфекции еще в инкубационном периоде и во время развития острой формы болезни, достигая полезной для организма активности на 5–7-й день после окончания инкубационного периода. В это время в крови больного определяются в непрерывно возрастающей концентрации антитела класса М как показатель менее эффективной острой фазы гуморального иммунитета. Они быстро заменяются к 10–14-му дню болезни антителами класса IgG, наиболее активного и долговременного фактора специфической гуморальной защиты, сохраняющегося при большинстве самостерилизующихся острых циклических вирусных инфекций в течение многих последующих лет. Во входных воротах синхронно формируются секреторные иммуноглобулины класса IgA, избирательно адсорбирующие на наружную оболочку восприимчивых клеток мерцательного эпителия и формирующие здесь труднопроходимый барьер для инвазии вируса. Существует вполне отчетливое разделение защитных функций между секреторными и сывороточными антителами: первые выполняют важную противозидемическую задачу — предупреждение захвата входных ворот и формирование здесь очага рассеивания вируса во внешнюю среду. Сывороточные антитела подавляют вирусемию, препятствуя генерализации вируса в другие чувствительные органы и нейтрализуя его токсические белки. Накопление секреторных и сывороточных антител происходит синхронно под воздействием идентичного инфекционного процесса, в связи с чем более точное обследование сывороточных антител представляет достаточно достоверную информацию о состоянии секреторной защиты, формирующейся наиболее активно в ответ на репродукцию возбудителя или живые вакцины. Важная защитная роль секреторных IgA проявляется также в купировании опасности реинфекции во входных воротах, где происходит накопление заразного материала и его распространения на новые группы восприимчивого населения.

Ценным дополнением к обычному иммунитету являются доказательства возможности переноса состояния повышенной гиперчувствительности с помощью активных лимфоцитов иммунизированных животных без участия в этом процессе им-

мунной сыворотки. Иммунологическая роль лимфоцитов подчеркнута физиологическими наблюдениями о непрерывной рециркуляции лимфоцитов из крови к лимфатическим железам, а отсюда через отводящие лимфатические сосуды и главный лимфатический проток обратно в ток крови.

Открытие в 1961 г. роли *тимуса* в подготовке специальной популяции иммунокомпетентных тимусзависимых лимфоцитов, участвующих в отторжении генетически чужеродных кожных трансплантатов, привело к разработке методики тимэктомии, доказав важную роль Т-лимфоцитов в киллерных реакциях, а также (совместно с В-лимфоцитами) в синтезе антител. Анализ врожденных недостатков иммуногенеза у детей, таких как синтез гамма-глобулинов, установил их органическую связь с функциональными дефектами иммунной системы, оказывающими влияние на течение вирусных инфекций. Это влияние выражено при нарушениях синтеза антител, но более плачевно при дефектах в функции тимуса. В последние годы было доказано, что клеточно-обусловленные реакции могут являться, как и антитела, патологическим компонентом приобретенного иммунитета при хронически протекающих вирусных инфекциях.

Таким образом, главным отличием вирусных инфекций с самостерилизующимся механизмом иммунитета является способность организма радикально подавлять и прекращать начавшуюся репродукцию вирусных агентов, исключив последнюю всесторонним и долговременным поддержанием высокого уровня *факторов специфической защиты*. Некоторым выходом из создавшегося положения для возбудителя, обреченного на тотальное разрушение, может явиться лишь адаптивная изменчивость его поверхностных белков, перестающих реагировать на разрушающее воздействие вируснейтрализующих антител. Такой выгодный маневр особенно регулярно используют вирусы гриппа людей, успешно ускользающие от разрушительного воздействия ими же созданного иммунитета за счет глубоких приспособительных изменений своей антигенной структуры.

Подавляющая масса вирусов, способных к стимуляции эффективного противовирусного иммунитета, лишена столь опасной приспособительной изменчивости, в связи с чем они

становятся в реконвалесценции или после вакцинации объектом радикальной и необратимой стерилизации.

Главной особенностью вирусных инфекций с *хроническим течением* является способность их возбудителей, наделенных низкой цитопатологичностью для клеток хозяина, длительно и интенсивно персистировать с явлениями постоянной виремии. Для своей репродукции эти вирусы используют в первую очередь непрерывное поступление в костер вирусной инфекции миллионов макрофагов и лимфоцитов. Выведение из нормальной деятельности разрушаемых вирусами клеток иммунной системы приводит к резкому падению или полному параличу неспецифической и специфической гуморальной и клеточной защиты, что проявляется ничтожным биосинтезом малоэффективных антител, провоцирующих иммунопатологические реакции, с формированием вредных для организма иммунных компонентов или же в полном отсутствии иммунного ответа. В последние годы предполагают, что возбудители медленно прогрессирующих вирусных болезней (Куру, Крейцфельда-Якоба, скрепи, энцефалопатии пушных зверей) строят наружное покрытие своих вирионов из белков хозяина, чем полностью устраняют стимуляцию какой-либо гуморальной или клеточной специфической защиты со стороны обреченного на гибель организма.

Промежуточное место между двумя крайними группами с высоким иммунитетом и полным его отсутствием занимают *латентные вирусные инфекции*, наделенные способностью к формированию полноценного стерильного иммунитета, от воздействия которого у части инфицированных людей вирус уходит на длительное, многолетнее латентное существование в клетках нервных ганглиев, глии спинного мозга, тройничного нерва, как это установлено при герпесе, ветряной оспе, кори. С различной регулярностью и интервалами времени латентная вирусная инфекция рецидивирует, вызывая повторные симптомы герпес симплекс, коревого склерозирующего панэнцефалита, чему содействует способность многих латентных вирусов распространяться не только путем заражения чувствительных клеток извне, но и через клеточные мембраны соседних с ними пораженных клеток.

ЭМБРИОГЕНЕЗ ИММУННОЙ РЕАКТИВНОСТИ

Много лет назад считалось, что эмбрион иммунологически некомпетентен. Разработка современных методов исследования и расширение числа видов экспериментальных животных изменили эту точку зрения. Первым лимфоидным образованием в эмбриогенезе является вилочковая железа. К моменту рождения ее формирование как функционально полноценного органа иммунитета завершается. Наибольшая активность этого органа как источника периферических Т-клеток наблюдается в первый период постнатального развития. С возрастом происходит инволюция вилочковой железы, сопровождающаяся характерными морфологическими изменениями: уменьшение абсолютной массы, истощение коркового слоя, замена паренхиматозных клеток органа на жировую ткань. Раннее становление иммунологической компетенции эмбрионов демонстрируют опыты с зародышами овец, а также данные о формировании Т- и В-систем иммунитета в эмбриогенезе человека.

Вилочковая железа — наиболее ранний лимфоидный орган, возникающий в процессе зародышевого развития у млекопитающих и птиц. У мышей он формируется из эндодермы II и IV глоточных карманов и до 10-го дня представляет собой значительную плотную массу эпителиальных клеток. К 11-му дню в зачатке органа обнаруживаются первые крупные лимфоидные клетки с выраженной базофилией цитоплазмы. Они мигрируют сюда из желточного мешка, а позднее из эмбриональной печени. Источником предшественников тимоцитов в

в филогенетическом ряду прослеживается единая линия гистогенетических превращений. Суммарные данные об эволюции клеток и органов лимфо-миелоидного комплекса и об эволюции иммунитета позволяют установить связь между совершенствованием системы иммунитета и филогенетическим уровнем, на котором появляются иммунокомпетентные клетки и органы.

Исходя из представлений, что одно из определяющих назначений иммунитета — это борьба с мутационными изменениями клеток тела, можно думать, что иммунитет играл свою стабилизирующую роль не только в процессе индивидуального развития, но и в процессе исторического преобразования форм. Мутационное поражение клеток тела свойственно всем животным независимо от уровня их организации. При этом мутационный риск есть производное количества соматических клеток, которыми обладает данное животное. Из этого следует, что прогрессивная эволюция по линии увеличения количества соматических клеток была бы невозможна без эволюционного прогресса системы контроля за мутационными поражениями клеток. Функцию контроля взяла на себя иммунная система. Сопоставление данных по уровню организации в мире животных с данными об эволюционном становлении различных форм иммунитета позволяет прийти к подобному выводу.

Уже на самых ранних этапах развития (6 недель), когда размер зародыша человека не превышает 12 мм, наблюдается закладка вилочковой железы (ВЖ). К 7-й неделе зачаток ВЖ еще свободен от лимфоцитов и представляет собой лишь ретикулоэпителиальную морфологическую структуру. Большие лимфоциты в органе появляются позднее — через 8 недель внутриутробного развития. У 7-недельного эмбриона имеются лимфоциты в печени, которые способны к реакции в МЛС, а в цитоплазме лимфобластов обнаруживается IgM. В дальнейшем идет постепенное функциональное совершенствование Т- и В-систем иммунитета.

Все многообразие мира животных распадается на два подцарства: *одноклеточных* и *многоклеточных*. Одноклеточные (тип простейшие) возникли, очевидно, на грани двух геологических эр — катархея и архея (около 3 млрд лет назад). В подцарстве многоклеточных одним из наиболее древних и низкоорганизо-

ванных типов являются губки. Тело губок включает слабодифференцированные клеточные скопления. Губки относятся к первичным многоклеточным, так как клеточные скопления этого типа не образуют тканей. Линия развития настоящих многоклеточных начинается с типа кишечнополостных (кораллы, медузы, гидры). Возникновение настоящих многоклеточных относят к концу архейской эры (2 млрд лет назад). Именно с уровня *кишечнополостных* сходнодифференцированные клетки объединяются в ткани. У данного типа их две: экто- и энтодермальный слой. Более высокоорганизованные типы характеризуются тканями и органами, формирующимися из трех зародышевых листков: экто-, мезо- и энтодермы. Все трехслойные многоклеточные делятся на более примитивных животных, у которых отсутствует полость тела (тип плоские черви, немуртины, круглые черви и др.), и высокоорганизованных — с полостью тела. Последние образуют две самостоятельные филогенетические ветви — первично- и вторичноротых животных. Отличительным признаком первичноротых является то, что в процессе зародышевого развития ротовое отверстие формируется на месте первичного рта (бластопора), анальное же отверстие располагается на конце тела как самостоятельное образование. У вторичноротых ротовое отверстие формируется независимо от бластопора. Бластопор, как правило, преобразуется в анус. Возникновение первичноротых относят к протерозою (570–1900 млн лет назад). Для кембрия (90–570 млн лет назад), наиболее раннего периода палеозоя, характерно наличие предков всех современных типов. Исключения составляют хордовые, которые появляются несколько позднее — в начале ордовика (400–490 млн лет назад).

Сопоставление данных об иммунных реакциях у современных видов животных с геологической летописью ископаемых позволяет высказать предположения о времени возникновения тех или иных форм иммунитета. С появлением многоклеточных (около 2 млрд лет назад) возникает определенная форма реакции на чужеродность — *неиммунное распознавание чужеродности*, действующее по принципу аллогенной ингибиции. Смысл такой формы защиты — уничтожение мутационно измененных соматических клеток, неизбежно возникающих у многоклеточных животных. Неиммунное тканевое отторжение описано у

пресноводной губки и у морских губок, а также некоторых видов кишечнополостных (коралловые полипы, гидроиды). Пересадка между отдельными ветвями внутри колонии (аутотрансплантация) приводит к полному срастанию трансплантатов. В то же время пересадка между различными колониями, отличающимися генетически (аллотрансплантация), не обеспечивает слияния мягких тканей и объединение трансплантата с колонией хозяина в единый организм. Иммунологическая память или какие-либо иные проявления специфической иммунной реакции не выявлены. Данный случай аналогичен аллогенной ингибции, описанной для млекопитающих (мыши). Феномен аллогенной ингибции обнаружен при пересадке клеток или тканей (костный мозг, предшественники антителопродукторов, кожный лоскут, лимфоидные и нелимфоидные раковые клетки) гомозиготных родителей в гибрид первого поколения. Комбинация родитель-гибрид как донор-реципиент обуславливает невозможность развития иммунологического конфликта, поскольку антигены родителей полностью представлены у гибрида. Очевидно, реакция неиммунного распознавания, действующая по типу аллогенной ингибции, обусловлена структурными детерминированными различиями клеточных поверхностей и происходит у всех многоклеточных.

Возникновение *специфического трансплантационного иммунитета* — следующий за фагоцитозом и аллогенной ингибцией этап в эволюции иммунных форм защиты. Первые признаки аллотрансплантационной реакции с появлением иммунологической памяти наблюдаются у некоторых видов губок и кишечнополостных. У представителей ветви первичноротых реакции трансплантационного иммунитета с формированием иммунологической памяти описаны для немертин и кольчатых червей. В ветви вторичноротых реакция трансплантационной аллонесовместимости выявлена у иглокожих, оболочников, позвоночных (классы: круглоротые, костные и хрящевые рыбы, амфибии, рептилии, млекопитающие). По мере филогенетического совершенствования усиливается реакция отторжения как первичного, так и вторичного трансплантата. Однако подобная связь не абсолютна и отражает лишь общую тенденцию в совершенствовании аллотрансплантационных реакций. Так, предста-

вители класса рептилий менее реактивны к аллонесовместимой ткани по сравнению с филогенетически менее организованными животными (рыбы, амфибии). Наиболее полная информация о выраженности аллотрансплантационной реактивности получена у позвоночных животных. У всех изученных видов птиц и млекопитающих трансплантат отторгается в острой форме со средним сроком выживания около 14 дней. В классе рептилий первичная реакция трансплантационного отторжения развивается слабо, по хроническому типу; среднее время выживания трансплантата — более 30 дней. Среди амфибий острой формой отторжения характеризуется наиболее развитая эволюционная группа бесхвостых амфибий. Хвостатые и безногие амфибии отторгают трансплантат в хронической форме. В классе костных рыб острой формой отторжения характеризуется группа настоящих костистых рыб, за исключением аравановых, которые отторгают трансплантат в подострой форме со средним временем выживания около 20 дней. Хрящевые рыбы и круглоротые отторгают трансплантат по хроническому типу.

Способность к *синтезу иммуноглобулинов* — высшее достижение эволюционного развития иммунитета. Свойством синтезировать Ig в ответ на антиген обладают только позвоночные животные, начиная с круглоротых. Представители типа круглоротых, хрящевых и костных рыб синтезируют лишь один иммуноглобулин — IgM. Амфибии способны к синтезу двух классов — IgM и IgG, млекопитающие продуцируют новые классы — IgA, IgD и IgE. Исходя из известных данных о структурной организации легких (L) и тяжелых (H) цепей Ig, объединяющих в единой молекуле гомологичные участки (домены), было высказано предположение, что гены, контролирующие H- и L-цепи, произошли в результате тандемной дупликации исходного гена-предшественника. Этот ген контролировал полипептид с молекулярной массой 10 000–12 000. Возможно, он сохранился у современных форм и контролирует синтез β_2 -микроглобулина млекопитающих (человек, мыши). Тандемная дупликация гена-предшественника сначала привела к формированию локуса для L-цепей, а затем для предковых H-цепей. В результате дальнейшей самостоятельной эволюции возникла способность к синтезу как различных классов H-цепей, так

и γ , λ -типов L-цепей. Некоторые исследователи постулируют общность предкового гена как для антигенов гистосовместимости, так и для иммуноглобулинов. Пока остается нерешенным вопрос о том филогенетическом уровне, с которого началась эволюция Ig.

ВОЗНИКНОВЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫХ ГЕНОВ

Вопрос об эволюционном происхождении иммуноглобулинов, распознающих и нейтрализующих чужеродный материал, — один из самых сложных и нерешенных вопросов современной иммунологии. Предложены две гипотезы, пытающиеся объяснить эволюционное развитие Ig. *Первая* строится на представлении о том, что Ig произошли от генов основной системы гистосовместимости. В основе *второй* гипотезы лежит представление о том, что Ig-система и основная система гистосовместимости эволюционировали самостоятельно и независимо друг от друга; Ig — для распознавания чужеродности, основная система гистосовместимости — для физиологически нормального межклеточного взаимодействия.

Самостоятельное эволюционное развитие Ig-генов ставит вопрос о том, с какого филогенетического уровня возникла необходимость в данных генах и что послужило причиной их эволюционного развития. Было выдвинуто предположение, по которому ген-предшественник возник на уровне одноклеточных животных организмов в те геологические времена, когда зародились первые клеточные формы жизни (около 3 млрд лет назад). Функция такого гена состояла в контроле синтеза полипептида, нейтрализующего токсические вещества внешней среды, которые могли проникать в клетку в качестве питания. Очевидно, происходил отбор архаичных клеток, имеющих *преадаптацию* к токсическому веществу внешней среды в виде гена, контролирующего синтез белка X. Популяция клеток находится в состоянии равновесия с внешней средой. Отдельные клетки имеют преадаптацию в виде гена для белка X. Положительное значение такой преадаптации проявляется в том, что при появлении во внешней среде токсина он нейтрализуется продуктом преадаптированного гена. Непреадаптированные клетки погибают. Популя-

ция клеток вновь переходит в состояние стабильности, но на качественно ином уровне: все особи популяции имеют ген для белка, нейтрализующего токсическое соединение. При этом часть клеток имеет преадаптацию на случай появления нового токсического вещества в среде обитания клеток. Эта генная преадаптация создается за счет дубликации исходного гена для белка X. В условиях новой агрессии со стороны неизвестного ранее токсического вещества выживут только те клетки, которые имеют соответствующую генную преадаптацию, и вновь установится стабильность в популяции клеток, способных нейтрализовать два токсических вещества внешней среды.

Такой путь адаптации клеточной популяции за счет дубликации исходного гена, контролирующего синтез белка X, повторялся неоднократно и стал основой создания V-генов для вариабельных участков иммуноглобулинов. На определенном этапе эволюции от V-гена могли возникнуть и C-гены для константной части иммуноглобулинов, которые эволюционировали самостоятельно и не в связи с необходимостью нейтрализовать чужеродные антигены. Представления о происхождении V-генов для иммуноглобулинов посредством дубликации исходного гена, контролирующего синтез нейтрализующего белка, не следует относить только к эволюционному развитию одноклеточных. Увеличение числа V-генов шло параллельно с прогрессивным развитием от одноклеточных к первичным многоклеточным, двухслойным многоклеточным и т. д. Однако само зарождение этого процесса связано с первичными одноклеточными существами, у которых возникла необходимость нейтрализации токсических продуктов.

ЭВОЛЮЦИОННОЕ ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЛИМФОЦИТОВ

У истоков становления лимфоидного клеточно-комплекса, основная функция которого — иммунная, находились амебоциты-макрофаги (АЦ-МФ), известные для наиболее низкоорганизованных многоклеточных: губок и кишечнополостных. Для кольчатых червей (первичноротые) и иглокожих (вторичноротые) описан новый вид клеток гемолимфы — лимфоцит (ЛЦ). У круглоротых в связи с возникновением вилочковой

железы появляются истинные Т-клетки (Т), а у хрящевых рыб впервые в эволюционном ряду обнаруживается плазмоцит, формирующийся из В-клетки в ответ на антиген. У млекопитающих эти клеточные типы в результате разнонаправленной дифференцировки дают различные субпопуляции как Т-клеток (Т-хелперы — T_h , Т-киллеры — T_k , Т-супрессоры — T_s), так и В-клеток, способных к синтезу одного из классов иммуноглобулинов (В-IgM, В-IgG и т. д.). Одно из принципиальных свойств клеток лимфоидной системы состоит в их эволюционной преемственности. На каждом последующем историческом этапе возникновение новой клетки не исключало родоначального предшественника. Предковые и вновь возникшие клетки начинали работать совместно для осуществления основной функции — уничтожения чужеродности. Формой реального проявления одновременной «работы» эволюционно совершенствующегося клеточного состава лимфоидной ткани стала *клеточная кооперация* — синергическое взаимодействие макрофага с Т- и В-лимфоцитами.

МУТАЦИОННЫЙ РИСК — «ПЛАТА» ЗА МНОГОКЛЕТОЧНОСТЬ

Суммируя данные по эволюции иммунитета, необходимо определить биологическое назначение исторического совершенствования иммуногенной функции. Прогрессивная эволюция по линии увеличения абсолютного количества соматических клеток была бы невозможна, если бы параллельно не шел процесс эволюционного совершенствования иммунной системы защиты. Таким образом, по мере накопления количества соматических клеток тела повышается мутационный риск для многоклеточного организма, причем частота мутационных поражений соматических клеток, так же как и половых, равняется приблизительно 10^{-6} , т. е. одной мутационно измененной клетки на 10^6 генерировавших клеток тела. Мутационный риск как произведение частоты мутаций на абсолютное количество соматических клеток будет отрицательной величиной для организмов количеством воспроизводящихся клеток не более 10^5 . Потребуется несколько полных смен клеточных поколений, чтобы возникло мутационное событие.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МЕХАНИЗМОВ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

Как в ранний период исследований антимикробных пептидов, так и в настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что антибиотической активностью не ограничивается функциональный потенциал этих соединений. Лизосомные катионные белки, большую часть которых составляли дефенсины, проявляли свойства факторов проницаемости микрососудов и дегрануляторов тучных клеток. Благодаря основным свойствам молекулы антимикробных пептидов обладают опсонизирующей микробы активностью, способствующей протеканию фагоцитарного процесса на его инициальных стадиях. В исследованиях с *дефенсинами* и некоторыми *кателицидинами* продемонстрирована хемотаксическая активность дефенсинов и кателицидина для моноцитов/макрофагов и нейтрофилов, для незрелых дендритных клеток и Т-лимфоцитов. Следует подчеркнуть, что хемотаксические свойства дефенсины и кателицидин человека проявляют в наномолярных концентрациях, которые на 2–3 порядка меньше их микробоцидных доз. Современный этап исследований неантимикробных свойств дефенсинов, протегринов, LL37 и других пептидов связан с анализом и изучением их воздействия на механизмы приобретенного иммунитета.

