

576.8
Б-15.53

**ОСНОВЫ
ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ
ВИРУСОЛОГИИ
И ИММУНОЛОГИИ**



213V10



М.В.Земсков, М.И.Соколов, В.М.Земсков

576.8
3-553

ОСНОВЫ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Допущено Главным управлением высшего и среднего
сельскохозяйственного образования МСХ СССР в каче-
стве учебного пособия для ветеринарных институтов и
факультетов

213410



ИЗДАТЕЛЬСТВО «КОЛОС» ● Москва — 1972

К

Основы общей микробиологии, вирусологии и иммунологии.

М. В. Земсков, М. И. Соколов, В. М. Земсков. 1972 г., стр. 287.

Настоящая книга предназначена для студентов ветеринарных вузов и факультетов. В ней содержатся современные данные по наиболее актуальным вопросам общей микробиологии, вирусологии, генетики бактерий и вирусов, иммунологии (сведения о структуре, метаболизме, размножении бактерий и вирусов; данные об антигенах, антителах и их взаимодействии, а также о противовирусном иммунитете).

Книга может служить пособием для ветеринарных врачей — бактериологов и вирусологов, а также для врачей, занимающихся на курсах усовершенствования по микробиологии и вирусологии.

Замечания, предложения по книге, и отзывы о ней просьба направлять по адресу: Москва, К-31, ул. Дзержинского, 1/19, издательство «Колос».

Часть первая ОСНОВЫ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Глава 1. АНАТОМИЯ БАКТЕРИЙ

Структура бактериальной клетки

Анатомически все бактерии состоят из стенки, или наружной оболочки, цитоплазматической мембраны и цитоплазмы с различной зернистостью и включениями. К внутренним структурам относят мезосомы, рибосомы, нуклеоид. Ряд бактерий образует жгутики и бахромку, капсулы и споры (рис. 1).

Стенка — наружная структура бактериальной клетки, предохраняет ее от вредных внешних воздействий и обеспечивает относительное постоянство формы. У грамположительных бактерий (у золотистых стафилококков) она противостоит внутриклеточному давлению в 15—20 атм., у грамотрицательных (у кишечной палочки) — в 6 атм. У жгутиковых бактерий стенку прободают жгутики, у капсульных она покрыта капсулой или слизистым слоем. В ней имеются круглые или щелевидные отверстия, размер которых у морских бактерий и стафилококков не превышает 1 мк.

В 1969 г. установлено, что у *Str. lactis* оболочка и цитоплазматическая мембрана имеют отверстия в форме перевернутого и вытянутого конуса, наружный диаметр которого в 3 раза больше внутреннего. От мембраны к стенке протянуты тяжи. Они могут закрывать отверстия в клеточной стенке. У грампозитивных клеток стенка составляет 20—30% их сухого веса, в грамотрицательных — менее 20%. Толщина ее у сальмонелл и кишечных бактерий равна 10—15 мк, у стафилококков — 15—20 мк, у туберкулезных бактерий — 20—30 мк. Стенка многих грамположительных бактерий растворяется лизоцимом, грамотрицательных — пенициллином.

В состоянии максимального тургора стенка плотно прилегает к цитоплазматической мембране и в световом микроскопе неразличима. Однако при плазмоллизе цитоплазма с прилегающей к ней цитоплазматической мембраной отстает от стенки, и последняя становится видимой.

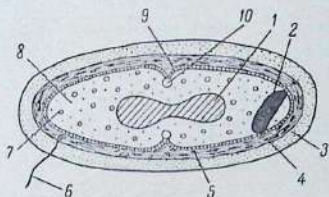


Рис. 1. Структурная схема бактериальной клетки:

1 — ядро в начале деления; 2 — спора; 3 — капсула; 4 — клеточная стенка, или наружная оболочка; 5 — цитоплазматическая мембрана; 6 — жгутик; 7 — включения; 8 — частицы рибонуклеиновой кислоты; 9 — начало образования поперечных перегородок; 10 — мезосома (периферическое тело).