Первые сведения о модулирующей антителогенез активности дефенсинов кролика были получены еще в начале 1990-х гг. Было установлено, что дефенсины кролика и крысы в физиологической концентрации отменяют стрессиндуцированную иммуносупрессию у животных. Причем уже тогда обратили

внимание на то, что в контрольных вариантах опыта наблюдалась тенденция к увеличению титра антител к эритроцитам барана при иммунизации нестрессированных мышей на фоне предварительного введения дефенсинов. Объяснение этому феномену связывали с *кортикостатической активностью* некоторых изоформ дефенсинов.

Как известно, впервые кортикостатическая активность дефенсинов была выявлена канадскими исследователями при изучении влияния пептидов кролика на глюкокортикоидпродуцирующую активность клеток коркового слоя надпочечников крысы в культуральных условиях. Было показано, что дефенсины по рецепторопосредованному механизму конкурентно взаимодействуют с рецептором адренокортикотропного гормона (АКТГ). При этом наблюдается подавление АКТГ индуцированного (но не базального) стероидогенеза в клетках коркового слоя надпочечников. Кортикостатическая активность некоторых изоформ дефенсинов кролика была продемонстрирована на моделях АКТГ- и стрессиндуцированной глюкокортикоидной реакции у мышей и крыс. Среди шести изоформ дефенсинов кролика наиболее активными на уровне организма оказались фракции, известные как наиболее сильные кортикостатины. Именно со способностью некоторых фракций дефенсинов кролика подавлять АКТГ- и стрессиндуцированный стероидогенез в первую очередь связывают иммунопротективную активность этих пептидов. Ибо снижение уровня кортикостерона в крови как следствие в лимфоидных тканях создает предпосылки для реализации полноценного гуморального иммунного ответа, оцениваемого по выработке антител на антигены эритроцитов барана. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о противовоспалительном и иммуносупрессирующем действии глюкокортикоидов не только в фармакологических дозах, но и в концентрации гормонов, наблюдаемой при стрессе и инфицировании.

Есть основания считать, что иммунодепрессия, индуцируемая глюкокортикоидами, физиологически оправдана, поскольку страхует организм в условиях предъявления ему множества чужеродных и собственных антигенов от иммунного реагирования на последние. Если подавление антителогенеза носит

транзиторный характер, это не опасно. Но в случае длительного или интенсивного воздействия стрессирующего фактора стойкая гиперфункция надпочечников приводит к наводнению организма глюкокортикоидами и формированию хронической иммуносупрессии, создающей благоприятный фон для активизации условно-патогенных микроорганизмов и онкогенеза. Именно для коррекции таких состояний могут быть рекомендованы дефенсины, обладающие кортикостатической активностью, и другие антимикробные пептиды с целью преодоления сниженной резистентности к оппортунистической инфекции в условиях тяжелого стресса.

Наряду с рассмотренным выше механизмом воздействия антибиотических пептидов как молекулярных факторов врожденного иммунитета на иммунные реакции приобретенного типа, было установлено, что стимулированные ИЛ-8 нейтрофилы человека секретируют дефенсины, которые являются хемоаттрактантами для Т-лимфоцитов. Далее было показано, что α -дефенсины в наномолярных концентрациях избирательно хемотаксичны для неактивированных (наивных) Т-лимфоцитов и незрелых дендритных клеток, в то время как продуцируемый эпителиальными клетками индуцибельный β -дефенсин оказался хемотаксином для Т-клеток памяти. Хемотаксическая активность дефенсинов, подобно таковой хемокинов, подавлялась коклюшным токсином, что свидетельствовало о вовлечении в этот процесс G-белков, сопряженных с рецепторами. Действительно, было установлено, что влияние на незрелые дендритные клетки и Т-клетки памяти носит рецепторопосредованный характер и связано с рецептором хемокина. Уязвимым местом рассматриваемых построений было то обстоятельство, что в этих работах использовали дефенсины человека, а объектом исследования были клетки иммунной системы мыши.

Однако в 2001 г. впервые было показано, что β -дефенсин мыши эпителиального происхождения (не криптидины) mBD2 и mBD3 обладают хемотаксической активностью для незрелых дендритных клеток этого же вида животных, а также НК293-клеток, в которые был трансфецирован экспрессируемый ген рецептора CCR6. Таким образом, впервые было доказано, что CCR6 может функционировать как рецептор не

только хемокина MIP-3 α (CCL20), но и β -дефенсинов эпителиального происхождения. Следовательно, в организме мышей существует система механизмов вовлечения в иммунные реакции дендритных клеток и моноцитов/макрофагов как основных антигенпредставляющих клеток — система, опосредованная эндогенными дефенсинами. Значимость такого звена иммунного реагирования была установлена и в экспериментах на животных. Так, интраназальная иммунизация мышей овалбумином в смеси с дефенсинами человека H1 выявила адъювантную активность у антимикробных пептидов. Уровень специфических IgG в плазме крови у таких животных был выше, чем у особей, иммунизированных чистым антигеном. Кроме того, CD⁴⁺, T, выделенные из этих животных, продуцировали в ответ на взаимодействие с овалбумином *in vitro* больше ИФН α , ИЛ-5, ИЛ-6 и ИЛ-10, что свидетельствовало об усилении функциональной активности Т-хелперов по антигенспецифическому механизму. Адъювантная активность HNP1-3 была продемонстрирована также при внутрибрюшинной иммунизации мышей антигеном или идиотипическим антигеном В-лимфомы. В обоих случаях наблюдали более высокий титр специфических IgG к этим антигенам при условии их совместного парентерального введения с дефенсинами человека. Более того, мыши, иммунизированные опухолевым антигеном в смеси с IgG, проявляли заметную резистентность к развитию лимфомы, инициированной внутрибрюшинным введением трансформированных клеток.

Иммуногенность антигенов связана со способностью одновременно вводимых дефенсинов мобилизовывать дендритные клетки и моноциты/макрофаги, которые обеспечивают более эффективное поглощение, процессинг и представление антигенов Т-лимфоцитам. В этом, по их мнению, заключается одна из возможных функций дефенсинов, направленная на формирование иммунного ответа приобретенного типа. Дефенсины способствуют созреванию незрелых дендритных клеток в месте их встречи с антигеном или его носителем, дифференцировка дендритных клеток в иммунокомпетентные антигенпредставляющие клетки является одним из необходимых условий, обеспечивающих их выход в ближайший лимфатический узел,

где и осуществляются межклеточные взаимодействия, определяющие направленность и интенсивность иммунного ответа приобретенного (адаптивного) типа.

Дополнительным подтверждением рассматриваемых представлений об иммуномодулирующей активности дефенсинов явилось в значительной степени формирование иммунных реакций приобретенного типа (выработка специфических антител и цитотоксических Т-лимфоцитов). Сопряженная экспрессия дефенсинового гена mBD2 с геном идиотипического антигена В-лимфома является необходимым условием формирования протективного иммунного ответа на опухолевые клетки. Необходимо подчеркнуть, что использование в контрольных вариантах ДНК-вакцины, в которой гены опухолевого антигена и β -дефенсина мыши находились не в слитном состоянии, не приводило к позитивному результату. Этот факт находится в некотором противоречии с ранее изложенными результатами по иммунизации животных овалбумином, KLH и идиотипическим антигеном в присутствии дефенсинов человека, ковалентно не связанными с перечисленными антигенами. Следует, однако, подчеркнуть, что в этих опытах использовали гетерологичные для мышей дефенсины человека.

Как бы то ни было, иммуностимулирующее действие дефенсинов связывается преимущественно с их хемотаксической для незрелых дендритных клеток активностью. Однако есть основания полагать, что это не единственный механизм рассматриваемого эффекта. В частности, дефенсины человека HNP1-3 индуцируют продукцию ФНО α и ИЛ-1 макрофагами в культуре клеток. Этот процесс может осуществляться путем ускорения превращения про-ИЛ-1 β в зрелую секретлируемую клетками форму ИЛ-1 β . Наряду с этим провоспалительные цитокины способствуют созреванию незрелых дендритных клеток, а также обладают мощной лимфоцитактивирующей активностью, что усиливает реакции организма на антигены. ИЛ-1 β рассматривается в настоящее время в качестве одного из эндогенных адъювантов, который способствует разворачиванию гуморального иммунного ответа на антигены. Дефенсины облегчают рекрутирование в инфицированные ткани Т-клеток памяти, что, по-видимому, может быть одним из дополнительных

факторов, укорачивающих время повторного иммунного ответа на тот же антиген. Кроме того, β -дефенсины человека активируют продукцию хемокина ИЛ-8 эпителием дыхательных путей. ИЛ-8 является хемотаксическим фактором, специализированным на привлечении нейтрофилов. Таким образом, между дефенсинами и провоспалительными цитокинами (ФНО α , ИЛ-1 ИЛ-8) существуют связи, определяющие их взаимоусиливающий синтез. Известно, что ФНО α и ИЛ-1 β в различных модельных системах индуцируют синтез и секрецию дефенсинов эпителиями.

Все эти факты в своей совокупности свидетельствуют о новом аспекте в анализе функциональных свойств дефенсинов, дающем основание расценивать эти пептиды не только как микробицидные соединения, но и как *регуляторные молекулы иммунной системы* животных, воздействующие на клетки-мишени по рецептор-опосредованному механизму.

В связи с возможными рецептор-опосредованными эффектами дефенсинов представляют интерес данные об активирующем воздействии дефенсинов с кортикостатической активностью. Показаны физиологические эффекты, проявляемые дефенсинами при различных концентрациях пептидов, по крайней мере они способны модулировать потенциалочувствительность медленных натриевых каналов. С помощью метода локальной фиксации потенциала изучено влияние дефенсинов кролика на мембрану нейронов спинальных ганглиев крыс, причем дефенсины снижали эффективный заряд активационной воротной системы медленных (тетродотоксиннечувствительных) натриевых каналов. Этот процесс монотонным образом зависел от концентрации исследованных дефенсинов. Применение уравнения Хилла позволило установить, что величина K_d в случае взаимодействия дефенсина МР-1 с предполагаемым мембранным рецептором составляла величину 2×10^{12} моль/л и в варианте МР — $4-8 \times 10^8$ моль/л, а коэффициент Хилла был равен 0,9 и 1,0 соответственно. Было высказано, в частности, предположение о вовлечении рецептора серотонина в анализируемый процесс, поскольку известно о существовании взаимосвязи медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона с рецепторами серотонина. Снижение возбудимости мембраны

сенсорного нейрона, установленное в этих работах, может приводить к анальгетическому состоянию в условиях выработки дефенсинов на уровне структур нервной системы при стрессе и может рассматриваться в качестве одного из механизмов стресс-индуцированной опиоиднезависимой анальгезии.

Обнаружение дефенсина NP-3a в гипофизе, гипоталамусе и таламусе кролика является однозначно установленным фактом. Вопрос о присутствии в структурах нервной системы дефенсинов NP-1 и NP-4 остается открытым. Все эти данные позволяют высказать предположение, что дефенсины в нецитотоксических концентрациях (нМ, пМ) могут выступать в качестве агонистов, модулирующих передачу импульсов в центральной нервной системе, благодаря изменению потенциалочувствительных медленных натриевых каналов.

Не только дефенсины и кателицидин человека LL37 обладают иммуномодулирующей активностью. В связи с регуляцией иммунного ответа представляют интерес данные о *penptide* PR39 (основной, богатый пролином и аргинином пептид), который был впервые выделен из слизистой тонкого кишечника свиней, а позже из лейкоцитов крови этого же вида животных. Кроме антимикробной активности широкого спектра действия, PR39 ингибирует НАДФН-оксидазную систему фагоцитов, индуцирует синтез синдеканов, что, в частности, объясняет роль пептида как одного из регуляторов ангиогенеза, а также обладает хемотаксической активностью в отношении нейтрофилов. Рассматриваемый пептид может избирательно связываться с белком p300 (Cas) и $\alpha 7$ -субъединицей протеасомного комплекса клеток млекопитающих. Установлено, что антибактериальный пептид PR39 из лейкоцитов свиньи обратимо связывается с $\alpha 7$ -субъединицей 26S протеасом, блокируя при этом деградацию ингибитора транскрипционного фактора NF κ B (I κ B α) по убиквитин-протеасомному пути. Причем фосфорилирование и убиквитилирование I κ B α происходят нормально, как и последующее связывание модифицированного белка с валозинсодержащими белками. Подавление процесса протеолиза I κ B α в протеасомах отменяет по еще не ясному механизму активацию и транслокацию NF κ B в ядро, следствием чего является неактивное состояние генов, ответственных за иммунное реагирование

и синтез провоспалительных цитокинов и адгезионных факторов. Отмену экспрессии генов, активируемых NFκB, под воздействием пептида PR39 наблюдали как в культуре клеток HUVEC, так и, что особенно важно, на моделях острого панкреатита и инфаркта миокарда у мышей. Инфузия пептида PR39 в организм животных приводит к значительному уменьшению размеров повреждения их сердечной мышцы при экспериментальном инфаркте.

Представленные данные позволяют рассматривать PR39 и родственные ему пептиды в качестве эффективных профилактически-терапевтических средств для предупреждения и ограничения повреждений, сопряженных с воспалительными процессами в органах. Выявленный противовоспалительный эффект пептида PR39, связанный с регуляцией протеолиза IκBα и косвенно генов иммунного реагирования, дополняет ранее установленное функциональное свойство пептида ингибировать НАДФН-оксидазную систему.

Дефенсины, пептид LL37 и родственные им соединения фагоцитов и барьерных систем у животных и человека благодаря особенностям структуры выступают *эффективными антимикробными агентами*, в значительной степени определяющими завершенность фагоцитоза и обеспечивающими инактивацию микроорганизмов на уровне клеточно-тканевых образований, пограничных к инфекции (входные ворота инфекции). Наряду с этой активностью дефенсины, как установлено в результате многочисленных исследований, могут проявлять и другие функциональные свойства, важные в реализации защитно-приспособительных реакций организма как при инфекции, так и при воздействии других неблагоприятных факторов окружающей среды.

В силу электрохимических свойств молекул дефенсинов и родственных им соединений, являющихся положительно заряженными, они эффективно сорбируются на поверхности бактериальных и эукариотических клеток. В результате этого наблюдается снижение отрицательного заряда клеток, в том числе и микробных. Это облегчает фагоцитоз последних нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Подобные наблюдения послужили основанием рассматривать дефенсины в качестве *опсонизи-*

рующих микроорганизмы соединений при фагоцитозе и воспалении наряду с производными комплемента.

Таким образом, в очагах воспаления дефенсины могут подавлять жизнеспособность микроорганизмов и проявлять свойства молекул, обладающих хемотаксической, опсонизирующей адьювантной активностью. Если принять во внимание данные о способности дефенсинов дегранулировать тучные клетки и повышать проницаемость сосудов микроциркуляторного русла, то становится очевидным, что эти полипептиды способны влиять на течение фагоцитарного и воспалительных процессов, выступая в роли регуляторных молекул.

Антимикробные пептиды могут являться модуляторами воспалительных реакций организма при инфекции и, в частности, при сепсисе. Сепсис характеризуется присутствием микроорганизмов и их токсинов в крови. Симптоматика сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, в значительной степени определяется липополисахаридами (эндотоксинами) наружной мембраны микроорганизмов. Эндотоксины связываются в плазме с липополисахаридсвязывающим белком (ЛСБ), который способен переносить липополисахарид к поверхностной молекуле белка CD14, локализованного в плазмалемме моноцитов и макрофагов. Комплекс липополисахарида с CD14 белком инициирует через Толл-подобный рецептор 4-го типа (ТЛР4) путь сигнальной трансдукции, завершающийся активацией NF κ B транскрипционного регулятора (фактора), ответственного за регуляцию более чем 150 генов, участвующих, в частности, и в иммунных акциях. В результате наблюдается интенсивный синтез и секреция из макрофагов и эндотелиальных клеток провоспалительных цитокинов TNF- α , ИЛ-1 и ИЛ-6, избыточная системная продукция которых приводит к гиперактивации клеток иммунной системы и эндотелия и проявляется в форме септического шока, который часто приводит к гибели пациентов.

Известно, что катионные пептиды (дефенсины, протегрины и т. д.) и белки (лактоферрин, БПУ-белок) связывают липополисахариды, являющиеся амфипатическими полианионами, подавляя при этом способность последних активировать продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами.

Продемонстрировано, что катионные пептиды (дефенсины человека HNP-1 и HBDD2, индолицидин из лейкоцитов крупного рогатого скота, полифемузин и некоторые синтетические поликатионы) ингибируют процесс связывания ЛПС с ЛПС-связывающим белком и благодаря этому подавляют ЛПС-индуцированную продукцию TNF- α макрофагами.

Наряду с антиэндоксической активностью дефенсины и другие антимикробные пептиды очагов воспаления могут выступать в качестве молекул с прокоагулирующей активностью по двум дополняющим друг друга механизмам. Было изучено влияние общей фракции дефенсинов кролика на систему неферментативного фибринолиза крови крыс. Основным выводом этих исследований является признание за дефенсинами *умеренной прокоагулирующей активности*, заключающейся в связывании и нейтрализации гепарина крови — ведущего компонента системы неферментативного фибринолиза. Кроме того, была продемонстрирована способность дефенсинов человека влиять ингибирующим образом и на каскад ферментативного фибринолиза крови. В частности, было показано, что дефенсины нейтрофилов человека ингибируют фибринолиз, запускаемый активатором плазминогена тканевого типа. Так же, по-видимому, действует и дефенсин человека, который конкурирует с плазминогеном за связывание с фибрином. Возможно, что антифибринолитическая активность дефенсинов в очагах воспаления служит фактором, препятствующим распространению инфекции благодаря иммобилизации бактерий в фибриновых сгустках.

Один из важных механизмов поддержания гемостаза связан с тромбоцитами и их физиологически активными соединениями. Было показано, что дефенсины человека HNP-1, HNP-2 HNP-3 и протегрин PG-2 свиньи оказывают сходное действие на агрегацию и секрецию тромбоцитов *in vitro*. Обладая проагрегационной активностью в высоких концентрациях (50–100 мкг/мл), дефенсины и протегрины в низких дозах (0,1–40 мкг/мл) проявляют антиагрегационные и антисекреторные свойства в отношении тромбоцитов человека. Необходимо подчеркнуть, в случае инфекционной патологии содержание дефенсинов человека в плазме крови может дости-

гать одного или более мкг/мл, т. е. того диапазона концентраций, при котором выражены преимущественно антиагрегационные свойства антибиотических пептидов. Возможно, что дефенсины и протегрины при их секреции из нейтрофилов могут выступать в роли *медиаторов лейкоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий*, направленных на поддержание гемостаза при инфекционных заболеваниях и стрессорных ситуациях, которые сопровождаются мобилизацией из костномозгового депо значительного числа нейтрофилов.

Таким образом, сочетание в дефенсинах антимикробных и ингибирующих отдельные стороны воспалительных и иммунных процессов свойств позволяет рассматривать эти полипептиды в качестве перспективного объекта дальнейшего углубленного исследования с целью создания новых лекарственных средств для медицины и ветеринарии. Возможно, что именно с многонаправленными воздействиями дефенсинов на иммунную систему живого организма связан защитный эффект этих пептидов при экспериментальной герпетической инфекции.

На основании экспериментальных и литературных данных можно предположить, что функциональное значение нейтрофилов при воспалении и стрессе не ограничивается усилением антимикробного барьера организма. В процессе мобилизации нейтрофилов и их миграции в ткани, «пограничные к инфекции», имеет место постоянная секреция физиологически активных веществ их лизосомного (гранулярного) аппарата во внеклеточную среду, в том числе и дефенсинов. При этом последние в роли гуморальных факторов могут проявлять свои ортикостатические и иммунопротективные свойства, обеспечивая взаимодействие иммунной и нейроэндокринной систем, направленное на формирование защитных реакций.