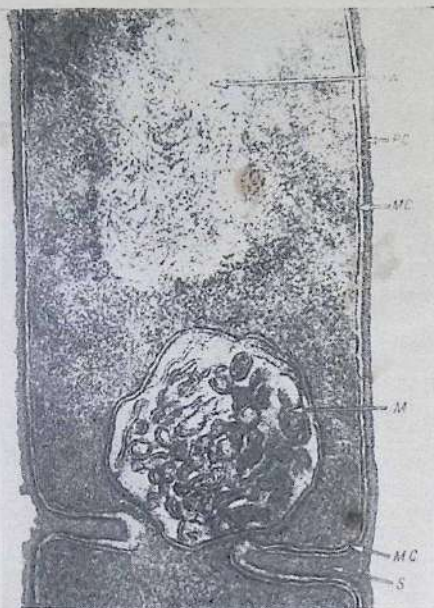


Рис. 2. Сверхтонкий срез *Bac. subtilis* ($\times 190\ 000$):

N — ядро с фибриллярной картиной; *P. C.* — клеточная стенка; *M. C.* — цитоплазматическая мембрана; *M* — мезосома (видно, что она исходит из цитоплазматической мембраны, внутри мезосомы — везикулы, окруженные оболочками, напоминающими цитоплазматическую мембрану); *S* — растущая поперечная перегородка.

Различима наружная оболочка в ультрафиолетовом свете при условии погружения в масла с различными показателями преломления и в электронном микроскопе (рис. 2). Стенку плазмолизированных, обработанных танином бактерий можно окрасить шафранном в желтый цвет, метилвиолетом — в пурпурный, синим «викториум» — в синий.

Обычно стенка многослойна. У грамотрицательных бактерий имеется, вероятно, пять слоев, у грамположительных — два толщиной 100—200 Å. Структура волокниста. У одной спириллы стенка состояла из шестиугольных молекул, а у недифференцированной бактерии — из четырехугольных. В стенке грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также сине-зеленых водорослей содержится полимер

и протейны. Липидов имеется до 22%. С протейнами они образуют липопротейны, входящие в состав глицидо-липидно-протейнового комплекса. Из мукопептидов грамотрицательных бактерий были извлечены дисахариды и тетрасахариды. В стенке найдены также гексозы, пентозы и гептозы, а также гликуроновая и галактуриновая кислоты. Принадлежностью только стенки грамотрицательных бактерий явилась сиаловая кислота и ее производные (некоторые замещенные производные N-ацетил-нейраминной кислоты). Стенка грамотрицательных бактерий содержит также почти все аминокислоты, входящие в протейны, но преимущественно аргинин и пролин.

Таким образом, для стенки грамотрицательных бактерий типично наличие мукопептида, играющего роль каркаса белков, липидов и полисахаридных комплексов.

Лизоцим, протеолитические ферменты и фаги растворяют мукопептид. Однако у грамотрицательных клеток он прикрыт липопротейновым слоем и действие лизоцима затрудняется. Пенициллин, как считают, тормозит биосинтез мукопептидов клеточной стенки.

Клеточная стенка обладает ригидностью, то есть способностью при преодолении препятствий деформироваться и вновь восстанавливать свою форму. Это качество сочетается с растяжимостью и эластичностью.

Биологически клеточная стенка является полупроницаемой, иммунологически содержит ряд специфических для отдельных видов бактерий антигенов.

Цитоплазматическая мембрана плотно прилегает к цитоплазме и клеточной стенке (рис. 2). Становится хорошо видимой при плазмолизе (при погружении клеток в гипертонический раствор NaCl цитоплазма отстает от клеточной стенки), а также после растворения цитоплазмы. Наиболее плотно цитоплазматическая мембрана прилегает к клеточной стенке у грамположительных бактерий, поэтому ее отделить в процессе плазмолиза невозможно. Отщепляют ее механическими и ферментативными способами. Может быть отделена от цитоплазмы вместе с клеточной стенкой.

Цитоплазматическая мембрана состоит из двух плотных белковых слоев (20—30 Å каждый), разделенных липидной прослойкой 50—80 Å. У некоторых микроорганизмов мембраны состоят из комплекса белок — углевод или белок — углевод — липид. Общая толщина цитоплазматической мембраны, по данным разных авторов, равна 50 Å, 100 Å, 150 Å, 200—300 Å. К моменту клеточного деления цитоплазматическая мембрана, как и клеточная стенка, образует перегородку и особую структуру мезосому. Роль последней окончательно не выяснена.

Цитоплазматическая мембрана базофильна, хорошо окрашивается анилиновыми красками, что позволяет дифференцировать ее от цитоплазмы. Сохраняет грамположительность у соответственно окрашиваемых бактерий и кислотоупорность у кислотоупорных. Состоит в основном из фосфолипидов — 30% сухого веса этой структуры (у отдельных бактерий 55—75%), содержит также около 50% белка,

до 11% РНК и не содержит ДНК. Аминокислотный состав мембраны сходен с составом белка цитоплазмы.