Таким образом, дефенсины и другие антимикробные пептиды являются не только физиологически активными веществами широкого спектра антимикробного действия, но и медиаторами отдельных реакций фагоцитарных, воспалительных и стрессорных процессов, т. е. выступают в роли регуляторных пептидов адаптогенного действия.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЖИВОТНЫХ

При выявлении устойчивых и восприимчивых животных необходимо решить ряд вопросов методологического характера:

а) какие показатели необходимо использовать для оценки устойчивости животных;

б) как отражает тот или иной показатель состояние защитных способностей организма в данный момент, а также устойчивость, определяемую генетической конституцией;

в) как обобщить показатели в общую оценку на уровне целого организма;

г) как сочетается устойчивость животного к данному возбудителю с устойчивостью вообще и конституциональной крепостью?

В качестве показателей, характеризующих состояние резистентности, можно использовать морфологический состав крови (количество лейкоцитов — выведение лейкоцитарной формулы, количество эритроцитов и гемоглобина); белковую картину крови (уровень общего белка, соотношение белковых фракций); функциональную активность клеточных элементов крови (фагоцитарную активность и интенсивность лейкоцитов, фагоцитарную емкость 1 мм крови); бактерицидную и лизоцимную активность сыворотки крови титр гетероагглютининов; динамику специфических антител в ответ на введение различных антигенных раздражителей, а в условиях жаркого климата необходимо проводить и оценку термоустойчивости животных.

Молодняк первого экологического поколения акклиматизируемой англеской и местной красной степной пород крупного рогатого скота выявил существенные различия между ними в характере физиологических реакций на воздействие повышенной температуры воздуха и интенсивной солнечной радиации. При температуре 32–34°C и относительной влажности воздуха 34–36% животные англеской породы менее устойчивы к жаре, чем красной степной, у которых защитные приспособления, участвующие в теплообмене, более совершенны. Правильные приемы в акклиматизации животных не должны снижать естественной резистентности. Принято считать,

что акклиматизация легче всего проходит при передвижении животных с запада на восток и с юга на север. При таком перемещении наиболее благоприятным временем года нужно считать весну, так как за весенний и летний период система терморегуляции организма сумеет легче адаптироваться. При перевозках животных с севера на юг и с востока на запад наиболее подходящим сезоном считается осень. При создании хороших зоогигиенических условий животные дают достаточно молока, хорошего качества мясо и сравнительно легко акклиматизируются, мало чем отличаясь от естественной резистентности уже давно акклиматизированного красного степного скота.

Появляются новая технология, новые системы содержания, требующие всесторонней научно-производственной оценки с учетом влияния не только на показатели продуктивности, но также и на устойчивость животных к заболеваниям, что не менее важно. Взамен солнечной радиации широкое применение найдут лампы дневного света, ультрафиолетового и инфракрасного излучения. Каждый вид животных, хозяйственная и возрастная группы требуют научного обоснования оптимальных нормативов, которые можно установить только на основе точного учета их роста, развития, продуктивности и естественной резистентности. Вредное влияние микроклимата помещений, особенно при длительном пребывании в них животных, может иметь и без видимого внешнего клинического проявления, хотя иногда он и губительно действует на организм животных. Каждая географическая и климатическая зона с различными кормовыми и другими условиями имеет свои особенности. Как слишком высокие, так и очень низкие температуры воздействуют на резистентность организма. Однако понятия «высокая» и «низкая» весьма относительны.

При установлении нормативов надо учитывать не только вид, но и породу, возраст, пол, физиологическое состояние, упитанность, масть, условия содержания, кормления и ухода. Следует считать, что высокая влажность воздуха как при высоких, так и при низких температурах отрицательно сказывается на резистентности организма в силу нарушения теплообмена. Большая скорость движения холодного воздуха также нарушает теплообмен и подавляет защитные приспособления

животного организма. Недостаточное обеспечение свежим воздухом нарушает нормальные функции дыхания. Показатели уровня естественной резистентности животных были ниже в железобетонных помещениях. Специальные наблюдения показали, что даже в пределах одного помещения микроклимат в разных частях его может быть различным и по-разному сказывается на здоровье животных. Так, в северной части железобетонного коровника, принимающей на себя основную массу холодных ветров, температура воздуха была на 1,5–2,0°С ниже, а относительная влажность на 2–3% выше, чем в южной части. В этом коровнике в северной его части было выявлено 46%, а в южной 24,6% туберкулезных коров, находившихся в равных прочих условиях. Естественная резистентность у животных в северной части помещения была ниже.

Если в какой-то степени влияние на естественную резистентность инфракрасных и ультрафиолетовых лучей искусственных излучателей изучено, то совершенно ничего не известно о воздействии ночного электрического освещения; отдельные наблюдения исследователей свидетельствуют о снижении продуктивности животных при излишнем ночном освещении помещения. Можно предположить, что к этому фактору механизм резистентности не может оставаться безучастным, поэтому требуются обязательные экспериментальные проверки как в отношении племенных, так и продуктивных животных всех видов, пород, возрастных и хозяйственных групп.

В животноводческих помещениях животные подвергаются воздействию разных по качеству и количеству аэрозолей, которые попадают на кожный покров, нарушая теплообмен организма с внешней средой, в органы зрения, пищеварения и дыхания, вызывая патологические изменения. Вероятно, что и в естественной резистентности происходят сдвиги в сторону ее снижения, например, установлено отрицательное влияние проникновения двуокиси кремния в органы дыхания. Этот вопрос нуждается в специальном исследовании, и изучение влияния на резистентность вредных химических примесей воздуха представляет большой интерес. На животноводческих фермах из-за часто наблюдаемых нарушений в работе систем вентиляции и канализации скапливаются в значительных, иногда ток-

сических, количествах аммиак, сероводород, ангидрид угольной кислоты, угарный газ. Повышенное их содержание может быть результатом применения в помещении тракторов для уборки или огневых калориферов, инфракрасных газовых излучателей. Пламя и несвоевременная уборка остатков кормов, навоза, неправильное кормоприготовление также изменяют в худшую сторону химические свойства воздуха и, несомненно, сказываются на физиологической резистентности животных.

Совсем не известно влияние на резистентность шума и вибрации, хотя такие факторы все больше вторгаются в быт животноводческой фермы. Мы нередко наблюдаем, как беспокоит животных трактор во время доения коров; даже обычный гудок вызывал беспокойство молодняка свиней. Вредно действуют на животных такие факторы, как атмосферное давление и парциальное давление кислорода, уменьшающиеся с повышением местности над уровнем моря. Было бы интересно проследить за уровнем естественной резистентности животных при перегонах на высокогорные пастбища.

Недостаточно еще исследовано влияние на естественную резистентность разных приемов ухода. Можно только предполагать, что уход за кожей животных должен повышать не только их продуктивность, но и резистентность. Следует проследить за воздействием на резистентность организма таких факторов, как применение щетки для чистки кожного покрова, душа для обмывания, купания животных, массажа. Известно, что такие приемы повышают продуктивность скота. Известно также и вредное действие металлических скребниц, весьма распространенных в практике на фермах крупного рогатого скота: при чистке скребницей у животных резко снижается продуктивность, нарушается обмен веществ и появляются заболевания.

В районах Северного Кавказа, Закавказья, Средней Азии, Карпат ежегодно весной и осенью производятся сезонные перегоны скота на высокогорные пастбища и с последних на равнинные. Во время таких перегонов вследствие заболеваний существенно снижается продуктивность животных. Много зависит от выбора времени перегонов. Чем быстрее они совершаются, особенно при переходе с равнинных на высокогорные пастбища, тем гораздо легче адаптируются животные.

В связи с укрупнением животноводческих ферм и резким увеличением на них поголовья животных, особенно на свиноводческих фермах, весьма трудным является обеспечение их подстилочным материалом. Животные зачастую даже в суровые зимы содержатся без подстилки, при этом они затрачивают массу энергии на обогрев полов. Видимо, в таких условиях страдает не только их продуктивность, но и естественная резистентность.

Настала пора обратить самое серьезное внимание на изучение естественной резистентности у дикой фауны. Это поможет выяснить ряд вопросов по этой проблеме у сельскохозяйственных животных. Известно, что многие более примитивные породы скота невосприимчивы к некоторым кровепаразитарным и инфекционным болезням, от которых погибают культурные животные. Так, фагоцитарная активность составляла у зайца-беляка 12,2%, у волка — 27%, у лисы — 18%, у гуся серого — 2,4%. Колебания показаний были значительными. Так, у сурков фагоцитарная активность была от 12 до 28%, у косуль — от 7,2 до 2%, у гусей — от 12 до 42%, у лысух — от 5 до 29%. Подобную картину можно отметить при сопоставлении фагоцитарной активности и количества лейкоцитов. Здесь, несомненно, важны и такие факторы, как возраст и индивидуальность.

Широкое распространение получили методы определения неспецифической резистентности организма по показателям опсонофагоцитарной реакции, бактерицидной активности сыворотки крови, содержанию в крови гетерогемагглютининов и нормальных антител, пропердина, комплемента, иммуноглобулинов и др. Определение фенотипического и генотипического индексов неспецифической резистентности основывается на установлении активности признаков. Большое число признаков снижает разницу в значениях вычисляемых индексов. Поэтому из 20–30 факторов резистентности надо выбрать самые главные: *бактерицидную активность сыворотки крови и фагоцитарную активность нейтрофилов*. Можно добавить и такой показатель, как *титр интерферона*. Признаки определяются по общепринятым методикам, а полученные значения названных признаков трансформируются в баллы по 5-балльной шкале. Если бак-

терицидная активность колеблется от 10 до 60%, интервал равен $60 - 10 = 50$, то значение интервала класса $50 : 5 = 10\%$.

ФИНР вычисляется так: если среднее фенотипическое значение четырех дочерей первого сравнения 3, второго — 4,20, то их среднее $(3,00 + 4,20) : 2 = 3,60$ и является ФИНР данного производителя. Для сравнения значений признаков и индексов их можно разделить на 3 класса (табл. 2).

Преимуществом метода является возможность сравнения одновозрастных животных, находящихся в различных условиях кормления и содержания в разные сезоны года. Особенно важно выявить индекс неспецифической резистентности (ИНР) у высокопродуктивных животных или у животных с низкой резистентностью, способных потерять контроль за микрофлорой тела, что в свою очередь приведет к возникновению новых патогенных форм микробов.

Известно, что исход любого иммунологического процесса определяется следующими факторами: а) количеством поступающих во внутреннюю среду антигенов; б) степенью связывания их во внутренней среде; в) выраженностью ответной реакции специализированной системы иммуногенеза.

Эти факторы и положены в основу интегральной оценки иммунобиологического статуса. Для оценки предложена комплексная иммунограмма, включающая в себя ряд критериев:

1. Количество несвязанных антигенов в крови (антигенная информация). О количестве несвязанных антигенов можно

Таблица 2

Соотношение классовых признаков и индексов

Классы	Признаки (1–5 баллов)	Индексы (1–6 баллов)
Слабые дочери (–)	1–2	1,00–2,66
Средние дочери (±)	3	2,67–4,33
Сильные дочери (+)	4–5	4,34–6,00
Слабые производители (–)	1,00–2,29	1,00–2,49
Средние производители (±)	2,30–3,59	2,50–3,99
Сильные производители (+)	3,60–5,00	4,00–6,00

судить по содержанию НвF и количеству сывороточных кислых мукополисахаридов.

2. Количество антигенов, связанных с сывороточным белком (связывание антигена в крови) — по показателям количества фибриногена в плазме крови и титру групповых α - и β -антител.

3. Количество антигенов, связанных с клетками крови в тканях. Для этого определяют количество кислых мукополисахаридов в элюатах эритроцитов и тип риноцитогаммы.

4. Реакция организма учитывается по венозно-капиллярной разнице в содержании лимфоцитов и активности сывороточной гиалуронидазы.

Эта иммунограмма включает в себя комплекс показателей и объективно отражает иммунобиологический статус организма.

Если иметь в виду защиту от инфекции (т. е. предупреждение и ограничение ее развития), то одним из важных факторов надо считать специфическую активность клеток лимфоидной ткани, т. е. их барьерфиксирующую и фагоцитарную функции, которые получают выраженное развитие в воспалительной реакции. Выраженной формой такой реакции является местная аллергическая реакция. Готовность организма ответить такой реакцией отражает потенциальную реактивность организма. Реакция вызывается внутрикожным введением антитканевой (антиретикулярной) кроличьей сыворотки в малых дозах (от 0,001 мл и ниже). Это приводит к формированию *in loco* комплекса антиген-антитело (антигенами служат соединительнотканые структуры кожи), активирующего комплемент и вызывающего миграцию лейкоцитов, которые под влиянием иммунного комплекса выделяют медиаторы. Они, в свою очередь, обуславливают развитие воспалительной реакции, наличие и интенсивность которой (или отсутствие) характеризует готовность организма мобилизовать иммунную систему.

Для постановки внутрикожной пробы необходимо заранее приготовить видоспецифическую антисыворотку. Она готовится путем гипериммунизации кроликов сывороткой крови того вида животных, реактивность которых определяют. Затем полученную антисыворотку вводят животным внутрикожно в дозе

0,02 мл. С другой стороны, в такой же дозе вводят нормальную сыворотку крови кролика и через 16–18 часов после введения учитывают результаты реакции. На месте введения антисыворотки постепенно развивается воспалительная реакция. Она характеризуется увеличением кожной складки, достигающим максимума через 20–24 часа. Оценка степени выраженности реакции учитывается путем измерения складки с помощью штангенциркуля до и после введения сыворотки. Если имеет место увеличение кожной складки на 2–3 мм, то это слабоположительная реакция, на 4 мм и выше — положительная. Характер положительной реакции свидетельствует о силе барьерной функции, фагоцитарной активности клеточных элементов и потенциальных возможностях естественной резистентности организма.

Метод внутрикожной пробы с видоспецифической антисывороткой для массового определения общей физиологической реактивности у крупного рогатого скота представляет у sensibilizированных животных определенную опасность. На первичное введение чужеродной сыворотки у отдельных животных, помимо местного воспалительного отека участка кожи спустя 3–4 минуты после инъекции, наблюдалась общая реакция, проявляющаяся возбуждением, учащением дыхания и пульса, отеком век, преддверия влагалища и ануса, кашлем и слезотечением. При повторном введении сыворотки, которое осуществлялось через 4 месяца, гиперергическое проявление реакции с признаками анафилактического шока отмечалось почти у 30% животных. При повторном антигенном воздействии картина анафилактического шока проявлялась в более выраженной форме. Кроме набухания и цианоза слизистых оболочек глаз, носа, рта, преддверия влагалища у животных наблюдали отечность подкожной клетчатки в области нижней трети головы и подгрудка. Дыхание становилось частым, прерывистым, были слышны гортанные хрипы. У теленка уже через 3 минуты после введения сыворотки можно было наблюдать картину острого анафилактического шока со смертельным исходом.

Предложена внутрикожная проба, в которой вместо видоспецифической «антисыворотки» был применен 0,1% -ный

раствор гистамина. При введении гистамина имеет место реакция повышенной чувствительности немедленного типа, и поэтому результаты этой реакции учитывают через 30 минут, 1 час и 1,5 часа после введения. Недостатком данной реакции является то, что она не может объяснить весь комплекс сложнейших защитных явлений организма. Кроме того, при повторных постановках пробы не исключается возможность нежелательных реакций. При постановке повторных проб необходимо учитывать результаты первой пробы и соответственно варьировать дозировку. Если при первой пробе реакции на опытную сыворотку были выраженными, при повторной пробе нужно снизить дозировку.

Известен также способ оценки иммунологической реактивности организма по аутофлоре кожи. В настоящее время персистенция микроорганизмов (бактерии и вирусы) установлена на всех уровнях макроорганизма и рассматривается как закономерное биологическое явление. Микроорганизмы обитают в коже, естественных полостях и тканях органов, в цитоплазме и ядре клеток хозяина, могут обнаруживаться в кровеносных сосудах. Благодаря иммунным процессам устойчивости организм самостоятельно регулирует количественный и качественный состав поверхностной и эндогенной микрофлоры. В свою очередь насыщенность макроорганизма микроорганизмами способствует поддержанию в нем постоянного и напряженного иммунного потенциала, необходимого для нормального функционирования иммунной системы. Следовательно, снижение состояния устойчивости организма будет способствовать увеличению численности и изменению качественного состава микроорганизмов. А это повлечет за собой усиление иммунного статуса и повышение устойчивости организма. Общность микроорганизма и макроорганизма в данном случае рассматривается как саморегулирующаяся экологическая система.

Каждый организм имеет собственную аутофлору (микрофлору), и при различных состояниях создаются условия для ее активации. Наиболее тесный контакт с макроорганизмом испытывает флора глубоких слоев кожи; исследуя ее можно выявить ранние изменения иммунологической реактивности. Изучение аутофлоры глубоких слоев кожи осуществляется следу-

ющим образом: кожа обтирается тампоном, смоченным стерильным 0,25%-ным раствором нашатырного спирта. Последний вызывает усиленную секрецию кожных желез, и флора глубоких слоев кожи поступает на поверхность эпидермиса. Через 1–2 секунды предметное стекло со средой Коростелева прикладывается к обработанному участку кожи, а затем его помещают во влажную камеру и инкубируют при 37°C. Через 18–24 часа учитывают число выросших колоний и патогенных (маннитоположительных) форм. Среда Коростелева представляет собой мясопептонный агар с добавлением ингибитора роста — 1,5%-ного спиртового раствора бромтимолблау (2 мл на 100 мл среды). Применение ингибитора при исследовании микрофлоры кожи животных позволяет получить рост отдельных форм и наблюдать увеличение их количества при снижении резистентности организма или заболевании животного. Для дифференциации бактерий по их биологическим свойствам к среде с ингибитором добавляют 1% маннита. Микробы, не разлагающие маннит, образуют колонии, окрашенные в цвет среды (темно-зеленый), а сбраживающие — в ярко-желтый. Применение предметных стекол со средой Коростелева позволяет делать отпечатки с различных участков тела животного после предварительного освобождения кожи от шерстного покрова, хотя удобнее использовать для этого участки кожи носового зеркала. Специальные исследования, проведенные на животных (крупный рогатый скот), показали наличие прямой зависимости между числом выросших колоний микроорганизмов и такими показателями естественной резистентности организма, как титр лизоцима, опсонофагоцитарное число. Следует полагать, что изменение микроорганизмов, персистирующих в других структурах (естественные полости, органы и ткани, клетки), также может использоваться в качестве критерия для оценки иммунного состояния.

Заслуживает внимания подход к оценке устойчивости животных по норме реакции на воздействия факторов внешней среды. Это, по существу, оценка конституции животных. Современное представление о конституции должно включать в себя, наряду с особенностями развития продуктивных и племенных качеств, и особенности в отношении устойчивости

организма к воздействию неблагоприятных факторов и микробных раздражителей. Устойчивость, таким образом, является выражением общей конституции организма, фенотипическим результатом генотипических свойств. Понятие конституции исходит из представления о целостности организма, об определенных свойствах, которые могут быть использованы для обобщающей характеристики его как целого, и в то же время позволяет объединить отдельные особи в группы со сходными, специфическими для них качествами.

Метод основан на оценке изменения содержания кортикостероидов в крови животных под влиянием введения адренокортикотропного гормона гипофиза (АКТГ). Максимальное содержание кортикостероидов после нагрузки АКТГ по сравнению с исходным позволяет судить о силе реакции организма, а время (2, 4, 6 часов) возвращения содержания кортикостероидов после нагрузки АКТГ к первоначальному уровню — о скорости реакции. Несомненно, реакция животных зависела не только от активности надпочечников, но и от адренокортикотропной функции их собственного гипофиза, от «емкости» буферных систем организма и в известной мере через гипоталамус от реактивности нервной системы. Эта методика позволяет характеризовать реактивность организма в целом и может быть рекомендована для углубленных исследований конституции животных.

Существует также упрощенная методика для оценки типа конституции, которая основана на том, что лактационная функция у дойных коров доминирует, особенно в «разгар» лактации. Всякое воздействие внешней среды отражается прежде всего на этой функции. Для оценки нормы реакции коров на случайные воздействия внешней среды учитывают ежедневные удои на протяжении 30 дней. Затем устанавливается коэффициент изменчивости удоев, который дает представление о силе реакции. Что касается скорости реакции, то она оценивается по числу «пиков» на лактационной кривой — повышений удоев, за которыми следует их спад. Сравнимые животные должны быть близкими по периоду лактации (желательно на втором месяце стельности) и находиться в одинаковых условиях. В качестве воздействий могут быть использованы факторы, свя-

занные с изменением метеорологических условий, типа кормления и др. Важно, чтобы все оцениваемые животные подвергались воздействию естественных факторов в одинаковой степени. Эта методика не очень точна, однако весьма доступна для оценки типа конституции.

Для выявления устойчивых животных применимы и физиологические показатели, связанные с резистентностью, возможно использование для этих целей терморегуляционной способности организма. Стремление к поддержанию постоянства внутренней среды — важнейшее физиологическое свойство организма высших животных. Эволюционно сложившаяся константа — сохранение температуры тела. В клинической практике температура тела является наиболее характерным показателем, отражающим течение жизненных процессов. Так, температура тела используется в качестве параметра подверженности животных инфекциям. Причем особое значение имеет не абсолютная температура тела, а то, как она поддерживается при изменении температуры среды.

На этом основывается возможность отбора цыплят на жизнеспособность по температурной характеристике в первые дни жизни для повышения уровня резистентности поголовья. Изменение температуры проводят с односуточного до семисуточного возраста ежедневно. Вычисляют среднюю температуру за 7 дней измерения, среднее квадратичное отклонение (с помощью общепринятых методов) и индекс стабильности по формуле

$$И = \frac{X_n + M_n}{X_n - M_n},$$

где И — индекс стабильности повышения температуры тела цыплят; n — день измерения; M — средняя температура по стаду в определенный день; X — температура тела конкретного цыпленка в определенный день.

Индекс стабильности повышения температуры тела (И) определяется как отношение суммы абсолютных отклонений $(X_n - M_n)$ температуры цыплят от средней арифметической температуры по стаду в каждый день измерения к сумме модулей этих отклонений $(X_n - M_n)$. Например, сумма отклонений температуры тела данного цыпленка от средней по стаду

по дням измерения составила +0,2, +0,2, -0,2, +0,3, +0,3, +0,4, -0,1 = 1,1. Сумма модулей этих отклонений равна +1,7. Значит, индекс стабильности (И) равен +0,62. В цифровом выражении индекс стабильности изменяется от +1 до -1, причем при индексе стабильности, равном 0,6 и выше, цыплят относили к плюс-варианту и, наоборот, от 0,6 до 1 — к минус-варианту. Средняя температура тела при этом должна соответствовать средней температуре по стаду. Отбор цыплят согласно приведенной температурной характеристике в первые дни жизни позволяет значительно повысить уровень естественной резистентности селекционируемого стада.

Степень совершенства терморегуляторных процессов устанавливалась в 10-дневном возрасте цыплят путем дозированного (15 мин) воздействия на них низких температур (+4°C) и регистрации соответствующих реакций (температуры тела) через 15, 30, 60, 90 и 120 мин. В результате проведенных исследований установлены значительные изменения температуры тела цыплят в ответ на действие низкой температуры воздуха. Пределы колебания температуры тела в среднем по группе (50 голов) составили 3,49°C. Однако в группе могут быть цыплята как с большим, так и с малым размахом. Если величина колебаний температуры тела отражает совершенство терморегуляционных процессов, то большой размах колебаний температуры тела у отдельных особей указывает на несовершенство защитно-приспособительных механизмов, участвующих в терморегуляционных процессах. Дальнейшие наблюдения за группами цыплят, различающихся по пределам температурных колебаний (уровнем совершенства терморегуляционных процессов), показывают, что цыплята, у которых процессы терморегуляции более совершенны, лучше растут и развиваются: среднесуточные привесы и относительная энергия роста у этой группы цыплят выше. Они оказались более крепкими, жизнеспособными и более устойчивыми по отношению к действию микробного возбудителя.

Надо полагать, что от степени и характера совершенствования других систем развивающегося организма зависит его устойчивость по отношению к другим неблагоприятным факторам, в том числе и к микробным возбудителям. Таким обра-

зом, изучение процессов совершенствования более сложных форм поведения в онтогенезе может дать ценную информацию для прогноза естественной устойчивости организма.

УСТОЙЧИВОСТЬ К ЖАРЕ

Большинство методов оценки устойчивости животных к жаре основано на учете какого-либо физиологического или морфологического признака, который связывают со степенью гомеостаза по температуре тела. Для оценки резистентности крупного рогатого скота к жаре были предложены специальные формулы (методы) А. Роуда (1944), Р. Галааса (1947), И. Бинсма (1948, 1949), Ю. О. Раушенбаха (1961). Так, А. Роуд предложил оценивать устойчивость животных по формуле («Иберийская проба»):

$$ИТ = 100 - 10 (ВТ - 101),$$

где ВТ — температура тела данного животного при температурной нагрузке, выраженная в °F; 101 — средняя температура тела в условиях термонейтральной зоны, °F; 10 — коэффициент, выражающий различия в реакции температуры тела в целых числах; 100 — относительная величина, выражающая полную способность животного сохранять температуру тела неизменной.

При определении степени теплоустойчивости измеряется температура тела при определенных условиях и значение температуры подставляется в формулу. Например, при температуре тела животного равной 103,8°F, теплоустойчивость будет $100 - 10(103,8 - 101) = 72$.

Ю. О. Раушенбах предложил теплоустойчивость определять по формуле:

$$ИТУ = 100 - 20[(T_2 - T_1) + K(40 - t_2)],$$

где T_1 — температура тела в условиях термонейтральной зоны; T_2 — температура тела при температурной нагрузке (выше 30°C); t_2 — температура среды (при температурной нагрузке); K — коэффициент регрессии температуры тела на температуру среды.

В основу этой формулы была положена установленная зависимость в изменении температуры тела от изменения температуры среды. Это позволило проводить определение теплоустойчивости при любой температуре среды выше 30°C. Кроме того, в формулу была введена разница между температурой тела при температурной нагрузке и температурой тела в термонейтральной зоне каждого животного. К — коэффициент для разных видов животных. Для крупного рогатого скота он составил 0,06; для овец — 0,05, для свиней — 0,07. На этом основании формула преобразовалась так:

для крупного рогатого скота

$$\text{ИТУ}_к = 2(0,6t_2 - 10dT + 26);$$

для овец

$$\text{ИТУ}_о = 2(0,5t_2 - 10dT + 30);$$

для свиней

$$\text{ИТУ}_с = 2(0,7t_2 - 10dT + 22),$$

где t_2 — температура среды при температурном напряжении; dT — разница в температуре тела днем при высокой температуре среды и утром в термонейтральной зоне. При оценке устойчивости по методу Ю. О. Раушенбаха частота дыхания не учитывается.

Метод Р. Бенезра (1954) отличается от метода А. Роуда и Ю. О. Раушенбаха тем, что в нем учитывается частота дыхания, и потому является более точным и чувствительным. Формула Бенезра состоит из двух частей, дающих после сложения коэффициент адаптации:

$$\text{КА} = \frac{\text{РТ}}{38,33} + \frac{\text{ЧД}}{23},$$

где РТ — ректальная температура тела животного при данных условиях, °С; ЧД — частота дыхания в минуту при данных условиях окружающей среды; 38,33 — температура тела при наиболее благоприятных условиях; 23 — частота дыхания в минуту при самых благоприятных условиях среды.

Л. Вianca (1963), используя формулу Бенезра, пришел к выводу, что она несостоятельна, так как реакция по частоте

дыхания всегда значительно больше реакции по температуре тела и потому искажает истинную картину теплоустойчивости животного. У теплоустойчивых животных частота дыхания может увеличиваться больше, чем у неустойчивых, при значительном сокращении емкости выдоха. В этом случае при поверхностном и учащенном дыхании обеспечивается эффективность испарения с поверхности дыхательных путей. Кроме того, температура тела (равная 38,33 по формуле Бенезра) и частота дыхания (равная 23) при самых благоприятных условиях окружающей среды в различных экологических зонах и у различных пород могут иметь несколько другие значения.

Формулу Бенезра уточнили, введя в нее частные коэффициенты регрессий частоты дыхания на изменение температуры тела. Используя частные коэффициенты регрессии частоты дыхания и частоты пульса, предложена новая формула:

$$СТ = X_1 + 3,69X_2,$$

где СТ — степень теплоустойчивости; X_1 и X_2 — частота пульса и дыхания при данной температуре среды.

В реальных исследованиях оценка термоустойчивости молодняка крупного рогатого скота различных пород проводится по формуле:

$$КА = \frac{T_d}{T_y} + \frac{D_d}{D_y},$$

где КА — коэффициент выносливости (адаптации); T_d — температура тела животного в дневные часы; T_y — температура тела в утренние часы; D_d — частота дыхания в минуту в дневные часы; D_y — частота дыхания в минуту в утренние часы.

Меньшие значения коэффициента выносливости (адаптации) указывают на более выраженную устойчивость животного к воздействию повышенных температур воздуха.

Изучая теплоустойчивость крупного рогатого скота, установили также положительную достоверную связь между количеством выпитой воды и температурой тела при температурной нагрузке. На этом основании иногда для оценки степени теплоустойчивости прибегают к тесту «расход воды»

животными при высоких температурах среды. Для наиболее теплоустойчивых пород характерно более низкое содержание калия в эритроцитах. Это может служить надежным показателем теплоустойчивости различных пород крупного рогатого скота.

В связи с интенсификацией животноводства и односторонней селекцией животных по показателям продуктивности в последнее время стали уделять внимание разработке методов, при помощи которых можно было бы в ранний период развития животных прогнозировать не только их будущую продуктивность, но и устойчивость к заболеваниям, способность противостоять воздействиям неблагоприятных факторов внешней среды.

Пренатальный период онтогенеза представляет собой подходящую модель для изучения не только процессов роста и развития, но и формирования отдельных факторов резистентности и иммунологической реактивности. Особенности новорожденного и молодого организма заключаются в том, что его адаптационная способность при переходе от внутриутробной к самостоятельной жизни испытывает более высокую нагрузку, чем в любой другой момент жизни, и, с другой стороны, многие органы и связанные с ним системы регуляции еще не достигли функциональной зрелости, характерной для взрослого животного. Причинами слабой реактивности растущего организма являются незрелость высшей нервной деятельности и гормональной системы, неполноценная выделительная функция желудочно-кишечного тракта и почек, легкая проницаемость барьеров, неполноценный характер воспалительной реакции. Центральная нервная система характеризуется незрелостью коры головного мозга. Нервная регуляция физиологических процессов осуществляется в основном за счет безусловных рефлексов. Барьерная функция печени выражена очень слабо. Температурный баланс плода определяется температурой тела матери. Организм новорожденного не может тотчас же после рождения компенсировать повышенную теплоотдачу в окружающую среду. Поэтому у всех животных в первые часы жизни температура тела понижается, но к концу первого дня вновь несколько повышается.

Большая по сравнению со взрослыми животными поверхность тела молодняка и необходимость в энергии для процессов роста обуславливают и более интенсивный обмен веществ в расчете на единицу массы и более высокую, чем у взрослых животных, потребность в энергии. Несовершенство защиты против инфекции проявляется низким уровнем неспецифических защитных факторов, неполноценностью иммунной реакции и выражается в следующем: удлинении срока между поступлением антигена и первым появлением антител; ускоренном снижении достигнутого титра антител, т. е. более быстрой утрате иммунитета; быстром наступлении иммунологической толерантности; повышенной поглотительной функции клеток РЭС и пониженной ферментативной.

Неполноценная функциональная способность некоторых органов новорожденных по сравнению со взрослыми животными может быть обусловлена генетически, но основная причина лежит в отсутствии адекватных раздражителей в течение внутриутробного развития. После рождения имеет место совершенствование функции и систем организма новорожденного. Различные органы достигают функциональной зрелости в различные периоды пренатального и постнатального развития. Новорожденные животные в видовом, породном и индивидуальном аспекте рождаются с разной степенью морфофункционального развития физиологической зрелости. Приспособляемость молодых животных проявляется на ранних этапах индивидуального развития как определенная особенность реактивности и обмена веществ. Степень устойчивости организма в этот период обуславливается генотипической информацией и наиболее полно реализуется в условиях, оптимальных для большинства особей данного вида. Проявившаяся в раннем возрасте способность организма приспосабливаться к изменяющимся условиям внешней среды и противостоять воздействиям неблагоприятных факторов отличается определенной стойкостью в последующих возрастных периодах. Существует прямая зависимость между уровнем морфофункционального развития новорожденных животных (степенью их физиологической зрелости) и степенью приспособляемости организма на ранних этапах индивидуального развития, будущей

устойчивостью и (как следствие) продуктивностью. Особенности обмена веществ, обеспечивающие высокую степень адаптации к оптимальным условиям для большинства особей в раннем развитии, как правило, обеспечивают высокую устойчивость в зрелом возрасте.

Из практики передовых хозяйств известно, что мероприятия, снижающие темпы приспособления организма новорожденных животных к условиям внешней среды, нежелательны. Чем короче срок, необходимый для приспособления организма, тем перспективнее будет беспрепятственное развитие и дальнейшее совершенствование. Осуществляя оценку уровня физиологической зрелости и учитывая характер совершенствования функций и систем в процессе развития организма, можно не только прогнозировать возможность возникновения заболеваний (устойчивости или восприимчивости), но и профилировать их путем создания условий, отвечающих потребностям организма животного. Важным критерием оценки и прогнозирования устойчивости животных может служить показатель ускорения темпов приспособления к оптимальным для большинства особей условиям существования. Причем объективную оценку развивающегося организма следует давать на основе не статической, а динамической его характеристики с применением функциональных проб, выявляющих запас прочности его систем, надежность биологической системы в целом. В качестве одного из показателей, способных характеризовать особенности формирования устойчивости организма, была использована лихорадочная реакция на ранних стадиях постнатального онтогенеза. В результате выявлено, что становление клинического статуса (температура, пульс, дыхание) и морфологического состава крови происходит параллельно с формированием иммунологической реактивности.

Некоторыми исследователями высказывается возможность прогнозирования заболеваний и падежа телят по содержанию общего белка в плазме крови. Телята, у которых концентрация белка составляла менее 6 г/дкл, болели чаще (59%), чем телята, у которых концентрация общего белка была выше (19%). Падеж 3,9% был в группе телят с содержанием общего белка менее 6 г/дкл.

Заслуживает внимания метод оценки-стресс чувствительности свиней с использованием анестезирующего газа галатона. Явление стрессового синдрома характеризуется повышенной чувствительностью животных к стрессорам, учащением случаев внезапной смерти. Метод позволяет судить о конституционном и метаболическом типе животного, а также об уровне его реакций на воздействие факторов внешней среды. Определив в возрасте 8–12 недель предрасположенность к стрессу, можно решить вопрос дальнейшего использования животных для товарных или племенных целей. Метод оценки заключается в следующем: 6–8-недельных поросят в спокойном состоянии фиксируют, надевают им маску, через которую они в течение 3 минут вдыхают смесь галатона с кислородом. Через минуту наступает сонное состояние с проявлением двух форм реакций:

- полное расслабление в течение 3 минут (отрицательная реакция, характерная для стресс-устойчивых свиней);
- нарастающее напряжение задней четверти тела (положительная реакция, характерная для стресс-чувствительных животных).

При проявлении положительной реакции маску снимают, чтобы предупредить наступление гипертермического синдрома с подъемом температуры. У животных, положительно реагирующих на газ, реакция проходит через 3–5 минут. При откорме тестируемых животных пало 3,92% свиней, чувствительных к галатону, и 0,29% устойчивых к нему. При транспортировке и перемещениях свиней, чувствительных к галатону, погибает на 12% больше, чем животных, не реагирующих на этот тест. Стресс-чувствительные свиньи дают меньшие среднесуточные привесы при большем потреблении корма и более продолжительном сроке откорма. По качеству мяса они значительно уступают животным, отрицательно реагирующим на галатоновый тест. Селекция стресс-устойчивых животных позволяет эффективно улучшить конституцию и состояние здоровья селекционируемой популяции и достигнуть оптимальной комбинации высокой продуктивности с хорошим качеством мяса.

Применение современных данных по гистохимии, иммунологии, биофизике и другим наукам открывает новые пути и

методы изучения сложного механизма естественной резистентности организма животных на более глубоком уровне. Ветеринарный врач должен уметь оценить меру здоровья животных, биологические возможности, степень надежности систем животного организма. На этой основе можно разрабатывать средства и методы профилактики болезней или решать вопрос о целесообразности использования животных. Наиболее надежным критерием здоровья животного следует считать показатель его продуктивности. Если продуктивность животного соответствует генетическому потенциалу, то при таком физиологическом состоянии животное можно считать здоровым, а условия, в которых оно находится, соответствующими его физиологическим потребностям. Животных, у которых наблюдается скрытая патология физиологических изменений в период адаптации при низкой продуктивности, нельзя считать здоровыми, хотя у них заболевание клинически не проявляется.

Защитные реакции в организме могут различаться не только качественно, но и по интенсивности. В одном случае действие факторов внешней среды, в том числе и микроорганизмов, может обуславливать начальные стадии напряжения организма или отдельных его систем. В другом случае, наоборот, развиваются защитные реакции, угрожающие целостности отдельных тканевых структур и организма в целом. Между этими двумя крайними состояниями могут быть и промежуточные. Действие на организм различного рода неблагоприятных факторов всегда сопряжено с дополнительными энергетическими тратами или повреждениями. При этом важным критерием защиты становится способность организма сохранять постоянство энергетического потенциала, а целью — становление постоянства внутренней среды. Изменение энергетического обмена в условиях напряжения организма реализуется на всей организации биосистемы — от организменного до клеточного.

При разработке метода интегральной оценки устойчивости животных к заболеваниям необходимо учитывать весьма важный методологический принцип единства защитного и повреждающего в механизмах устойчивости. Сущность этого принципа заключается в том, что всякая защитная реакция может вызвать повреждения и всякое повреждение несет в себе элемен-

ты защитного. Единство защитного и повреждающего в механизмах устойчивости прослеживается как при анализе биологической роли реакций на уровне клетки, так и организма в целом. Можно сформулировать требования, предъявляемые к способу оценки устойчивости, жизнеспособности животных:

1. Способ должен быть рассчитан на животных раннего возраста.
2. Способ должен обладать достаточно высокой степенью точности (достоверности).
3. Способ должен быть простым в применении и использовании для массовых обследований.
4. Способ должен быть дешевым и быстро выполнимым.

ИЗМЕНЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ

Устойчивость животных к заболеваниям представляет собой количественный признак, и имеется реальная возможность изменить ее определенными методами. Она зависит от генетических особенностей и факторов внешней среды, причем последние обуславливают 2/3 объема получаемой продукции. О наследственной устойчивости к заразным болезням было известно в глубокой древности. Было установлено, что эта устойчивость наиболее совершенна, так как она наследственно закреплена в ряде поколений и проявляется у всех представителей биологических видов, причем у большинства из них представлена врожденными механизмами.

Наследственная устойчивость животных к болезням складывается не только из устойчивости к отдельным инфекционным и инвазионным возбудителям, но и из конституциональной крепости. Однако вопросам укрепления этой устойчивости животных не уделяется достаточного внимания. Известно, что борьба с болезнями, и особенно с инфекционными, основывается главным образом на специфической профилактике и ветеринарно-санитарных мероприятиях.

Наследственные факторы устойчивости могут быть широко использованы в борьбе с такими заболеваниями, как туберкулез, бруцеллез, лейкоз, маститы и др. Путем отбора можно повысить устойчивость птицы против неблагоприятных факторов

внешней среды, вызванных неполноценным кормлением, неблагоприятными условиями. Созданы породы скота, устойчивого к кровепаразитарным заболеваниям. Путем селекции удается создать стадо свиней отродья крупной белой породы, устойчивых к атрофическому риниту и бронхопневмонии. С бруцеллезом свиней можно бороться в обычных производственных условиях путем использования линий, обладающих наследственной устойчивостью к возбудителю *Brucella suis*. Для выявления устойчивых и предрасположенных к этому заболеванию поросят их в возрасте 10 недель искусственно заражали (per os), а через 2 недели проводили тесты на агглютинацию. Отрицательный показатель (отсутствие агглютининов против возбудителя) свидетельствовал об устойчивости к заболеванию. Стойкая положительная реакция при высокой степени разведения сыворотки учитывалась как показатель предрасположенности к нему.

Чтобы массовая селекция была успешной, нужно разработать такие методы оценки устойчивости, которые помогли бы легко выявить устойчивых животных в раннем возрасте, не подвергая их искусственному заражению. Кроме того, необходимо знать механизмы, обеспечивающие устойчивость к заболеваниям у различных видов и пород животных, и показатель наследуемости. Селекция на резистентность у сельскохозяйственных животных и реальна, и необходима. Даже однократный отбор в стаде кур сопровождался снижением количества слабых кур с 17 до 7%.

Наличие животных с очень сильными факторами естественной резистентности относительно невелико — 1,46%. Но зато существуют и такие фенотипические комбинации, у которых три из четырех факторов естественной резистентности являются сильными. Частота их встречаемости составляет около 10%. Таким образом, в популяции животных существуют гены резистентности, из которых можно формировать новые резистентные генотипы. При изучении генетических основ резистентности нужно учитывать степень резистентности, поскольку значительная часть заболеваний животных связана с микрофлорой тела и окружающей средой. Для этого полезно применять вычисление фенотипического и генотипического индексов естественной резистентности того или иного животного.

В настоящее время имеется достаточно научно-теоретических исследований и практических наблюдений о возможности использования селекционных методов борьбы с заболеваниями животных. Селекция молочного скота на резистентность к заболеваниям позволит в течение 10 лет на 100% повысить эффективность ветеринарных мероприятий и на 50% сократить количество животных, нуждающихся в ветеринарной помощи. Для повышения устойчивости животных в определенных ситуациях может применяться межвидовая, межлинейная гибридизация с последующей селекцией более резистентных особей.