У золотистого стафилококка цитоплазматическая мембрана составляет 10% сухого веса клетки, имеет толщину 150 Å, содержит 22,5% липидов и 41% протеинов. По функции и структуре сходна с гребнями митохондрий. Является местом локализации дыхательных ферментов и цитохромной системы, аденозинтрифосфатазы, никотиндегидроксилазы и многих других ферментов (пермеаз), а также местом синтеза белка. РНК возможно, участвует в построении стенки. Обладает осмотическим барьером: избирательно пропускает внутрь клетки одни и не пропускает другие вещества. Аналогично регулируется поток веществ и изнутри клетки. Обеспечивает фагоцитоз и пиноцитоз, фиксацию рибосом (полирибосом), перенос электронов во внешнюю среду.

У перипневмонийных микроорганизмов и L-форм, встречающихся у некоторых бактерий, цитоплазматическая мембрана является наружной стенкой, так как другой оболочки у них нет.

В иммунологическом отношении антигенна, отлична от клеточной стенки и интактной клетки. В то время как «антистеночная» сыворотка реагирует с интактной клеткой, «антицитоплазматическая» сыворотка не реагирует ни со стенкой, ни с интактной клеткой.

Цитоплазма с зернистостью и включениями. Цитоплазма — часть клетки, лишенная стенки и цитоплазматической мембраны. Это коллоидная система с большим количеством РНК и другими биохимическими компонентами, характерными для живых существ. Структура цитоплазмы зерниста, чаще диаметр зерен равен 100 и 300 Å. В цитоплазме различают рибосомы, места локализации ферментов, зерна жгутиков, зерна резервной материи, энергии или питательных веществ; вакуоли, мезосомы, мембраны, нуклеоид.

Р и б о с о м ы. Большинство рибосом имеет диаметр 180 Å, молекулярный вес около $3 \cdot 10^6$, константу седиментации 80 S, объединены в линейные агрегаты — полисомы.

Мак Клен (1962) считает, что каждая бактерия включает приблизительно 10 000 рибосомальных частиц — зерен, объединенных в рибосому, содержащую окислительные энзимы, рибонуклеазу, а аэробная бактерия — переносчиков водорода.

М. Номура (1970) нашел следующее строение рибосом *E. coli*. Состоит она из двух субчастиц с константой седиментации 50S и 30S, объединенных в единую сферическую структуру 70S. Субчастицу 50S составляют белок (35%) и РНК (65%), соответственно частица 30S имеет белка 35%, РНК-65%. В свою очередь, РНК первой субчастицы (50S) включает РНК 23S и 5S, а субчастица 30S — одну молекулу 16S — РНК (рис. 3).

Были обнаружены участки, специфически взаимодействующие с т-РНК и и-РНК. Следовательно, рибосома участвует в синтезе белка, а не является местом сборки из аминокислот, как считали совсем недавно. В рибосоме найдены различные катионы и полиамины.

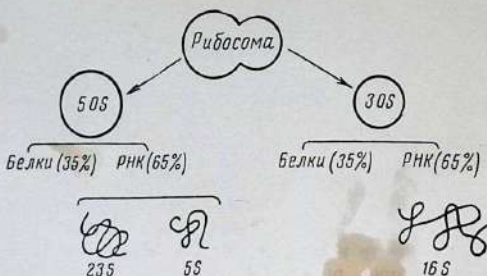


Рис. 3. Схема строения рибосомы *E. coli*.

Места локализации ферментов. Рядом авторов установлено, что одни ферменты связаны с зернами, другие — с растворимой частью протоплазмы. У *Azotobacter vinelandii* все дегидрогеназные ферментные системы янтарной, яблочной кислот и цитохромоксидазная ферментная система связаны с зернами; большинство других оксидаз находится в растворимой части цитоплазмы. У стафилококков и некоторых других бактерий янтарная дегидрогеназа, некоторые цитохромы, ферменты, участвующие в цикле Кребса, и большая часть РНК связаны с зернами 100 и 200 Å. У туберкулезных бактерий фумараза, аконитаза, яблочная и изолимонная дегидрогеназы и каталаза могут быть объединены с зернами или находиться в растворе. Л. Н. Кац (1970) с соавторами нашли, что у всех грамположительных аэробных бактерий дегидрогеназа размещается на внутрицитоплазматических мембранных структурах и на цитоплазматической мембране.

Зерна жгутиков до 400 Å в диаметре встречаются у некоторых жгутиковых бактерий. В них, как полагают отдельные ученые, находятся двигательные центры жгутиков.

Зерна волютинна, по мнению отдельных авторов, состоят из рибонуклеиновой кислоты и метафосфатов. Встречаются они чаще у грамположительных бактерий (у возбудителей дифтерии). По-видимому, являются источником азота и фосфора.