ВЛИЯНИЕ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ НА СОПРОТИВЛЯЕМОСТЬ

Многочисленными исследованиями установлено, что количество кормов, их химизм, а следовательно, и питательная ценность во многом определяются природно-климатическими условиями, характером почвы и воды. Например, недостаток в почве и воде тех или иных химических элементов отражается на химическом составе, соотношении питательных веществ корма, а через корма влияет и на животных. Для повышения резистентности овец в своеобразных геохимических провинциях (регионах) рекомендуется использовать микроэлементы в критические периоды развития животных. Предложен метод искусственной подкормки овец недостающими в кормах Си и Со. Маток подкармливают биотическими дозами во втором периоде суягности, когда в материнском организме установлен невосполнимый дефицит микроэлементов.

Для каждой фазы развития зеленых растений характерны определенный тип обмена, химический состав и соотношение питательных веществ. В процессе роста в растениях изменяется соотношение водо-, соле- и щелочерастворимых белковых фракций, протеиновое и сахаропротеиновое соотношение, минеральный и витаминный состав. Изучение химического состава и соотношения питательных веществ имеет большое значение для правильной организации питания сельскохозяйственных животных. Установлено, что рационы могут обеспечивать высокие приросты веса, но быть недостаточно полноценными в отношении

формирования иммунологической реактивности в условиях интенсивного роста животных. Наиболее сильно выражены клеточные защитные факторы при скармливании люцерны в фазе цветения, а более слабо — в фазе плодообразования. Что касается фагоцитарной интенсивности нейтрофилов, то при скармливании всех исследуемых культур, за исключением люцерны, по мере их старения этот показатель повышается и притом довольно существенно.

Проявление лизоцимной активности сыворотки крови носит противоположный характер по сравнению с лейкоцитарным фагоцитозом. При скармливании овцам житняка на ранних фазах его развития фагоцитарная активность практически не изменилась, при скармливании в фазе цветения несколько повысилась, а лизоцимная активность сыворотки крови существенно поднялась. Подобное явление наблюдается и при скармливании люцерны: более высокие показатели лейкоцитарного фагоцитоза сопровождаются более низкими показателями лизоцимной активности.

Почти все звенья механизма устойчивости связаны с белком. Поэтому баланс его в рационе заслуживает особого внимания. Дефицит протеина, составляющий 15–20% норм ВИЖа, приводит к снижению всего комплекса иммунобиологических показателей — активности клеточных и гуморальных факторов защиты. Большое значение имеет сахаропротеиновое отношение в рационах животных. У молодняка крупного рогатого скота, выращиваемого на мясо, оно лучше проявляется при уровне 1,5–1,6. Дефицит протеина, аминокислот, витаминов и микроэлементов особенно сильно влияет на устойчивость животных в раннем возрасте; в связи с этим особое место в повышении устойчивости молодняка сельскохозяйственных животных к заболеваниям занимает молозиво. Его антитела обеспечивают защиту новорожденным путем абсорбции иммуноглобулинов кишечным трактом и посредством их локализации в кишечнике. Бактерицидные антитела IgM и G могут быть также активны в кишечнике, как и иммуноглобулины A. Доказано, что в молозиве и постколостральном молоке присутствуют неспецифические антимикробные вещества, которые повышают устойчивость телят против кишечных инфекций. К ним относятся

лактоферрин, лизоцим, лактопероксидазная система. Определенное значение имеют колостральные клетки (макрофаги и лимфоциты), роль которых в организме телят изучена еще недостаточно. Среди телят, не получающих достаточного количества молозива в первые 24 часа после рождения, погибает более 50%.

Большое влияние на животных оказывают условия содержания, особенности технологии, микроклимат помещений, размеры групп, плотность размещения животных; способы транспортировки, перегруппировки, а также биологические факторы среды — возбудители различных заболеваний (микроорганизмы, вирусы, грибки, гельминты, простейшие). Неблагоприятное действие названных факторов (по силе, продолжительности и характеру воздействия) обуславливает снижение устойчивости организма, повышение восприимчивости к различным заболеваниям, снижение продуктивности. Чем крупнее хозяйство и интенсивнее его технология, тем больше факторов способно снижать естественную резистентность животного и тем сложнее они взаимодействуют. Для интенсивных методов содержания характерно наличие стресс-факторов, снижающих естественную резистентность организма.

ЗАВИСИМОСТЬ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ОТ УСАОВИЙ СОДЕРЖАНИЯ И КОРМЛЕНИЯ

Нарушение технологии содержания обуславливает у животных возникновение общего адаптационного синдрома, при этом признаков клинического заболевания не наблюдается, однако здоровыми такие животные считаться не могут. Влияющие на организм раздражители стимулируют выработку в гипофизе адренокортикотропного гормона, а в коре надпочечников — глюкокортикоидов. Эти гормоны посредством многих механизмов препятствуют выработке антител. В присутствии кортизона снижается синтез белков и активность фагоцитов. Из-за выделения большого количества белых кровяных телец и недостаточной их замены снижается вес всех лимфатических узлов. У таких животных нет полноценного

ответа на действие антигена (вакцинацию). Поголовье с пониженной сопротивляемостью может стать жертвой действия условно-патогенной микрофлоры.

Среди факторов, существенно влияющих на функции иммунной системы, в частности на движение лимфы, видное место занимает моцион животных. Моцион способствует току лимфы, которая дренирует органы и ткани тела, участвует в переносе клеток белой крови и иммуноглобулинов, синтезированных в лимфоидных органах. Застой лимфы снижает устойчивость животных к заболеваниям. Движению лимфы способствуют мышечные сокращения, дыхательные движения, пульсация кровеносных сосудов.

Учитывая, что микрофлора воздуха и других объектов животноводческих помещений оказывает большое влияние на организм животного, полезно рассмотреть ее роль в условиях промышленной технологии животноводства, тем более, что в большинстве случаев естественная устойчивость животных рассматривается под углом зрения ее формирования и изменения в связи с влиянием природно-климатических условий, различных технологических факторов. В условиях промышленной технологии ведения животноводства при значительной концентрации поголовья на ограниченных площадках возникают предпосылки формирования микробных популяций, представляющих постоянную угрозу для животных. Высокая бактериальная обсемененность воздушной среды и других объектов животноводческих помещений является типичной для современных животноводческих помещений. Причем микрофлора в этих условиях подвержена выраженной изменчивости и приспособляемости. Ряд микроорганизмов (кишечная палочка, пастереллы, сальмонеллы, кокки и др.) широко распространены в окружающей среде и организме животных, приобретают патогенные свойства и обуславливают появление болезней с массовым охватом поголовья.

Охрана животных от заразных болезней методами и средствами, направленными на уничтожение возбудителей заболевания во внешней среде, является важным аспектом профилактической работы. Однако есть микроорганизмы, достичь полного уничтожения которых практически невозможно, да

и, видимо, нецелесообразно. Для нормального становления и функционирования иммунной системы организма животного необходимо постоянное воздействие на нее различных антигенов, в том числе патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в естественных условиях играющих роль стимуляторов иммунитета. Поэтому полное устранение естественных стимуляторов иммунитета приводит к ослаблению защитных механизмов, выработанных эволюцией.

С другой стороны, микроорганизмы, независимо от их патогенности, в том числе и сапрофитные, а также продукты их жизнедеятельности, воздействуя на организм, вызывают состояние нарастающей сенсibilизации. Возникающая в результате этого перестройка и повышенная чувствительность к отдельным из них представляет определенную опасность. Гиперчувствительность к реакции клеточного иммунитета, возникающую при стимуляции антигенами, могут обуславливать различные патологические осложнения, которыми иногда сопровождаются микробные инфекции. Через посредство иммунологических реакций может проявляться патогенность контактирующего с животным организмом микроба, который в других случаях рассматривается как безобидный сапрофит.

Антиген (микроорганизмы, живые и убитые, а также продукты их жизнедеятельности) является специфическим стимулом иммунологических реакций, для каждой из которых существует определенный «порог». Причем эти реакции могут быть как положительными для организма, так и отрицательными. В одном случае при контакте иммунокомпетентных клеток с антигеном будет наблюдаться пролиферация, приводящая к образованию плазматических клеток, активно синтезирующих антитела, в другом — наоборот, деструктивные процессы, приводящие к повреждению тканей. Таким образом, болезнетворно могут действовать не только облигатно- и факультативно-патогенные микроорганизмы, но и сапрофитные, когда возникают определенные условия для их воздействия (количество, чувствительность к ним животных). Поэтому излишнее накопление их в животноводческих помещениях является нежелательным.

Каждый вид возбудителя встречается в природе в виде штамма различной вирулентности. Многие факторы среды

могут усиливать или снижать степень вирулентности микроорганизмов. Аналогичное явление может наблюдаться и в организме животного. Для суждения о силе воздействия на организм животного недостаточно знать абсолютную величину (количество, дозу) действующего возбудителя. Биологический эффект определяется не только этой абсолютной величиной, но и чувствительностью организма. Выяснение общебиологических закономерностей формирования вредной микрофлоры и контроль за количеством и свойствами этой микрофлоры позволит предвидеть возможность возникновения, развития и распространения болезней. Борьба с этой микрофлорой должна быть направлена не на полное ее уничтожение, а на снижение количества микроорганизмов до уровня, не оказывающего вредоносного влияния на организм животного (физиологический порог вредности). Однако роль микробной обсемененности воздуха и других объектов животноводческих помещений пока еще недооценивается. Условно- и слабопатогенные микроорганизмы ведут себя всегда в зависимости от устойчивости животного. При хорошей устойчивости они находятся в латентном состоянии и могут быть в равновесии с организмом. Нагрузка внешней окружающей среды нарушает это равновесие, и микроорганизмы уже могут вызвать заболевание некоторой части животных. Больные животные заражают окружающую их среду микроорганизмами с высокой вирулентностью. Таким образом, условно- и слабопатогенные возбудители болезней на крупных фермах могут вызвать эпизоотию.

Между микро- и макроорганизмами устанавливаются определенные взаимоотношения, которые имеют большое влияние на устойчивость организма животного. О нормальной микрофлоре известно, что она способствует защите организма-хозяина. Эта защита обусловлена антагонистическим действием одной группы микроорганизмов на другую. Кроме того, кишечная микрофлора является слабым антигенным стимулятором для организма. Под влиянием этой микрофлоры количество пропердина и иммуноглобулина поддерживается на уровне, достаточном для соответствующего воздействия на антигены. Широкое распространение получили смешанные, полифакторные заболевания, в которых участвуют вирусы, бактерии, гри-

бы и простейшие. Причем чаще такие заболевания регистрируются у молодняка, когда его завозят из различных хозяйств (этот молодняк различного происхождения, с неодинаковым уровнем естественной устойчивости, микробиозом, иммунным статусом).

В современных условиях на фермах промышленного типа и комплексах значительно возросла роль санитарного состояния среды (объектов внешней среды, животноводческих помещений) в возникновении болезней. Существенным звеном профилактики болезней при этом стало соблюдение принципа «все пусто — все занято» поточно-цеховой технологии производства продукции животноводства и особенно на фермах по выращиванию молодняка. Главным преимуществом названной технологии является то, что создаются условия для тщательной санации объектов животноводческих помещений. Если животные в течение всего стойлового периода содержатся в помещении, то к концу стойлового периода там накапливается много микрофлоры, в том числе и патогенной. Достичь полного уничтожения этих микроорганизмов, особенно в зимний период, при наличии животных в помещениях практически невозможно. В условиях неблагополучия хозяйств по хроническим инфекциям внедрение поточно-цеховой технологии производства продуктов животноводства и воспроизводства стада является важным мероприятием, направленным на оздоровление фермы.

ВНЕШНИЕ И ВНУТРЕННИЕ ФАКТОРЫ СНИЖЕНИЯ ЗАЩИТНЫХ СВОЙСТВ ОРГАНИЗМА

Взаимосвязь возникновения патологических состояний вследствие неблагоприятных влияний внешней среды — неопровержимый аргумент в пользу того, что различные **стресс-факторы** могут повысить восприимчивость животных к инфекционным болезням. Они могут также тормозить неспецифические механизмы и нарушать специфические функции иммунитета. К стрессам относятся температурно-влажностные факторы воздуха, радиация, шумы, ненужные вакцинации и т. д.

Тепловой стресс увеличивает количество бактерий, проходящих через передний отдел желудочно-кишечного тракта, увеличивает смертность животных от инфицирования их грам-отрицательной микрофлорой (дизентерия, паратиф и др.). Кратковременное воздействие теплового стресса приводит к снижению у птиц синтезируемых и циркулирующих антител.

У телят раннего возраста повышенная температура воздуха нарушает механизм приобретения материнского пассивного иммунитета, в то время как при оптимальной температуре уже в течение первых суток организм насыщается антителами. Повышенная температура воздуха в телятнике препятствует всасыванию через стенку кишечника молозивных иммуноглобулинов, что способствует возникновению различных болезней с высоким падежом молодняка. Повышенный тепловой стресс в сочетании с высокой относительной влажностью вызывает у крупного рогатого скота лейкоцитоз со снижением показателя отношения лимфоциты: нейтрофилы. Нарушается также и клеточный иммунитет. Количество бокаловидных клеток эпителия слизистых оболочек дыхательных путей у телят снижается.

Холодовой стресс значительно снижает устойчивость животных и птиц к инфекционным болезням, что доказано еще Л. Пастером, который заразил курицу сибирской язвой после охлаждения ее ног холодной водой. Холодовой стресс увеличивает восприимчивость поросят к вирусному трансмиссивному гастроэнтериту. Стадия резистентности организма животных к холоду сопровождается увеличением потребления корма в 1,5–2 раза. Неудовлетворительный микроклимат, длительно действующий на организм беременной матери, приводит к рождению молодняка с уже истощенной адаптационной системой, предрасположенного к заболеванию сразу после рождения. Даже передозирование ультрафиолетового облучения животных ведет к истощению организма с последующими нежелательными для него последствиями.

Стресс представляет собой стандартную адаптационную реакцию в ответ на действие большого числа различных по природе факторов (интоксикация, травма, инфекционный процесс, длительная физическая и психическая нагрузка и т. д.), потенциально угрожающих существованию организма. Вне зависи-

мости от причины, ее вызывающей, в основе стресс-реакции лежит повышенная выработка адренокортикотропного гормона (АКТГ) и индуцированная ею гиперпродукция надпочечниками стероидных гормонов. В настоящее время есть основания полагать, что механизм стимуляции синтеза кортикотропин-рилизинг фактора (КРФ) или АКТГ могут различаться в зависимости от причины, вызывающей стресс. Так, в случае травмы, инфекционного процесса существенный вклад в развитие стресса может внести синтезируемый макрофагами в очаге воспаления интерлейкин-1 (ИЛ-1). За последние годы появились многочисленные данные о способности ИЛ-1 индуцировать секрецию АКТГ либо за счет прямого действия на гипофиз, либо за счет стимуляции КРФ. В обоих случаях это приводит к секреции надпочечниками глюкокортикостероидов, которые угнетают продукцию ИЛ-1 и ИЛ-2. Особую роль в развитии стресс-реакции под действием инфекции, особенно инфекции вирусной, играет, по видимому, АКТГ, синтезируемый лимфоцитами.

Для стресса характерны морфологические изменения в различных органах. Наиболее постоянны при стрессе следующие изменения: 1) увеличение надпочечников в основном за счет коркового слоя и их секреторной активности; 2) атрофия лимфатической ткани, сопровождающаяся явлениями лимфо- и эозинопении; 3) кровоизлияния в слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки. Таким образом, в основе стресс-реакции лежит повышенная выработка АКТГ и индуцированная ею гиперпродукция стероидных гормонов. Основным мишеням этих гормонов относятся лимфоциты, что и определяет реакцию иммунной системы и изменение устойчивости к инфекциям. Интерес к влиянию АКТГ и кортикостероидов на устойчивость к инфекциям был связан с широким применением этих препаратов в лечении таких заболеваний, как ревматизм, ревматоидный артрит и т. д. Изучалось действие этих гормонов на бактериальные инфекции, лептоспирозы, вирусные инфекции, риккетсиозные инфекции, заболевания, вызванные грибами, протозойные заболевания, гельминтозы. Установлены следующие закономерности действия кортизона и АКТГ:

1. Оба эти препарата снижают устойчивость животных к большинству названных выше инфекционных агентов.

2. Понижение резистентности имеет место как у естественно резистентных животных, так и у активно и пассивно иммунизированных животных.

3. Оба эти гормона активируют латентные инфекции и обуславливают гибель животных от обычно не патогенной для них флоры слизистых оболочек респираторного тракта и кишечника.

4. Течение инфекций у животных, получавших эти гормоны, характеризуется большой диссеминацией микробов по организму, усиленным их размножением и уменьшением воспадения.

Стрессорные изменения затрагивают адаптивные системы организма, среди которых необходимо назвать и систему иммунитета. По мнению Г. Селье, «реакция иммунной системы среди прочих представляет собой соматическое выражение мобилизации защитных сил организма». Еще на этапе внутриутробного развития плода стрессы, перенесенные матерью, влияют на становление функции гипоталамо-надпочечниковой и иммунной систем плода. Отрицательное действие факторов внешней среды приводит к адаптационно-трофическим нарушениям в организме плода.

Стресс умеренной интенсивности вызывает преимущественно перераспределение лимфоцитов. Уменьшается масса тимуса, селезенки и лимфатических узлов. Количество клеток в селезенке и тимусе уменьшается непосредственно после начала воздействия стрессового фактора. При морфологическом исследовании селезенки отмечено клеточное опустошение интерфолликулярного пространства (тимуснезависимой зоны). В тимусе в период 12–24 ч с начала воздействия стрессового фактора границы между корковым и мозговым веществом становятся расплывчатыми, дольки уменьшаются в размере. Незрелые кортикальные лимфоциты мигрируют из тимуса и поступают в основном в костный мозг. В период мобилизации клеток лимфоидных тканей популяция лимфоцитов костного мозга увеличивается на 40–60%. Увеличение количества лимфоцитов в костном мозге совпадает по времени с мобилизацией гранулоцитарного резерва и резким увеличением числа нейтрофильных гранулоцитов в крови. В крови постоянно отмечается лимфопения.

Биологический смысл перераспределения лимфоидных клеток при этом процессе можно представить следующим образом. В соответствии с концепцией аварийного регулирования организм жертвует частью функций, в частности, требующих больших энергетических затрат, возможностью развития интенсивного иммунного ответа, для того чтобы использовать все ресурсы ради сохранения жизни или целостности системы. В то же время усиливается антигенноспецифическая составляющая иммунной защиты с целью не допустить проникновение патогенных микроорганизмов. Отражением этого процесса служит мобилизация гранулоцитарного резерва, резкое увеличение числа нейтрофильных гранулоцитов в крови. В костном мозге создается резерв зрелых иммунокомпетентных клеток как на случай прорыва в организм патогенов, так и для быстрого восстановления иммунокомпетентности после прекращения стрессорного воздействия.

Иная ситуация возникает при длительных и интенсивных стрессорных воздействиях. Повышение концентрации глюкокортикоидов позволяет им проникать в клетки за счет пассивной диффузии и связываться с рецептором для глюкокортикоидов, которые находятся в цитоплазме. Этот белок представляет собой пептид. Активированный благодаря присоединению кортикостероида комплекс гормон–рецептор проникает в ядро, связывается с определенными участками ДНК и осуществляет регуляцию транскрипции генов. В результате тормозится синтез интерлейкинов 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 12, 13, интерферона- γ , фактора некроза опухолей (ФНО- α). Активизируется синтез липопротеидов, которые, в частности, тормозят активность фосфолипазы A_2 . Глюкокортикоиды также тормозят или снижают действие таких медиаторов воспаления, как простагландины, лейкотриены, брадикинин, гистамин. Еще более драматические события развиваются, когда концентрация кортикостероидов повышается до уровня, который называется апоптоз.

Апоптоз — запрограммированная гибель клеток, связанная с фрагментацией ядерной ДНК до олигонуклеосомальных субъединиц, при интенсивном стрессе служит важной причиной снижения функциональной активности иммунной системы.

Апоптоз обычно развивается в пределах 10–12 ч после действия индуцированных факторов.

Снижение иммунокомпетентности при стрессе обусловлено следующими тремя механизмами:

1) перераспределением иммунокомпетентных клеток с опустошением зон, обеспечивающих наиболее благоприятные условия для развития оптимального иммунного ответа (например, селезенка, лимфатические узлы);

2) подавление синтеза медиаторов межклеточного взаимодействия, снижением подавленности на мембране клеток молекул адгезии;

3) усилением запрограммированной гибели клеток (апоптоза) под действием кортикостероидов.

Стресс высокой интенсивности приводит к апоптотической гибели большей части тимоцитов. К действию глюкокортикоидов наиболее чувствительны кортикальные CD4⁺, CD8⁺- тимоциты, неэкспрессирующие протоонкоген *cl-2*. Именно среди этой популяции тимических клеток и содержатся потенциально аутоагрессивные, не прошедшие отбор Т-лимфоциты. При повреждении зоны тимуса они могут выйти в кровь или окружающие ткани и нанести существенный вред организму. Высокая концентрация кортикостероидов предотвращает такой вариант развития событий.

К действию кортикостероидов, индуцирующих апоптоз, высокочувствительны Т-киллеры, НК-клетки, т. е. клетки-эффекторы противовирусного иммунитета. Стратегия иммунной защиты от внутриклеточных паразитов заключается не в нейтрализации патогена, а в разрушении клетки, приютившей внутриклеточный паразит вместе с инфекционным антигеном. Повреждение, вызванное клетками-киллерами, является обязательной платой за выздоровление при болезнях вирусной этиологии.

Таким образом, при интенсивной стресс-реакции организм, для того чтобы все силы направить на преодоление опасности, угрожающей жизни в данный момент, приостанавливает действие клеток-эффекторов, развитие противовирусного иммунитета, способного нанести вред организму. Иными словами, чем больше опасность, тем больше приходится жертвовать. Стресс-

реакция — это один из механизмов физиологической реакции организма на чрезвычайные обстоятельства. Цель реакции — избежать опасности, угрожающей жизни в данный момент. Стресс — это один из механизмов, с помощью которых все системы жизнеобеспечения подчиняются этой цели.

Высокая численность поголовья животных и птицы на ограниченной территории при пренебрежении условиями содержания может вызвать возникновение неинфекционных и особенно инфекционных болезней. Так, на комплексах довольно часто стали регистрироваться лейкозы, микоплазмозы, сальмонеллезы, дистрофии, колибактериозы и др. Особое распространение получили респираторные заболевания пастереллез и паратиф. Все это связано с содержанием животных в скученном состоянии, в условиях неудовлетворительного микроклимата, когда вирулентность микрофлоры резко возрастает, а в отдельных случаях слабовирулентные или условно-патогенные микробы приобретают ясно выраженную вирулентность.

Характерно преобладание вторичной микрофлоры (кишечные палочки, сальмонеллы, пастереллы, кокки, микоплазмы, токсические грибы, латентные вирусы и т. д.) в результате изменения классического микробного равновесия.

Лишение пастбищного содержания и выгулов, бессистемное применение химических препаратов способствует нарушению сложившегося микробного равновесия, исчезновению одних видов бактерий и появлению других. В последние годы на комплексах регистрируются гастроэнтериты микозного происхождения, язвы пищевода и желудка, дистрофии, токсикозы, малокровие и др. Иммуитет в условиях промышленного комплекса нередко ослабляется при содержании животных без подстилки большими группами. Среди свиней, содержащихся большими группами, формируется менее напряженный и непродолжительный иммунитет по сравнению с индивидуальным и мелкогрупповым содержанием.

Снижению естественной резистентности организма способствует *односторонняя селекция* животных и птицы с целью повышения продуктивности. Пренебрежение состоянием здоровья спариваемых особей ведет к ослаблению гуморальных,

тканевых и клеточных механизмов иммунитета. Неудовлетворительные системы вентиляции способствуют воздушно-капельному пути передачи инфекционного начала. Создаются пути усиленного пассажа возбудителя через восприимчивый организм животного и птицы, быстрой передачи его от больного животного здоровому.

Естественная резистентность организма животных формируется еще во время внутриутробного развития, а после рождения зависит от многих факторов внешней среды и различных их сочетаний. Поэтому во всех мероприятиях общехозяйственного и специального направления особое место должны занимать вопросы повышения естественной резистентности организма животных.

В животноводстве важное значение приобретает формирование животных, обладающих повышенной резистентностью к болезням и стресс-факторам. Поэтому выявление генетически обусловленных болезней, как и устойчивости к ним, приобретают особое значение в связи с широким распространением искусственного осеменения и увеличением нагрузки на производителя.

Генетики давно заметили, что конституционально крепкие животные меньше болели заразными и незаразными болезнями. При изучении генетической обусловленности комплекса гуморальных факторов естественной резистентности, выявлении групповых и межлинейных различий, а также по семействам было установлено, что уровень гуморальных факторов естественной резистентности в сыворотке крови во многом зависит от происхождения отцовской стороны. Этот фактор передается по наследству и определяет индивидуальность линий и родственных групп животных.

При оценке, отборе и подборе свиней для дальнейшего размножения, кроме общепринятых показателей необходимо учитывать *продолжительность супоросности маток*. Так как при повышении многоплодия она уменьшается, ремонтный молодняк надо отбирать только от тех свиноматок, у которых при высоком многоплодии продолжительность супоросности не ниже оптимального уровня — $114,5 + 0,5$ дней (возрастные и сезонные поправки этого показателя не обязательны ввиду их

несущественной практической значимости). В хозяйствах, производящих племенных хряков и реализующих спермопродукцию, при отборе свиней для дальнейшего размножения, кроме продолжительности внутриутробного развития, надо учитывать еще и показатели естественной резистентности организма. Для более надежной селекции свиней на повышение естественной резистентности организма считать подлежащими обязательной выбраковке тех племенных хрячков, у которых при сильнодействующих стрессах показатели естественной резистентности понижаются на 5–7% и более.

Проведенные всесторонние исследования по физиологическим особенностям супоросности свиноматок и постнатального роста, развития и формирования поросят, состояния их защитных факторов организма в зависимости от продолжительности внутриутробного развития, научно обоснованным методам отбора ремонтного молодняка по показателям резистентности родительских пар создают условия для развития высокоэффективного и рентабельного свиноводства.

У основной части маточного поголовья (93%) продолжительность супоросности находится в пределах от 112 до 117 дней. На ее продолжительность оказывает влияние сезон года: наибольшей она была зимой и весной, а наименьшей — летом и осенью ($P < 0,05$ и $0,001$). С возрастом период супоросности увеличивается, снижается многоплодие маток, но повышается живая масса поросят при рождении, их энергия роста и сохранность. Морфологический и биохимический состав крови молодняка свиней зависит от продолжительности их внутриутробного развития. Наибольшее количество эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, общего белка и его фракций отмечено в крови поросят с нормальным (114–115 дней) и удлинненным (116 и более дней) периодами внутриутробного развития и наименьшее — с укороченным (113 и менее дней) периодом. Свинки с укороченным периодом внутриутробного развития проявляли повышенную реакцию на стресс и в дальнейшем обладали пониженной адаптационной способностью и продуктивностью. У них оплодотворяемость, многоплодие и молочность были ниже, чем у животных с нормальным и удлинненным внутриутробным развитием и показавшим в раннем постнатальном

периоде пониженную реакцию на стресс. Сохранность и энергия роста поросят, полученных от высокорезистентного подбора родительских пар, были за подсосный период выше соответственно на 12,8 и 8,7%, чем у молодняка от низкорезистентного сочетания маток и хряков. Это позволяет уже в раннем возрасте производить отбор высокопродуктивного ремонтного молодняка, хорошо адаптированного к условиям промышленного содержания. У поросят, полученных от высокорезистентных родителей, содержится в крови эритроцитов на 9,8%, гемоглобина на 11,9% и лейкоцитов на 10,2% больше, чем у молодняка от родителей с низким уровнем естественной резистентности. У таких поросят более высокие клеточно-гуморальные факторы защиты организма. Поэтому при составлении селекционного плана подбора хряков и маток необходимо учитывать состояние их резистентности. Предпочтение следует отдавать гомогенному высокорезистентному подбору. Ремонтные свинки с высокой (1,5 кг) и средней (1,2–1,4 кг) живой массой при рождении имеют большие потенциальные возможности к проявлению своих продуктивных качеств, чем животные с низкой живой массой (1,0–1,1 кг). Оплодотворяемость у них выше соответственно на 3,4 и 3,3%, многоплодие — на 1,1 и 0,8 голов.

Изучая естественную резистентность коров черно-пестрой породы в связи с восприимчивостью их к субклиническим маститам, пришли к выводу, что для дальнейшего совершенствования животных черно-пестрой породы и их приспособленности к промышленной технологии в селекции следует учитывать не только уровень продуктивности животных, но и вводить в селекционный процесс показатели естественной резистентности и маститоустойчивости, содержание в молоке жира и белка.

При исследовании лизоцимной активности молока крупного рогатого скота установлено, что наибольшая лизоцимная активность его наблюдается у коров-первотелок. С возрастом (от пятой лактации и старше) она постепенно снижается. Этим ученые объясняют большую восприимчивость к заболеванию маститами коров старшего возраста. Наибольший титр лизоцима отмечен в зимний сезон, наименьший — в осенний. Они объясняют это снижением естественной резистентности в пере-

ходный период от пастбищного содержания к стойловому, а также сменой типа кормления в переходные периоды.

Для оценки неспецифической защиты организма лактирующих коров в условиях животноводческих ферм рекомендуется использовать способ, основанный на измерении длительности бактерицидной фазы молока потенциометрическим методом до изменения окислительно-восстановительного потенциала. Бактерицидная фаза молока обусловлена состоянием неспецифической защиты организма лактирующих коров. Установлена достоверная связь этой фазы с лизоцимной активностью крови, фагоцитарной активностью, фагоцитарным индексом, напряженностью бактерицидной сыворотки крови. Зависимость длительности бактерицидной фазы молока от отдельных показателей неспецифической защиты имеет линейный характер. Выявлено совпадение результатов определения бактерицидной фазы молока микробиологическим и потенциометрическим методами. Динамика окислительно-восстановительного потенциала молока имеет трехфазный характер: I фаза — падение в начальный период, обусловленное выходом газов из свежесвыдоенного молока; II фаза характеризуется постоянной величиной потенциала; III фаза — период резкого снижения вследствие увеличения числа и метаболической активности микроорганизмов. Оценка бактерицидной фазы молока потенциометрическим методом позволила выявить четыре уровня неспецифической резистентности: низкий — длительность бактерицидной фазы молока от 0 до 6 часов; субнормальный — от 6,1 до 9 часов; нормальный — от 9,1 до 12 часов и высокий — более 12,1 часов. Замораживание парного молока и хранение его при -10°C способствует сохранению бактерицидных свойств без изменения в течение 12 дней.

Длительность бактерицидной фазы молока коррелирует с уровнем неспецифической защиты крови, продуктивностью и изменениями биохимического состава крови и молока, что позволяет использовать ее в качестве интегрального показателя реакции организма лактирующих коров на действие факторов внешней среды. Изменение стереотипа машинного доения вызывает возникновение у коров стрессорного синдрома с изменением состава крови, содержания гормонов, неспецифической

защиты и молочной продуктивности. Оценка неспецифической защиты организма лактирующих коров потенциометрическим методом экономически более эффективна по сравнению с общепринятыми методами.

Выясняя сочетание генетически обусловленной высокой продуктивности с естественной резистентностью организма, установили, что помесные черно-пестрые и голштино-фризские животные давали больше молока, чем чистопородные черно-пестрые, а бактерицидная активность сыворотки крови у полукровных животных была несколько ниже, чем у чистопородных.

Основными причинами нарушения обмена веществ, приводящими к снижению естественной резистентности и продуктивности животных, являются следующие факторы: недоброкачественные корма, полученные с кислых почв; одностороннее и неполноценное питание; нарушение технологии приготовления и хранения кормов; нарушение гигиены содержания молочных коров, телят и нетелей, отсутствие моциона и ультрафиолетовое голодание.

Нарушение обмена веществ в организме коров протекает скрыто, клинически не проявляется, но дистрофические изменения, особенно в печени и эндокринных органах, приводят к необратимым явлениям, вызывающим преждевременную выбраковку коров.

Подводя итог изложенному, можно заключить, что физиологическое состояние организма животных, устойчивость их к неблагоприятным факторам среды и продуктивность во многом зависят от условий содержания. Организм животного может активно функционировать при создании оптимальных условий содержания и эксплуатации.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЕСТЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

В общей системе, обеспечивающей иммунитет и гомеостаз, наиболее древней является макрофагальная система, определяющая фагоцитоз и другие факторы естественной резистентности (ЕР) — комплемент, лизоцим, опсонины, интерферон, пропердин и др. На более поздних этапах развития постепенно ведущее место начинают занимать клетки иммунокомпетентной системы — Т- и В-лимфоциты.

Касаясь проблемы сопротивляемости животных, следует обратить внимание на то, что она зависит не только от способности организма формировать специфический иммунитет, но и от факторов естественной резистентности.

Факторы, определяющие ЕР животных, представляют собой защитные приспособления организма к различным неблагоприятным воздействиям внешней среды. Они имеют место в организме с первого и до последнего дня жизни животного и по-разному реагируют на раздражитель, передаваясь по наследству.

Современными методами лабораторного анализа можно дать количественную оценку степени ЕР. Ее показатели приобретают значительную патогенетическую и прогностическую роль при заболеваниях. Нарушение неспецифических защитных механизмов может повлечь за собой и расстройство клеточного взаимодействия, необходимого для индукции специфического иммунного ответа.

Безусловно, доминирующим фактором в системе ЕР является фагоцитоз, выступающий в первой линии эффекторных механизмов иммунологического гомеостаза животных. Существенную

роль в формировании ЕР занимают процессы внутриклеточного переваривания (лизоцим) и комплемент, а также нормальные антитела. Последние представлены в основном иммуноглобулинами G. Следовательно, определяя общий уровень иммуноглобулинов данного класса, можно дополнительно оценить общую резистентность животных.

Л и з о ц и м выполняет в организме важные биологические функции и, в первую очередь, оказывает стимулирующее воздействие на фагоцитоз. Поэтому изменение содержания этого фермента (мурамидазы) может способствовать атипическому течению патологического процесса. Кроме того, считают, что лизоцим является про-Т-лимфоцитов и моноцитов, следовательно, корреляция показателей их уровней, а также лизоцимной активности сыворотки крови животных может служить достаточно информативным признаком ЕР организма.

Интегральным отражением защитных сил организма может служить и показатель б а к т е р и ц и д н о с т и сыворотки крови животных. Бактерицидность обеспечивается опсонинами, комплементом, лизоцимом и другими биологически активными веществами.

К о м п л е м е н т — неспецифический фактор защиты организма. Особенно выражено его участие в иммунопатологических процессах. Показатель уровня комплементарной активности сыворотки крови отражает степень иммунологической настроенности организма животного.

Рассматриваемые методы представляют собой наиболее простые и доступные способы, не требующие дорогостоящего оборудования. Они могут быть использованы при оценке естественной резистентности высокопродуктивных племенных животных, в том числе быков и баранов-производителей (для селекционной работы), особенно ввозимых из других областей страны и из-за рубежа. Это позволит оценить животных на устойчивость их к болезням и общие адаптационные возможности. Рекомендуемые методы, особенно тест определения общего белка в сыворотке крови новорожденных животных, при внедрении в широкую практику позволяют дифференцированно подходить к применению лечебно-профилактических средств, их показанию и противопоказанию.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ФАГОЦИТОЗА

Основано на определении в условиях *in vitro* способности нейтрофилов периферической крови исследуемых животных (постановкой опсонофагоцитарной реакции — ОФР) фагировать (поглощать) микробные клетки. В качестве тест-культуры для ОФР используется чаще всего белый стафилококк — *Staph. albus*. До сих пор у исследователей нет единой терминологии относительно тех явлений фагоцитоза, которые они оценивают *in vitro*, а также и одного мнения о количестве тестов, оценивающих уровень фагоцитоза в организме животных.

Мы предлагаем наиболее распространенный вариант оценки фагоцитоза — по таким показателям, как фагоцитарная активность, индекс, число и емкость, каждый из которых может представлять самостоятельный интерес, отражая одну из сторон фагоцитоза.

Фагоцитарная активность (ФА) — это процент фагоцитирующих нейтрофилов к общему числу подсчитанных.

Фагоцитарный индекс (ФИ) — число микробных клеток (м. к.) в пересчете на один нейтрофил от общего количества подсчитанных нейтрофилов.

Фагоцитарное число (ФЧ) — число микробных клеток в пересчете на один активный (фагоцитирующий) нейтрофил.

Фагоцитарная емкость (ФЕ) — число фагоцитирующих нейтрофилов в 1 мкл крови животного.

Оборудование, материалы, реактивы:

- антикоагулянт 2% -ный раствор цитрата натрия на изотоническом растворе;
- 0,85% -ный раствор хлорида натрия;
- суточная культура *Staph. albus*;
- пластина (плато) с лунками для последовательных разведений;
- фотоэлектроколориметр с кюветой с рабочей длиной 1,08 мм;
- термостат в режиме работы 37°C;
- пипетки, градуированные на 1 мл; пастеровские пипетки; пробирки бактериологические;
- свежая венозная кровь животного, взятая в условиях, исключающих микробное загрязнение и охлаждение.

Ход определения ОФР. На скошенный агар делают посев культуры белого стафилококка. Пробирки помещают на 1 сутки в термостат. Суточную культуру тест-микроба смывают стерильным физиологическим раствором. Бактериальную суспензию стандартизируют на ФЭК с использованием зеленого фильтра до 0,25 ед. плотности, что соответствует содержанию 500 микробных тел в 1 мл суспензии. Стандартизацию тест-микроба проводят в рабочих кюветах с длиной 1,08 мм. Бактериальную суспензию помещают в кюветы и удаляют из них с помощью пастеровской пипетки, соединенной посредством резинового шланга с резиновой грушей. В лунки специальной пластины (плато), используемой в серологической диагностике для последовательных разведений, вносят по 0,2 мл суспензии тест-микроба указанной концентрации и затем прибавляют по 0,2 мл исследуемой пробы крови с антикоагулянтом, после чего пластину ставят в термостат на 30 мин. Пластины с пробами осторожно вынимают из термостата, чтобы избежать взбалтывания содержимого. Верхний слой жидкости, отстоявшийся в лунках, удаляют пастеровской пипеткой, а из следующего слоя (лейкоцитарного) отбирают небольшое количество и помещают на предметное стекло. Затем готовят толстые мазки, высушивают их на воздухе, фиксируют метиловым спиртом 3 мин или этиловым спиртом 20 мин и окрашивают краской Романовского (1–3 капли краски на 1 мл дистиллированной воды) 20–30 мин (при визуальном контроле с помощью микроскопа).

Оценка реакции. С помощью микроскопа при объективе $\times 90$ и окуляре $\times 10$ (под иммерсией) в окрашенных мазках крови учитывают не менее 50 фагоцитировавших нейтрофилов, не прекращая при этом общего подсчета нейтрофилов в поле зрения микроскопа. В каждом фагоцитировавшем нейтрофиле подсчитывают количество поглощенных микробных тел, произведя затем общий подсчет фагоцитированных микробных тел всеми активными нейтрофилами.

В целом же для комплексной оценки уровня фагоцитоза исследователю необходимо иметь следующие исходные данные:

- количество всех нейтрофилов, учтенных в мазке крови при подсчете фагоцитирующих;

- количество фагоцитирующих нейтрофилов (желательно не менее 50 клеток);
- абсолютное содержание лейкоцитов в 1 мкл крови;
- относительное (%) содержание нейтрофилов (по лейкоформуле);
- абсолютное (расчетное) содержание нейтрофилов в 1 мкл крови;
- количество фагоцитированных микробных тел (общее — суммарное число).

Таким образом, зная перечисленные данные, можно рассчитать 4 показателя ОФР, наиболее информативно отражающих уровень фагоцитоза у исследуемого животного.

МЕТОДИКА РАСЧЕТА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОФР

Фагоцитарную активность определяют по формуле:

$$\text{ФА} = \frac{50 \times 100}{N_y},$$

где N_y — общее число учтенных нейтрофилов при считке ОФР; 50 — количество фагоцитировавших нейтрофилов (оно может варьировать); 100 — пересчет в проценты.

Фагоцитарный индекс — это число фагоцитированных микробных клеток в пересчете на один учтенный нейтрофил. Определяется делением общего количества фагированных микробных тел на количество учтенных нейтрофилов (фагоцитирующих и не фагоцитирующих).

Фагоцитарное число показывает интенсивность фагоцитоза. Это количество микробных тел в пересчете на один активный (фагоцитирующий) нейтрофил. Данный показатель определяется делением общего числа фагированных микробных тел на число активных нейтрофилов. В нашем примере он равен 50 (активным нейтрофилам).

Фагоцитарная емкость — число активных (фагоцитирующих) нейтрофилов (тыс.) в 1 мкл крови:

$$\text{ФЕ} = \frac{\text{АСН} \times \text{ЧФН}}{100},$$

где АСН — абсолютное содержание нейтрофилов в 1 мкл крови; ЧФН — относительное содержание (%) фагоцитирующих нейтрофилов, рассчитанное после определения ОФР; 100 — перевод из процентов в абсолютное выражение.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИЗОЦИМНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

В основу метода определения лизоцимной активности (ЛА) сыворотки крови животных положена способность лизоцима быстро лизировать эталонную культуру *Micrococcus lysodeiticus*. Оценка лизоцимной активности проводится с помощью нефелометрии по изменению оптической плотности суспензии *Micrococcus lysodeiticus* после добавления в нее сыворотки крови.

Оборудование, материалы, реактивы:

- суточная культура *Micrococcus lysodeiticus*;
- 0,5% -ный раствор хлорида натрия;
- рН-метр (ионметр);
- ФЭК с кюветами, рабочая длина 10 мм;
- пипетки стеклянные градуированные на 1 и 10 мл.