Липидные зерна отмечают чаще у аэробных бактерий. У дрожжей, выращенных в аэробных условиях, количество липидов достигает 50—63% сухого веса клеток. Липидные зерна являются резервными питательными веществами, иногда могут быть использованы как источник энергии и как источник азота. Зерна углеводов в одних случаях близки крахмалу, в других — гликогену. Встречаются у спороносных микроорганизмов и чаще у клостридий анаэробов, являются источником энергии. Зерна серы и карбоната кальция обнаруживают у сернистых бактерий, протениновые кристаллы — у *V. cereus*.

У растущих клеток могут образовываться от 6—10 до 20 в вакуолей диаметром 0,3—0,5 м. Они окружены липопротеиновой мембраной и содержат некоторые растворенные вещества клетки. Биологическая роль вакуолей неясна.

Мезосомы (аналоги митохондрий). В 1953 г. Г. Б. Чепмен и Д. Д. Гильер обнаружили у ряда делящихся бактерий в зоне поперечных перегородок сферические образования. В 1960 г. Фиц-Джеймс нашел их в клетках спорообразующих бацилл и присвоил им название мезосом. У *M. lysodeikticus* мезосомы равны 2500 Å. На разрезе они имеют ряд концентрических мембран толщиной около 75 Å и состоят из трех слоев (рис. 2). Мезосомы принимают участие в росте клеточных стенок, самой клетки и ее делении. Мембраны мезосом состоят

из глобулярных субъединиц, обеспечивающих перенос электронов. В них, как и в цитоплазматической мембране, обнаружены флавиновые дегидрогеназы, цитохромы, ферменты окислительного фосфорилирования и цикла Кребса. Имеется гипотеза, согласно которой мезосомы выполняют некоторые функции ядра и составляют с ним единый орган.

Мезосомы найдены у грамположительных бактерий, кокков, микобактерий и стрептомицетов и у грамотрицательных бактерий. Располагаются они на полюсах, в зоне ядра и между стенкой и цитоплазматической мембраной. Форму они имеют пузырьковидную (диаметром 300—1000 Å), шаровидную, удлинённых баллонов.

Советские исследователи В. М. Кушнарев и Н. А. Переверзева (1964) обнаружили у *E. coli* систему мембран, состоящих из трех слоев по 20—25 Å каждый. Мембраны ветвятся и делят цитоплазму на ряд полостей. Авторы считают, что данные мембраны в какой-то мере являются эквивалентом мембран клеток высших животных.

У всех видов лактобацилл найдены трехслойные трубчатые образования, которые берут начало от цитоплазматической мембраны. Диаметр их 90—150 Å, реже 70 Å. У большинства термофильных видов трубочки упакованы в компактные тела — мезосомы.

Нуклеоид, или ядро бактерий, лишено ядерной мембраны и типичных хромосом, что является характерным для ядер высших клеток. Поэтому его именуют нуклеоидом, нуклеоплазмой, ядерной вакуолью или хроматиновым тельцем. Нуклеоид богат ДНК, имеющей кольцевую структуру. Количество ДНК для разных бактерий различно. У *E. coli* оно составляет примерно 10^{-14} г на одну клетку. Неясно, содержит ли нуклеоид одну гигантскую молекулу ДНК или ряд мелких молекул, связанных между собой в единую кольцевую или линейную структуру. Нить ДНК упакована в пучок, толщина нити 30—80 Å.

По мнению Жакоба и Бреннера, хромосомы ядер высших организмов возникли вследствие слияния многих петель ДНК, или так называемых репликонов. Несомненно, что хроматиновое тельце бактерии аналогичного происхождения. Во всяком случае термин «репликон» в генетике бактерий применяется широко. Под ним также понимают петлю ДНК, несущую иногда десятки генов, связанную с нуклеоидом или иногда существующую автономно в цитоплазме бактерии, в форме так называемой эписомы (см. ниже).

В растущих клетках кишечных бактерий нуклеоид имеет палочковидную структуру, у большинства кокков, кислотоустойчивых и дифтерийных бактерий — округлой формы. Нуклеоид обнаружен и в спорах. Число ядер в вегетативных клетках различно. Обычно кокки одноядерны, палочки — многоядерны. В растущей палочке деление ядра опережает деление цитоплазмы, и поэтому молодые особи, как правило, многоядерны. Старые клетки — одноядерны. Вещества, задерживающие деление клетки — ультрафиолет, пенициллин, также способствуют образованию многоядерных бактерий.

Допускают три типа репликации ядерной ДНК: 1) консервативный тип наблюдается в том случае, если дочерняя клетка

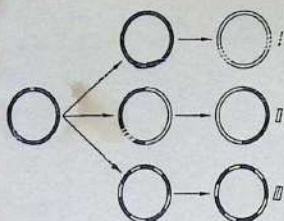


Рис. 4. Схема возможной репликации ДНК:

I — консервативная репликация; *II* — полуконсервативная; *III* — дисперсная (черным обозначена родительская ДНК, белым — дочерняя).