Суточную культуру *Micrococcus lysodeiticus*, выращенную на твердом агаре, смывают 0,5% -ным раствором хлорида натрия (рН 7,2). Плотность бактериальной суспензии доводят до 20% светопропускания на ФЭК при длине волны 420 нм.

Стандартизованную бактериальную суспензию разливают по 4,5 мл в бактериологические пробирки и добавляют в них по 0,5 мл сыворотки крови овец или крупного рогатого скота (разведение 1:9 — для овец и 1:5 — для крупного рогатого скота). В контрольные пробирки вносят по 5 мл суспензии тест-культуры.

Контрольные пробы и опытные (исследуемые) переносят в кюветы с рабочей длиной 10 мм и на ФЭК определяют процент светопропускания.

Пробирки с контрольными и исследуемыми пробами помещают на 1 ч в термостат, после чего вновь измеряют процент светопропускания.

Расчет лизоцимной активности производят по формуле:

$$ЛА = \frac{(D_1 \times K - D_0) \times 100}{D_1 \times K}$$

где ЛА — лизоцимная активность сыворотки крови, %; D_0 и D_1 — оптическая плотность содержимого испытуемых проб соответственно до и после инкубации; K — константа, равная 1,5 — для овец, 1,0 — для крупного рогатого скота.

В последнее время разработаны и внедрены новые модификации метода определения лизоцимной активности. Метод основан на изменении оптической плотности тест-культуры *Micrococcus lysodecticus* под влиянием свежей сыворотки крови, обладающей в зависимости от состояния животного в большей или меньшей степени лизоцимной активностью.

Из освеженной 24-часовой культуры на скошенном мясопептонном агаре (МПА) в стерильных условиях готовят суспензию микробной взвеси с величиной светопропускания 20% при длине волны 540 нм в кювете 0,3 см. Культуру с этой целью смывают стерильным фосфатным буферным раствором 1/15 М и разводят тем же буфером по показаниям фотоэлектроколориметра. Процент лизиса определяют по формуле:

$$X = A_{оп} - A_{исх}$$

где $A_{оп}$ — светопропускание исследуемой пробы, %; $A_{исх}$ — светопропускание исходной тест-культуры, равное 20%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ (БАСК)

Определение бактерицидной активности проводят по методу О. В. Смирновой и Г. А. Кузьминой. Метод основан на свойствах сыворотки крови оказывать бактерицидное и бактериостатическое действие на микроорганизмы (тест-культуру). Предлагаемый фотонейфометрический метод основан

на учете изменения оптической плотности питательной среды при добавлении в нее сыворотки крови.

Оборудование, материалы, реактивы:

- бульон Хоттингера стандартного состава;
- суточная культура *E. coli*, посеянная на твердый агар;
- 0,85% -ный раствор хлорида натрия, стерильный;
- ФЭК с кюветами, рабочая длина 10 мм;
- термостат с режимом температуры 37°C;
- пробирки бактериологические;
- дозатор полуавтоматический на 100 мкл;
- пипетки стеклянные градуированные на 1 и 10 мл;
- пробирки Флоринского.

Ход определения бактерицидной активности. Соблюдая правила стерильности, в бактериологические пробирки вносят 4,5 мл бульона Хоттингера, в который сеют культуру *E. coli*. Суточную культуру *E. coli* смывают стерильным физиологическим раствором и плотность суспензии доводят до 85% светопропускания на ФЭК. В опытные пробирки добавляют по 0,5 мл испытуемой сыворотки крови, а в контрольные вносят такое же количество стерильного физиологического раствора. Во все пробирки сеют *E. coli* (по 0,1 мл бактериальной суспензии рабочей концентрации). Для более точного дозирования клеточной суспензии тест-культуры *E. coli* посев рекомендуется производить полуавтоматическим дозатором типа Р-20 мкл вместо платиновой петли или микропипетки, как это предлагалось в ранее описанных методах. На ФЭК при зеленом светофильтре против физиологического раствора в кюветах с рабочей длиной 10 мм определяют оптическую плотность содержимого контрольных и опытных пробирок, после чего их помещают в термостат. Через 3 и 5 ч после начала реакции проводят замеры оптической плотности суспензии всех пробирок.

Нами предложена модификация определения БАСК, которая заключается в следующем. Для измерения ингибирования роста культуры *E. coli* штамма О₁ в бульоне Хоттингера при добавлении сыворотки крови культуру тест-штамма освежают в жидкой питательной среде — мясо-пептонном бульоне (МПБ). В пробирки в стерильных условиях разливают по 4,5 мл бульона Хоттингера, добавляют по 1 мл испытуемой сыворотки и по 0,1 мл взвеси су-

точной культуры. Две пробирки со средой оставляют в качестве контроля. Из каждой пробирки (опытных и контрольных) стерильно отбирают по 2 мл и определяют оптическую плотность исходных проб ($A_{o/исх}$ и $A_{к/исх}$) при длине волны 670 нм (по классическому методу — 540 нм), кювета 0,3 см, против бульона Хоттингера, который использовали как оптический контроль.

Оставшиеся пробы инкубируют при 37°C в течение 6 часов (по методу Смирновой и Кузьминой — 3 ч). Затем из каждой пробирки стерильно отбирают по 2 мл и вновь определяют оптическую плотность при тех же условиях ($A_{o/6}$ и $A_{к/6}$). Пробирки с оставшимися пробами снова помещают в термостат и продолжают инкубирование до 24 ч. Затем их колориметрируют при тех же условиях ($A_{o/24}$ и $A_{к/24}$).

Бактерицидную активность через время T (X_T) определяют как долю роста микроорганизмов в опытной среде в сравнении с контрольной (без сыворотки), в процентах.

На основании данных бактерицидной активности сыворотки, полученных через 6 и 24 ч культивирования тест-штамма, определяют «напряженность бактерицидной активности (НБА)»:

$$\text{НБА} = \frac{100 - X_{T_1} \times T_1 \times X_{T_2} \times T_2}{6 + 24},$$

где X_{T_1} , X_{T_2} — бактерицидная активность через 6 и 24 часа инкубации тест-штамма; T_1 , T_2 — время инкубации культуры (6 и 24 ч); 100 — процент роста культуры в среде без сыворотки.

Показатель «напряженность бактерицидной активности» или «общая бактерицидная активность» отражает процент ингибирования роста тест-штамма в результате влияния сыворотки крови с учетом продолжительности проявления этого свойства.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ

Комплементарная активность определяется по проценту гемолиза эритроцитов барана. Она обеспечивается, прежде всего, действием собственного компонента исследуемой сыворотки крови жвачных, а также и другими факторами,

способствующими лизису. Однако данный тест мы определяем как оценку общей комплементарной активности сыворотки крови, не детализируя участие каждого из возможных компонентов в реакции гемолиза (лизоцим, гемолизины и пр.).

Оборудование, материал, реактивы:

- антиген — 2,5% -ная взвесь тщательно отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе;
- гемолитическая (антиэритроцитарная) сыворотка, освобожденная от комплемента (биофабричная);
- исследуемая (свежая) негемолизированная сыворотка исследуемых животных, предварительно инактивированная 30 мин при 56°C;
- градуированные пипетки, пробирки, мерные цилиндры, колбы или стаканы для разведений, водяная баня, центрифуга, штативы, полимерные пластины с лунками (для разведений).

Постановка реакции требует тщательной подготовительной работы. Перед основным опытом готовят необходимые ингрдиентные реакции, посуду и пр.

Ход определения комплементарной активности сыворотки крови. Подготовка эритроцитов: В реакции могут быть использованы эритроциты любых лабораторных животных и человека. Однако предпочтение, как правило, отдают эритроцитам здорового барана в возрасте 1–3 лет. Кровь берут из яремной вены животного в стерильный флакон со стеклянными бусами, встряхивают в течение 5–7 мин для дефибрирования крови с целью предупреждения свертывания. Затем фильтруют через 2 слоя марли и центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. Верхний слой (плазму) отсасывают с помощью пипетки, соединенной с резиновой грушей, осадок эритроцитов промывают 2–3 раза пятью объемами физиологического раствора, следя за тем, чтобы последняя промывная жидкость была бесцветной. Если она имеет красный оттенок, эритроциты считаются негодными к использованию в реакции, поскольку произошел частичный гемолиз. На каждую исследуемую пробу ставят 3 пробирки — 2 опытные и контрольную. В опытные наливают по 5,9 мл физиологического раствора, в контрольную — 5,9 мл дистиллированной воды. Затем во все про-

бирки добавляют по 0,1 мл исследуемой сыворотки крови. Опытные пробирки ставят в водяную баню или термостат на 30 мин при 37°C. Контрольные инактивируют 30 мин при 56°C.

Подготовка гемолитической системы: В отмытых эритроцитах определяют содержание гемоглобина по Сали. К примеру, гемоглобин составляет 72 г%. Дальнейший расчет производят по следующей формуле:

$$\frac{95}{72} \times 2,5 = 3,3,$$

где 72 г% — содержание гемоглобина в эритроцитах барана; 95 г% — содержание гемоглобина при условии полного гемолиза эритроцитов (стандартная цифра); 2,5 — требуемая взвесь эритроцитов для реакции гемолиза, мл; 3,3 мл — расчетный объем эритроцитов, необходимый для постановки реакции, в расчете на 100 мл физиологического раствора.

Расчет потребности эритроцитарной взвеси для исследования большого количества сывороток крови проводят следующим образом. К примеру, требуется исследовать 25 проб сыворотки крови. Для этого готовят взвесь эритроцитов в объеме 200 мл физраствора. Следовательно, к 200 мл физраствора нужно прилить 6,6 мл отмытых эритроцитов с содержанием гемоглобина 72 г%.

Подготовка рабочего разведения гемолиза: Берут стандартную гемолитическую сыворотку с титром 1:3000 и делают расчет: $3000 : 4 = 750$. Затем, если требуется готовить не 200 мл, как в нашем примере, то окончательное количество гемолизина определяют делением $100 : 750$ и умножением делимого на 2. Итого 0,26 мл гемолитической сыворотки следует взять на 200 мл физиологического раствора. Из смеси эритроцитов и гемолизина готовят гемм-систему. В суспензию эритроцитов медленно приливают гемолитическую сыворотку и ставят в термостат на 30 мин при 37°C. После термостатирования гемсистемы и всех пробирок с испытуемыми сыворотками (опытными и контрольными) в каждую из них доливают до 4,0 мл гемсистемы. Ставят на 30 мин в термостат при 37°C. Содержимое опытных и контрольных пробирок

переливают в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин в режиме 3000 об/мин. Замеряют оптическую плотность супернатантов опытных и контрольных пробирок на ФЭК, используют кювету на 10 мл. Показатели записывают.

Расчет комплементарной активности сыворотки крови производят по формуле:

$$КА = \frac{ПФ_n}{ПФ_k} \times 100,$$

где ПФ — показатели ФЭК средние по двум опытным пробиркам каждой пробы; ПФ_к — показатели ФЭК контрольной пробирки; 100 — перевод данных в проценты.

ЭКСПРЕСС-МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО УРОВНЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

У новорожденных телят и ягнят в ранний постнатальный период (до 7–10 дней) уровень общего белка в сыворотке крови является интегральным отражением уровня иммуноглобулинов сыворотки крови. Этот феномен может быть использован для оценки резистентных качеств новорожденных животных.

Оборудование, материалы, реактивы:

- тонкие стеклянные капилляры, применяемые для определения гематокрита или взятия проб крови у пушных зверей;
- гепарин отечественного производства;
- центрифуга лабораторная настольная;
- рефрактометр марки ИРФ-22;
- мыло;
- игла инъекционная.

Ход определения общего белка. В гепаринизированные капилляры берут кровь из ушной вены животного. Протыкая капилляр с кровью через мыло, закупоривают тем самым один его кокон, кладут в гнездо центрифуги МЦГ-8 направлением закупоренного края к внешнему параметру ротора и центрифугируют.

ют в режиме 8000 об/мин в течение 30 с. Вынутый из центрифуги капилляр обламывают на границе раздела плазмы и форменных элементов крови и каплю плазмы наносят на призму рефрактометра. Снимают показатель. Переносят его на таблицу Рейса, определяя таким образом содержание общего белка.

Интерпретация результатов: Содержание общего белка в пределах 3,5–4,1 г% (35–41 г/л) соответствует состоянию агаммаглобулинемии; 4,15–5,50 г% (41,5–55,0 г/л) — выраженной гипогаммаглобулинемии; 5,55–6,50 г% (55,5–65,0 г/л) — гипогаммаглобулинемии, уверенно выраженной, и 6,55 г% (65,5 г/л) и выше — нормальному уровню иммуноглобулинов. Данный тест пригоден для оценки уровня иммуноглобулинов у телят и ягнят в возрасте 1,5–2 суток. У животных более старших возрастов прямая корреляция между уровнем общего белка и содержанием иммуноглобулина не всегда сохраняется, особенно в хозяйствах, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ В- И Т-ПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ РОЗЕТКООБРАЗОВАНИЯ

Метод основан на способности поверхностных мембранных рецепторов лимфоцитов связывать в определенных условиях *in vitro* различные эритроцитарные маркеры.

Т-лимфоциты образуют спонтанные розетки с эритроцитами барана (Е-розетки); В-лимфоциты адсорбируют на своей поверхности эритроциты быка, конъюгированные с комплектом ЕАС-розетки.

Оборудование, материалы, реактивы:

- центрифуга лабораторная клиническая ОПН-3 с режимом работы 1000, 1500 и 3000 об/мин с горизонтальным ротором;
- водяной ультратермостат с температурой 37°C, УТ-15; воздушный термостат с температурой 37°C;
- холодильник бытовой; микроскоп «Биолам» или МБИ-15, МБИ-3;
- счетчик лейкоцитов одиннадцатиклавишный; весы аналитические;

- пробирки бактериологические; пробирки центрифужные стеклянные конические на 10 мл; штативы для пробирок;
- резиновые груши для работы с пипетками; пипетки градуированные на 2, 5, 10 мл; микропипетки на 0,1 и 0,2 мл;
- пастеровские пипетки; стаканы стеклянные на 50 и 100 мл;
- обезжиренные предметные и покровные стекла;
- шприцы типа «Рекорд» на 10 и 20 мл; ножницы анатомические; планшет с лунками для реакции гемагглютинации; меланжеры лейкоцитарные;
- камера с сеткой Горяева;
- фикол-400 фирмы «Pharmacia Faine Chemical», Sweden;
- верографин; гепарин жидкий (в 1 мл 5000 ЕД);
- дистиллированная вода; раствор Хенкса (рН 7,2);
- забуференный физиологический раствор, содержащий 0,15 М NaCl и 0,01 М фосфатного буфера (рН 7,2–7,4);
- 0,5% -ный раствор трипанового синего на физиологическом растворе;
- кроличья гемолитическая сыворотка; мышьяная сыворотка крови; эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

Получение кроличьей гемолитической сыворотки. Готовят 10% -ную суспензию эритроцитов крупного рогатого скота. Для этого стабилизированную гепарином (из расчета 10 ЕД/мл) или дефибринированную с помощью стеклянных бус кровь быка центрифугируют при 1500 об/мин 10 мин. Осадок эритроцитов отмывают (ресуспензируют) два раза раствором Хенкса (пятикратный объем) в том же режиме. Приготовленную таким образом суспензию эритроцитов вводят кроликам в ушную вену из расчета 1 мл/кг массы животного по схеме: 3 дня подряд, затем еще 5 раз с интервалом введения 1 сутки. На 15-й день после начала гипериммунизации кролика-донора берут кровь из краевой вены уха капельным способом (по 2 бактериологические пробирки из каждого уха) для получения сыворотки. Сыворотку отделяют от сгустка и инактивируют 30 мин при температуре 56°C в ультратермостате или водяной бане.

Определение титра гемолитической сыворотки (реакция гемагглютинации): а) в каждую лунку планшеты вносят по 0,5 мл физиологического раствора, в первую лунку, кроме того,

приливают 0,5 мл гемолитической сыворотки в разведении 1:10. Смесь физраствора и гемсыворотки в лунке тщательно перемешивают, после чего из лунки 0,5 мл смеси переносят во вторую лунку, перемешивают, затем 0,5 мл — в третью и так далее; б) готовят 1% -ную суспензию эритроцитов быка: к 0,1 мл осадка отмытых эритроцитов добавляют 10 мл физиологического раствора; в) в каждую лунку планшеты добавляют по 0,25 мл 1% -ной суспензии эритроцитов быка. Для контроля специфичности реакции 2–5 лунок заполняют смесью физиологического раствора и эритроцитов в указанных соотношениях; г) смесь компонентов реакции в каждой лунке перемешивают, планшету помещают в термостат при 37°C на 1 ч, затем в холодильник при температуре 4°C на 10–12 ч; д) титром гемолитической сыворотки считают наибольшее ее разведение, в котором замечена агглютинация эритроцитов.

Получение мышинной сыворотки. Для получения примерно 1 мл сыворотки мышей — источника активного компонента — необходимо в день постановки реакции обескровить 5 взрослых белых мышей. Кровь в течение 1 ч выдерживают в термостате (37°C), центрифугируют при 1500 об/мин в течение 15 мин, сливают и разводят в 5 раз раствором Хенкса.

Приготовление эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота: а) источником фетальной сыворотки может служить кровь 4–8-месячного плода коров. Кровь у плодов берут в щадящем режиме, используя для этих целей стандартную систему для гемотрансфузионных целей отечественного производства, отличающуюся тем, что ее соединительные шланги изготовлены из высококачественного полистирола, поэтому поверхность их по качеству приближается к эндотелию сосудов, что исключает возможность гемолиза эритроцитов в период кровопускания. Кровь берут, прокалывая один из магистральных сосудов после их предварительной препаровки; б) полученную таким образом кровь отстаивают при комнатной температуре 30–60 мин, а затем помещают в холодильник при 4°C на несколько часов (чаще всего до утра следующего дня); в) отстоявшуюся сыворотку центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин; г) сыворотку инактивируют при 56°C 30 мин на водяной бане или в ультратермостате, после чего адсорбируют

отмытыми эритроцитами барана в соотношении 3:1 в течение 1 ч при 37°C; д) приготовленную вышеописанным способом фе- тальную сыворотку хранят в ампулах или пенициллиновых фла- конах при температуре -20°C.

Приготовление эритроцитарных маркеров: Используют де- фибринизированную кровь от одного и того же донора (бара- на или быка) и полученную не позднее 24 ч. Для определения Т-лимфоцитов периферической крови крупного рогатого скота в реакции спонтанного розеткообразования используют 2%-ную эритроцитарную взвесь (эритроциты барана) в растворе Хенк- са или забуференном физрастворе. Эритроциты барана осаж- дают и отмывают трижды в указанном растворе путем цент- рифугирования при 1500 об/мин в течение 10 мин. Далее к 0,1 мл плотного осадка эритроцитов добавляют 5 мл раствора Хен- кса или забуференного физраствора. Для типирования Т-лим- фоцитов овец используют 1%-ную взвесь эритроцитов барана в 14%-ном фиколле, приготовляемом на растворе Хенкса, при этом 7 г фиколла растворяют в 43 мл раствора Хенкса на маг- нитной мешалке и добавляют 0,8 мл гепарина (из расчета 84 ЕД/мл). К 5 мл полученного раствора добавляют 0,05 мл осадка эритроцитов барана.

Для тестирования В-лимфоцитов крупного рогатого ско- та и овец в реакции комплементарного розеткообразования используют 2%-ную взвесь эритроцитов быка, содержащих иммунные комплексы с противозэритроцитарными антитела- ми и активированными компонентами комплемента: а) гото- вят 5%-ную суспензию трижды отмытых эритроцитов быка: к 0,5 мл эритроцитарного осадка добавляют 9,5 мл раствора Хен- кса; б) готовят разведения гемолитической сыворотки, в 2 раза превышающие ее титр, — субгемолизирующую концентрацию; в) 5%-ные эритроциты быка и гемолитическую сыворотку в субгемолизирующей концентрации смешивают в равных объе- мах, инкубируют 45 мин при 37°C, трижды отмывают в ра- створе Хенкса по 5 мин при 1500 об/мин; г) эритроциты быка, сенсibilизированные таким образом антителами, разводят до 5%-ной концентрации. Добавляют равный объем мышинной сы- воротки, разведенной в 5 раз. Инкубируют 45 мин при 37°C, после чего 2 раза отмывают раствором Хенкса по 5 мин при

1500 об/мин; д) к 0,1 мл полученного осадка эритроцитов добавляют 5 мл раствора Хенкса.

Постановка реакций розеткообразования: Выделенные с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина лимфоциты периферической крови крупного рогатого скота и овец разводят раствором Хенкса до концентрации 10^7 клеток/мл. Для получения Е-розеток (спонтанных розеток) с Т-лимфоцитами крупного рогатого скота к 0.1 мл суспензии лимфоцитов добавляют равный объем фетальной телячьей сыворотки и инкубируют 30 мин в холодильнике при температуре 4°C. К смеси лимфоцитов и фетальной сыворотки добавляют 0,1 мл 2% -ной взвеси эритроцитов барана, хорошо перемешивают и центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. Для определения Т-клеток в крови овец к 0,1 мл суспензии лимфоцитов добавляют 0,2 мл 1% -ной взвеси эритроцитов барана в 14% -ном фиколле, хорошо перемешивают и центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин.

Для определения В-лимфоцитов используют реакцию ЕАС-розеткообразования. К 0,1 мл суспензии лимфоцитов добавляют 0,1 мл 2% -ной взвеси эритроцитов быка, обработанных комплементом. Смесь хорошо перемешивают, инкубируют при 37°C в течение 15 мин, а затем центрифугируют 5 мин при 1000 об/мин. После чего пробирки со смесью клеток помещают в холодильник с температурой 4°C на 12–16 ч. Часть супернатанта удаляют, а взвесь клеток ресуспензируют (легким покачиванием). Одну каплю взвеси на предметном стекле смешивают с одной каплей 0,5% -ного трипанового синего и накрывают покровным стеклом. Подсчитывают не менее 200 живых клеток (неокрашенных) и определяют процентное содержание розеткообразующих лимфоцитов. За розетку принимают лимфоцит, присоединивший не менее трех эритроцитов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Белокрылов Г. А. Различие действия пептидов и составляющих их аминокислот на иммунный ответ и фагоцитоз у мышей / Г. А. Белокрылов, О. Я. Попова, И. В. Молчанова и др. // Иммунология, 1991. № 5. С. 46-48.
- Болотников И. А. Физиолого-биохимические основы иммунитета сельскохозяйственной птицы / И. А. Болотников, Ю. В. Конопатов. Л.: Наука, 1987. 164 с.
- Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля / Пер. с нем. А. П. Тарасова. М.: Медицина, 1987. 472 с.
- Иммунология / Под ред. У. Пола. М.: Мир, 1988. Т. 1.
- Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
- Конопля А. И. Влияние миелоида на иммунологическую реактивность и восстановительные процессы в костной ткани / А. И. Конопля, Ю. Ю. Блинков // Метаболическая иммуномодуляция. Курск, 2000. С. 276-281.
- Кузник Б. И. Иммуногенез, гомеостаз и неспецифическая резистентность организма / Б. И. Кузник, Н. В. Васильев, Н. Н. Цыбиков. М.: Медицина, 1989. 320 с.
- Максимюк Н. Н. Модификация метода определения бактерицидной активности сыворотки крови / Н. Н. Максимюк, Л. Я. Телишевская // Ветеринария. 1995. № 2. С. 35-36.
- Максимюк Н. Н. Адаптация, резистентность, иммунологическая реактивность организма животных и факторы, влияющие на ее формирование // Вестник МАНЭБ. СПб., 2001. № 7(43). С. 52-62.
- Максимюк Н. Н. Определение биологической активности биопрепаратов с использованием тест-культуры инфузорий Тетрахимена пириформис и тест-штаммов микроорганизмов / Н. Н. Максимюк, Л. Я. Телишевская. Под рук. А. П. Простякова. М.: ВГНКИ, 1997. 11 с.
- Маркова Т. П. Сравнительное изучение влияния миелоида и тактивина на рецепторы В-клеток // Иммунология. 1995. № 1. С. 59-61.

- Митюшников В. М.* Зависимость напряженности иммунитета от естественной резистентности птиц // Ветеринария. 1992. № 5. С. 30–31.
- Морозов В. Г.* Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем — цитомедины / В. Г. Морозов, В. Х. Хавинсон // Успехи современной биологии, 1983. Т. 96. № 3. С. 339–352.
- Наволоцкая Е. В.* Синтетический пептид VKGFY и его циклический аналог стимулируют бактерицидную активность макрофагов через неопиоидные рецепторы b-эндорфина / Е. В. Наволоцкая, А. А. Колобов, Е. А. Кампе-Немм и др. // Биохимия. 2003. Т. 68. Вып. 1. С. 42–51.
- Придыбайло Н. Д.* Иммуностимулирующие свойства тималина у птиц / Н. Д. Придыбайло, Г. Е. Афанасьева, Л. Н. Янушева // Роль пептидных биорегуляторов (цитомединов) в регуляции гомеостаза: Докл. науч. конф. Л., 1987. С. 83.
- Структурные основы действия пептидных и белковых иммунорегуляторов / Г. И. Чипенс, Н. И. Веретенникова, Р. Э. Вегнер и др. Под ред. Г. И. Чипенса. Рига: Зинатне, 1990. 325 с.
- Федоров Ю. Н.* Иммунодефициты домашних животных / Ю. Н. Федоров, О. А. Верховский. М., 1996. 94 с.
- Хаитов Р. М.* Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология, 1995. № 4. С. 3–8.
- Askonas Brigitte A.* From protein synthesis to antibody formation and cellular immunity: A personal view // Annu. Rev. Immunol. Vol. 8. Palo Alto (Calif.), 1990. P. 1–21.
- Barandun S.* Passive Immunisierung mit Immunoglobulinen // Ther. Umsch. 1983. Bd. 40. No 3. S. 257–260.
- Beisel W. R.* Single nutrients and immunity // Amer. J. Clin. Nutr. 1982. Vol. 35. No. 2. P. 34–38.
- Goldstein G.* Bursin and Thymopietin / G. Goldstein, T. K. Audhya // Avian immunology; Basis and practice. Vol. 1. CRC Press, Inc., 1987. P. 155–160.
- Gorman N. T.* Immunology // Textbook of veterinary internal medicine. Eds. S. J. Ettinger and E. C. Feldman. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W. B. Saunders Co., 1995. Vol. 2.
- Greco D. S.* Immunity and the endocrine system / D. S. Greco, L. M. Harpold // Vet. clin. of North. Am., Small Anim. Prac., 1994. Vol. 24. No. 4. P. 765–782.
- Heijnen C. J.* Endorphines and the immune system / C. J. Heijnen, A. Kavelaars, R. E. Baillieux // Neuroendocrinol. Leff. 1988. Vol. 15. No. 4. P. 206.
- Humoral immunity in the ewe / Reynolds G. E., Griffin J. F. T. // Veter. Immunol. Immunopathol. 1990. Vol. 25. No. 2. P. 155–166.
- Jankovis Branislav D.* Neuroimmunomodulation: Facts and dilemmas // Immunol. Leff. 1989. Vol. 21. No. 2. P. 101–118.

- Paul Willian E., Paolo Alto.* Annual review of immunology. Vol. 11, 1993. 843 p.
- Reis Carol S., Rouse Barry T.* The current status of viral immunology // Immunol. Today. 1993. Vol. 14. No 7. P. 333-335.
- Sibille P.* Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats / P. Sibille, A. Avrameas, A. Moraillon et.al. // Vet. Microbiol. 1995. Vol. 45. P. 259-263.
- Thompson J. P.* Immunological diseases // Textbook of veterinary internal medicine. Eds. S. J. Ettinger and E. C. Feldman. Philadelphia, Tokyo, 1995. Vol. 2. P. 2002-2029.
- Tolerance immunitaire: deletion clonate et energie // Med. Sci. 1990. Vol. 6. No 2. P. 164.
- Zielen S.* Immunodefekt-Diagnostik // DMW: Dtsch. med. Wochenschr. 1995. Bd. 120. Nr. 23. S. 857.

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	3
Введение	6
Фатальна ли болезнь?	8
Значение изучения резистентности	17
Природа и категории устойчивости животных к заболеваниям	19
Защитные силы организма	19
Факторы неспецифической защиты, или факторы естественной резистентности организма	27
Функции иммунной системы.	
Виды иммунитета	30
Понятие об антигенах и антителах	33
Органы иммунной системы	38
Механизмы иммунного ответа	41
Иммунологическая память	44
Инструктирующая роль врожденного иммунитета в становлении некоторых реакций приобретенного иммунитета	47
Врожденный иммунитет	59
Специфическая и неспецифическая резистентность	59
Молекулы клеточной адгезии в иммунитете животных	64
Суперсемейство скавенджер-рецепторов	68
Структура и функциональная роль пентраксинов в реализации защитных реакций животных	70
Лектины как молекулярные факторы рекогносцировочного звена системы врожденного иммунитета животных	72
Система комплемента в иммунитете животных	83

Липополисахаридсвязывающий белок как звено рекогносцировочной системы врожденного иммунитета	95
Толл- и Толл-подобные рецепторы как компоненты рекогносцировочного аппарата иммунной системы	101
Транскрипционный фактор NFκB и родственные ему белки	108
NOD- и NALP-белки как представители внутриклеточных рецепторов, распознающих патогенассоциированные молекулярные паттерны	115
Пептидогликанраспознающие белки как молекулярные факторы рекогносцировочной системы животных	117
Система паттернраспознающих рецепторов	118
Белки и ферменты сыворотки крови и других тканевых и клеточных секретов	124
Хемотаксис и сопряженные с ним клеточные реакции	129
Роль рецепторов фагоцитов, ответственных за поглотительную стадию фагоцитоза	132
Кислородзависимые механизмы элиминации патогенов при фагоцитозе и воспалении	137
Пероксидазные системы инактивации микробов	142
Фенолоксидаза в иммунитете беспозвоночных	152
Кислороднезависимые механизмы инактивации микроорганизмов при фагоцитозе и воспалении	156
Антибиотические пептиды как молекулярные факторы врожденного иммунитета животных	159
Механизмы антимикробного действия антибиотических пептидов	171
Лактоферрин	179
Бактерицидный увеличивающий проницаемость белок	185
Серпроцидины	192
Лизоцим	198
Реакции лимфоидной системы, связанные с синтезом иммуноглобулинов, повышенной чувствительностью замедленного и немедленного типа и иммунологической толерантностью	200
Реакция антиген-антитело	203
Приобретенная устойчивость	205
Пути повышения защитных сил организма	209
Колостральный иммунитет, факторы его определяющие и корректирующие	211
Защитные механизмы неспецифической резистентности и иммунитета при вирусных инфекциях	225

Врожденная резистентность и приобретенный иммунитет	228
Роль фагоцитарных факторов в противовирусном иммунитете	238
Условия активности неспецифических и специфических факторов защиты	244
Защитная роль воспалительных реакций	248
Эмбриогенез иммунной реактивности	259
Возникновение иммуноглобулиновых генов	266
Эволюционное происхождение лимфоцитов	267
Мутационный риск — «плата» за многоклеточность	268
Современные представления о взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета	269
Прогнозирование устойчивости животных	280
Устойчивость к жаре	293
Изменение устойчивости	301
Влияние обмена веществ на сопротивляемость	303
Зависимость состояния организма от условий содержания и кормления	305
Внешние и внутренние факторы снижения защитных свойств организма	309
Определение показателей естественной резистентности	321
Определение уровня фагоцитоза	323
Методика расчета показателей ОФР	325
Определение лизоцимной активности сыворотки крови	326
Определение бактерицидной активности сыворотки крови (БАСК)	327
Определение комплементарной активности сыворотки крови	329
Экспресс-метод количественного определения общего уровня иммуноглобулинов у новорожденных животных	332
Определение В- и Т-популяций лимфоцитов методом розеткообразования	333
Список литературы	338

*Валерий Григорьевич СКОПИЧЕВ
Николай Несторович МАКСИМЮК*

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЖИВОТНЫХ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Зав. редакцией ветеринарной
и сельскохозяйственной литературы *А. Е. Майорова*
Художественный редактор *С. Ю. Малахов*
Редактор *В. С. Волкова*
Корректоры *В. В. Вересиянова, А. М. Плетнева*
Верстальщик А. Г. Сандомирская
Выпускающие *Н. К. Белякова, О. В. Шилкова*

ЛР № 065466 от 21.10.97

Гигиенический сертификат 78.01.07.953.П.004173.04.07
от 26.04.2007 г., выдан ЦГСЭН в СПб

Издательство «ЛАНЬ»

lan@lpbl.spb.ru

www.lanbook.com

192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5.

Тел./факс: (812)567-29-35, 567-05-97, 567-92-72;

Бесплатный звонок по России: 8-800-700-40-71

Подписано в печать 21.04.09.

Бумага офсетная. Гарнитура Школьная. Формат 84×108¹/₂.

Печать офсетная. Усл. п. л. 18,48. Тираж 1000 экз.

Заказ № 1054

Отпечатано в полном соответствии

с качеством предоставленных диапозитивов

в ОАО «Издательско-полиграфическое предприятие «Правда Севера».

163002, г. Архангельск, пр. Новгородский, 32.

Тел./факс (8182) 64-14-54, тел.: (8182) 65-37-65, 65-38-78, 20-50-52

www.ippps.ru, e-mail: zakaz@ippps.ru

ГДЕ КУПИТЬ

ДЛЯ ОРГАНИЗАЦИЙ:

Для того, чтобы заказать необходимые Вам книги,
достаточно обратиться в любую из торговых компаний
Издательского Дома «ЛАНЬ»:

по России и зарубежью

«ЛАНЬ-ТРЕЙД»

192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13

тел.: (812) 567-85-78, 567-14-45, 567-85-82

тел./факс: (812) 567-54-93

e-mail: trade@lanpbl.spb.ru

ICQ: 446-869-967

www.lanpbl.spb.ru/price.htm

в Москве и в Московской области

«ЛАНЬ-ПРЕСС»

109263, Москва, 7-ая ул. Текстильщиков, д. 6/19

тел.: (499) 178-65-85

e-mail: lanpress@ultimanet.ru

в Краснодаре и в Краснодарском крае

«ЛАНЬ-ЮГ»

350072, Краснодар, ул. Жлобы, д. 1/1

тел.: (8612) 74-10-35

e-mail: lankrd98@mail.ru

ДЛЯ РОЗНИЧНЫХ ПОКУПАТЕЛЕЙ:

интернет-магазины:

«Сова»: <http://www.symplex.ru>

«Ozon.ru»: <http://www.ozon.ru>

«Библион»: <http://www.biblion.ru>

также Вы можете отправить заявку

на покупку книги по адресу:

192029, Санкт-Петербург, ул. Крупской, 13

Издательство
«ЛАНЬ» ЛАНЬ®



предлагает
учебную литературу
для высшей школы
по направлениям


**ВЕТЕРИНАРИЯ, ЗООТЕХНИЯ,
СЕЛЬСКОЕ, ЛЕСНОЕ ХОЗЯЙСТВО
И ЛЕСОИНЖЕНЕРНОЕ ДЕЛО.**

Большинство наших книг
рекомендовано Министерством
сельского хозяйства РФ,
Министерством образования и науки РФ
и соответствующими
учебно-методическими
объединениями.

Наши адреса и телефоны:

РФ, 192029, Санкт-Петербург, Общественный пер., 5
(812) 567-29-35, 567-05-97, 567-92-72, 336-25-09

www.lanbook.com

Издательство
«ЛАНЬ»  ЛАНЬ®

Мы будем благодарны Вам
за пожелания по издаваемой нами литературе,
а также за предложения по изданию книг
новых авторов или переизданию
уже существующих трудов.
Рукописи не рецензируются и не возвращаются.

Мы заинтересованы в сотрудничестве
с высшими учебными заведениями
и открыты для Ваших предложений
по улучшению нашего взаимодействия.

Теперь вы можете звонить нам бесплатно
из любых городов России по телефону

8-800-700-40-71

Дополнительную информацию
и ответы на вопросы Вы также можете получить,
обратившись по электронной почте:

veterinary@lpbl.spb.ru

**Издательство
«ЛАНЬ»**



**ПРЕДСТАВЛЯЕМ
НОВЫЕ УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ**

В. Г. СКОПИЧЕВ, И. О. БОГОЛЮБОВА

ФИЗИОЛОГИЯ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В книге приведены сведения по морфологии и физиологии органов размножения экспериментальных, сельскохозяйственных животных и человека. Подробно рассматриваются особенности половой системы самцов и самок, процессы оплодотворения, вынашивания беременности и родов. Особое внимание обращено на роль иммунной системы организма в ходе оплодотворения, беременности и последующей лактации.

Учебное пособие предназначено для специалистов, связанных с воспроизводством животных: зоотехников, ветеринарных врачей, технологов сельского хозяйства, а также студентов, изучающих определенные курсы физиологии, размножения животных, акушерства и гинекологии.

Издательство
«ЛАНЬ» 

ПРЕДСТАВЛЯЕМ
НОВЫЕ УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ

Н. Н. МАКСИМЮК, В. Г. СКОПИЧЕВ

**ФИЗИОЛОГИЯ
КОРМЛЕНИЯ ЖИВОТНЫХ
ТЕОРИИ ПИТАНИЯ.
ПРИЕМ КОРМА, ОСОБЕННОСТИ ПИЩЕВАРЕНИЯ**
УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Предлагаемое издание является учебным пособием по организации полноценного кормления сельскохозяйственных животных, которое считается важнейшим условием, формирующим уровень их продуктивности. Авторы сосредоточили внимание на процессах приема и усвоения пищи в организме животного, на особенностях пищеварения в различных отделах пищеварительной системы. В книге приведены многочисленные данные о влиянии количества и качества корма, организации кормления, физиологии нервной деятельности животных на процессы пищеварения.

Учебное пособие предназначено для преподавателей и студентов сельскохозяйственных вузов, для работников животноводческих хозяйств и других специалистов, занятых в сельскохозяйственном производстве.

Издательство
«ЛАНЬ»



ПРЕДСТАВЛЯЕМ
НОВЫЕ УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ

А. А. ИВАНОВ

ЭТОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ ЗООПСИХОЛОГИИ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В учебном пособии анализируется поведение и психология животных на уровне индивидуума и в составе ассоциаций. Рассматриваются проблемы развития поведения и психики животных в процессе онтогенеза. Приводятся данные о видовых особенностях поведения животных, прежде всего продуктивных. Анализируются изменения в поведении и психологии животных, вызванные процессом domestikации. Впервые в отечественной учебной литературе обсуждаются проблемы благополучия животных при содержании в искусственных условиях и приводятся способы повышения уровня благополучия кур-несушек, свиней, лошадей и других животных.

Учебное пособие адресовано студентам аграрных университетов, изучающих разные отрасли продуктивного, спортивного и декоративного животноводства, также оно может быть полезным для аспирантов, научных сотрудников и преподавателей при планировании научных исследований и при подготовке учебных занятий по дисциплинам животноводческого профиля.

Издательство
«ЛАНЬ»



ПРЕДСТАВЛЯЕМ
НОВЫЕ УЧЕБНИКИ И УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ

В. Г. СКОПИЧЕВ

ПОВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

В книге приведены сведения по структуре исследований поведения животных. Эта дисциплина входит под названием «Этология животных» в программу обучения студентов по специальности «Зоотехния» и «Ветеринария» и входит в Государственный стандарт образования по этим специальностям.

Подробно рассматриваются общие механизмы, определяющие поведение животных с учетом нейрофизиологических принципов формирования поведенческих актов. Вторая часть книги посвящена частной физиологии поведения животных как продуктивных, так и домашних.

Учебное пособие предназначено для специалистов, связанных с содержанием и лечением животных, а также студентов высших учебных заведений специальности «Зоотехния».

Ветеринарная клиника

Журнал «Ветеринарная клиника» — ежемесячное научно-практическое издание, в котором освещаются вопросы ветеринарной медицины мелких домашних и экзотических животных, кормления и содержания.

На страницах журнала в рубрике «VET-персона» публикуются интервью с ветеринарными специалистами. В рубриках «Терапия», «Онкология», «Хирургия», «Стоматология» освещаются вопросы лечения и профилактики заболеваний различной этиологии; в рубриках «Фармакология», «Диагностика» рассматриваются новейшие ветпрепараты, современные методы диагностики заболеваний.

Журнал выступает в качестве практического пособия для специалистов: на его страницах публикуются лабораторно-диагностические задачи, предлагаются новые экспериментальные методики.

«Ветеринарная клиника» предоставляет возможность ветеринарным специалистам, студентам и просто заинтересованным читателям обмениваться опытом, задавать вопросы и получать ответы от коллег непосредственно на страницах журнала.

Мы всегда готовы рассмотреть ваши предложения и опубликовать в журнале ваши отклики. Если у вас есть материалы, которые заслуживают внимания широкой публики, — пишите нам в редакцию, присылайте статьи. Ваши работы займут достойное место на страницах нашего журнала.

Несмотря на серьезный тон, в журнале «Всегда есть место для улыбки» — в рубрике с этим названием всегда можно прочесть интересные, забавные истории. Ну и конечно, на страницах журнала вы найдете последние новости ветеринарии, а также информацию о проведении семинаров, конгрессов, мастер-классов.

Для оформления подписки на журнал «Ветеринарная клиника» обращайтесь по телефону: (343) 214-76-30, 8-912-247-09-99, 8-908-633-94-39. Главный редактор журнала «Ветеринарная клиника», Мария Южакова. Адрес редакции: 620142, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а. E-mail: vetklinika@uralbiovet.ru

Уверенность
в знаниях!









ISBN 978-5-8114-0934-1



9 785811 409341



ISBN 978-5-8114-0934-1



9 785811 409341