получает вновь образованную ДНК, а вся старая ДНК сохраняется (консервируется) в ядре материнской клетки; 2) полуконсервативный тип — ядра материнской и дочерней клеток содержат половину старой и столько же вновь синтезированной ДНК; 3) дисперсивный тип — старый и вновь образованный ядерный информационный материал в материнской и дочерней клетках располагается случайно, вперемежку (рис. 4). Многие ученые на основе исследований с меченым ядерным веществом допускают существование полукон-

сервативной репликации ядерной ДНК. Этот тип хорошо согласуется с представлениями о механизме мутаций.

Под влиянием некоторых факторов внешней среды, в порядке временных модификаций, а также в результате наследуемых мутаций может нарушаться биосинтез клеточной стенки. Появляются морфологически необычные структуры бактерий, получившие название протопластов, сферопластов и L-форм.

Протопласты образуются при растворении лизоцимом стенок грамположительных микроорганизмов (стафилококков, микрококков, сарцин, бацилл). Протопласты можно сохранять жизнеспособными в гипертонической среде, например в 0,3 М растворе сахарозы. В этих условиях они способны извлекать энергию, синтезировать нуклеиновые кислоты, аминокислоты, белки и ферменты, а также расти, хотя в 2 раза медленнее целых клеток. Однако грамположительные протопласты по сравнению с целыми клетками имеют и ряд дефектов, связанных с отсутствием клеточной оболочки. К ним не фиксируется бактериофаг, они не реагируют с антиоболочечными сыворотками, не имеют диаминопимелиновой кислоты, редко ревертируют в нормальные палочковидные формы.

У палочковидных грамположительных форм микроорганизмов после лизиса оболочки часто освобождается сразу несколько протопластов. Этот факт позволил считать, что многие грамположительные палочки шероховатого типа и кокки многоклеточны.

Сферопласты — сферические структуры, сходные с протопластами, но отличающиеся от них сохранением некоторой части стенки. Поэтому сферопласты сохранили способность адсорбировать бактериофаг, размножаться, реагировать с антистеночной сывороткой и ревертировать в исходную форму после устранения факторов, обусловивших образование сферопластов. Образуются сферопласты при обработке грамотрицательных бактерий пенициллином, в результате чего утрачивается способность образовывать внутренний слой стенки, содержащий

мукопептиды и придающий бактериям ригидность. Целостность наружной оболочки разрушается и под влиянием иммунных сывороток, фага, некоторых ферментов и других факторов.

L-формы — микроорганизмы в виде больших телец, обнаруженные в 1935 г. Клинебергом в культуре *Streptobacillus moniliformis*. Названы они в честь Листеровского института, где произошло это событие. Позднее установили, что L-формы образуются в культурах микроорганизмов спонтанно или в средах с пенициллином. В мягком агаре с 10% сыворотки L-формы образуют два типа колоний — 3А и 3В. Колонии типа 3А мелкие (карликовые) с зернистой поверхностью, в отсутствие пенициллина стабильны.

Микроорганизмы, составляющие колонию 3А, имеют форму мелких гранул. В палочковидную форму из *E. coli* они не ревертируют, из сальмонелл — ревертируют с частотой $1 \cdot 10^{-9}$, из *B. Proteus* — довольно часто, 30%-ная желчь резко повышает реверсию L-форм в палочковидное состояние. Колонии типа 3В состоят из больших сферических структур, размером от 2 до 10 μ . В отсутствие пенициллина в среде сферические микроорганизмы ревертируют в палочковидные нормально размножающиеся формы. Формы 3В сравнимы со сферопластами, так как оболочка у 3В частично сохранена, цитоплазматическая мембрана уплотнена, и поэтому названные образования могут жить вне гипертонической среды. Формы 3А лишены оболочки полностью и восстановить ее не могут.

Механизм нарушения биосинтеза клеточной стенки у L-форм неясен. Имеется несколько гипотез. Наиболее вероятно допущение утраты клеткой определенных органелл, относительно независимых от контроля хромосомных генов. К 1968 г. у грамотрицательных бактерий были известны три морфологических варианта, дающих начало L-формам: 1) временно существующие варианты, подобные сферопластам, 2) истинные мутанты, у которых нарушен контролируемый синтез одного из компонентов клеточной оболочки (например, ДАП), и 3) вариант в форме голого протопласта, относительно стабильный, неспособный к восстановлению оболочки и размножающийся в особых условиях окружающей среды.

Жгутики — специализированные органы движения бактерий. Они нитевидны, белковой природы, берут начало в цитоплазме от базофильных ядер, несколько сходных с бифаропластом жгутиковых одноклеточных животных (рис. 5). Полагают, что ядра являются источником энергии жгутиков. Однако их обнаружили не у всех подвижных бактерий. Форма жгутиков цилиндрическая, несколько сплюснутая или в виде ленты, как у *Cl. botulinum*. У дифтерийных бактерий они состоят из тонких скрученных нитей, у *V. Metchnikovi* имеется центральная двуспиральная скрученная нить, окруженная оболочкой, у кишечных бактерий и спираль жгутики складываются в пучки. Отверстия в клеточной стенке, через которые проходят жгутики, имеют круговую структуру, состоящую из радиально расположенных более мелких структур.

Образуются жгутики из циркулярных дифференцированных участков цитоплазматической мембраны, прикрепляются они к клеточной

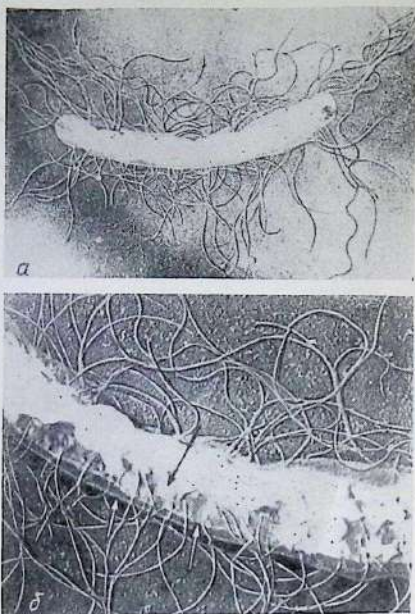


Рис. 5. *Proteus vulgaris*:

а — жгутиковые перитрихи ($\times 12\ 000$); *б* — то же ($\times 30\ 000$).
 Белые стрелки — клеточная стенка и цитоплазматическая мембрана; черная стрелка — базальная зернистость жгутиков в цитоплазме

стенке специальными дисками, движение их связано с колебаниями участков цитоплазматической мембраны. Изолированный из жгутиков белок получил название флагеллина. В кислой среде жгутики распадаются на однородные удлиненной формы частицы.

Чаще жгутики встречаются у палочковидных бактерий, реже у спиралевидных и, как исключение, у круглых (*S. urea*). Располагаются они на полюсах или вокруг тела клетки. Могут быть одиночными и множественными. Были попытки классифицировать бактерии по расположению и числу жгутиков: монотрихи — бактерии с одним жгутиком, амфитрихи — по одному на каждом полюсе, лофотрихи — по пучку на полюсе, перитрихи — жгутики вокруг всего тела клетки. Однако стало ясно, что число жгутиков у бактерий не строго стабильный признак. Описаны вибрионы с одним, двумя и восемью жгутиками.

В 1960 г. Лейфсон предложил новую классификацию. Он различает полюсные, подполюсные и боковые жгутики, а в пределах этих групп — монотрихи и мультитрихи. Предусмотрены также перитрихальные бактерии и бактерии, имеющие смешанные жгутики, два или большее число жгутиков в разных точках тела бактерии. Под монотрихами автор понимает одиночно расположенный жгутик, под мультитрихами полюсными — два или несколько жгутиков, расположенных на одном или обоих полюсах параллельно им; под мультитрихами подполюсными — несколько подполюсных жгутиков с основаниями под углом к длиннику бактерии; под мультитрихами боковыми — пучок жгутиков, размещенный в наружной трети тела бактерии. Чаще встречается полюсное и перитрихальное расположение жгутиков.

Оптимальная температура образования жгутиков несколько ниже оптимальной температуры роста бактерий. У листерий при 38° жгутики не образуются, при 37° — слабо, при 20° — максимально.

Жгутики обеспечивают бактериям поступательное, вращательное и комбинированное движение. Механизм движения неясен. Бактерии с полюсным расположением жгутиков передвигаются линейно и быстрее перитрихальных,двигающихся беспорядочно. *S. volutans* 48-часового роста в секунду преодолевает расстояние в 63μ, *V. cholerae* — в 55μ, некоторые *Salmonella* и *Escherichia* — в 28μ и т. д.

Полагают, что источником энергии жгутиков является АТФ (аденозинтрифосфорная кислота). Для каждого удара жгутиков, а их двадцатизжгутиковая бактерия делает до 400 в секунду, требуется гидролиз одного макроэргического фосфорного соединения. Благодаря жгутикам подвижностью сбладают мелкие колонии некоторых, главным образом спорообразующих, бактерий. Из патогенных возбудителей подвижные колонии были обнаружены у *Cl. oedematiens*, *Cl. botulinum*, *Cl. septicum*. Скорость движения колоний большая, направление разнообразное. После движения остается след в форме канавки.

Жгутики обладают выраженными антигенными свойствами. Уайт и Кауфман использовали этот критерий в классификации сальмонелл.

Бахромки. У *B. anthracis*, *B. Pseudomonas pyocyanea*, у многих видов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter cloacae* и *Klebsiella* обнаружены нитевидные нежгутиковые, трубчатые образования, получившие название бахромки, или фимбрии (рис. 6). Они тоньше и короче известных жгутиков. Диаметр их 80—100 Å. Волоски не обуславливают движения клеток, но обеспечивают прилипание бактерий к грибам, растениям, животным клеткам; к эпителию пищеварительного, дыхательного и мочевыделительного трактов. Кишечные бактерии и представители *Klebsiella* благодаря волоскам прикрепляются к эритроцитам и агглютинируют их.

Бахромки антигенны. Противобахромчатая сыворотка флекснеровских бактерий в больших разведениях агглютинирует все бахромчатые бактерии данного вида, а в малых — бахромчатые штаммы *E. coli*. Эти последние, видимо, содержат бахромчатый флекснеровский антиген. Антибахромчатые антитела против возбудителя дизентерии Флекснера обнаружены в нормальных сыворотках человека и кроликов.



Рис. 6. Бахромки *Klebsiella pneumoniae*.

Различают простую, или общую, бахромку и сексбахромку. Первая детерминируется хромосомными генами и не играет существенной роли в бактериальной конъюгации, вторая детерминируется плазмидами (нехромосомными факторами наследственности) и является органом конъюгации и передачи ДНК.

Простая бахромка имеет шесть типов. Наиболее изучен первый тип, широко распространенный среди семейства энтеробактерий. Антигены бахромки этого типа отличны от О-, Н- и К-антигенов. Ее образование контролируется одним или несколькими генами, она обладает гемагглютинацией, не является жизненно важной, ускоряет (но не обуславливает) передачу Col 1-плазмиды при конъюгации. Бактерии с первым типом бахромки растут в бульоне поверхностно,

часто образуют пленку. Сексбахромка имеет два типа: F и Col 1b. F-бахромка детерминируется фактором фертильности (F-фактором) у *E. coli* K-12 и других энтеробактерий. Участвует в передаче ДНК реципиентной клетке, а также ДНК и РНК-фага. Бахромка типа 1b детерминируется колициногенным фактором Col 1b, участвует в передаче соответствующих донорских свойств реципиентной клетке. У *Ps. aeruginosa* имеется F_р-бахромка, являющаяся специфическим рецептором РНК-фага.

Капсула. Слизистые вещества, выделяемые и откладываемые бактериями на поверхность своего тела, получили название капсул (рис. 7). Однако не все согласны с подобным представлением. Если слизистое вещество выявляется легко и имеет определенную форму, структуру и химический состав, то это капсула, если же его мало и оно не организовано — слизь. Некоторые считают, что на поверхности бактерий могут быть одновременно и капсула и слизистый слой, то есть что капсула и слизь являются разными вариантами одной и той же формации.

Капсулы образуют определенные виды бактерий рода *Pneumococcus*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*. Нет единства взглядов относительно происхождения капсул. Одни считают, что они являются продуктом секреции клеток, другие — набухания их стенки. Существует, наконец, взгляд, что потенциально все бактерии способны образовывать капсулу и что разница между образующими и не образующими ее бактериями заключается либо в количестве вырабатываемого слизистого вещества, либо в степени

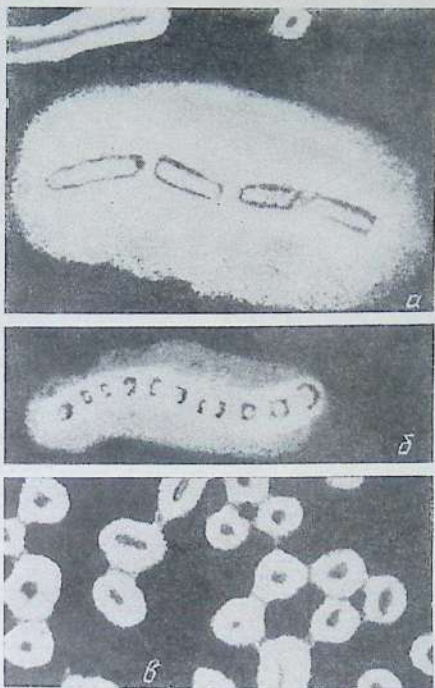


Рис. 7. Капсулы ($\times 3750$):

a — *B. megaterium*; *b* — *K. pneumoniae*; *c* — *A. aerogenes*.

вязкости, либо в условиях, при которых пытались обнаружить капсулу. Малое количество или незначительная вязкость, а также отсутствие надлежащих условий создают иллюзию отсутствия капсул.

Образование капсул действительно зависит от окружающих условий. Возбудители брюшного тифа и паратифов образуют ее лишь при $20-10^{\circ}$, возбудители сибирской язвы — в организме больного или на специальных средах. Некоторые спороносные бактерии в зависимости от состава питательной среды вырабатывают то углеводную, то полипептидную капсулы. Некоторые невирулентные варианты золотистого стафилококка после контакта с полинуклеарами крови морской свинки приобретают капсулу и становятся вирулентными для названных

животных. Описано возникновение капсул у кишечных бактерий после воздействия на них стрептомицина, фага. У некоторых стафилококков наблюдали капсулу в первые четыре часа роста, а затем она исчезала, у возбудителей птичьего туберкулеза — лишь в жидких средах. Диссоциация бактерий от S к R, как правило, лишает бактерий капсулы. В то же время пневмококки имеют этот признак при любых условиях.

Общее для капсул — их мукоидность и известная растворимость в питательной среде.

Химический состав капсул разный. Чаще они состоят из простых или сложных (содержащих азот) полисахаридов, у сибиреязвенной, сенной и некоторых других бактерий — из полипептида, у чумной бактерии — из полисахарида и протенна, у туберкулезной — из липида.

Установлено, что у *B. anthracis* капсула состоит из четырех слоев: 1) внутреннего, 2) мукополисахаридного (кислой реакции), 3) основного белково-полисахаридного и 4) наружного, имеющего мукопептиды и полипептиды. Мукопептиды наружных слоев капсулы отличны от мукопептидов оболочки клетки. Иногда в капсулярное вещество включаются некоторые компоненты животных тканей (в основном гиалуронидаза).

Капсулы не являются жизненно важной структурой бактерии. Тем не менее вирулентность возбудителей тесно связана с этим признаком. Утрата его часто лишает возбудителя болезнетворности, например у бескапсульной сибиреязвенной вакцины Н. Н. Гинсбурга. Хотя и существуют разные взгляды, все биологическое значение капсулы сводится к защите клеток от вредных внешних воздействий.

Капсулы почти всех бактерий обладают узкой антигенной специфичностью. Это явилось основанием для серологической дифференциации пневмококков на 75 серотипов, то же на ряд серотипов гонококков, кишечных и других бактерий. Описано, что в полипептидной капсуле у *B. megaterium* выявлены полисахаридные перегородки после воздействия антикапсульной антиполисахаридной сывороткой.

Споры и спорогенез у бактерий

Ряд бактерий после нескольких циклов вегетативного развития образует споры. Они располагаются внутри клетки, и поэтому правильнее их назвать эндоспорами. Размер споры и ее расположение в клетке зависят от вида бактерий, возраста ее, особенности культивирования. Форма — круглая, овальная или несколько вытянутая, почти палочковидная. Для ряда видов бактерий конфигурация споры характерна. *Cl. tetani* чаще образует круглую споры, расположенную на конце клетки (барабанная палочка). У *Cl. schauvoei*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum* и других анаэробов споры овальные.

Н. А. Красильников с соавторами (1963—1964) описали у анаэробов различные формы спор, в том числе шиповидную, звездчатую, почковидную или бобовидную и др. По форме спор и выростов на их поверхности авторы нашли возможным разделить изученные анаэробы

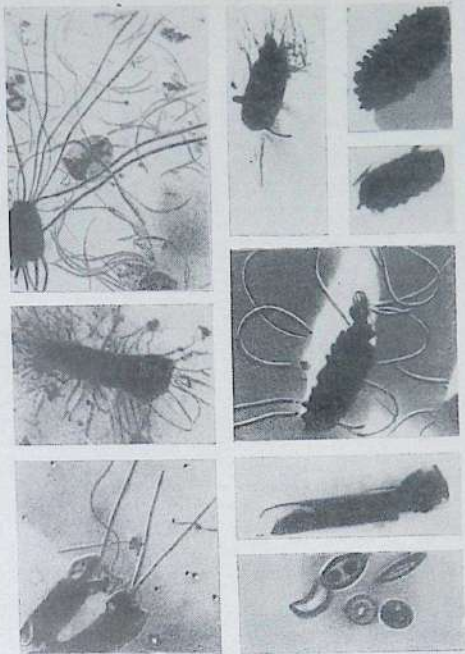


Рис. 8. Разные формы спор и выростов у культур рода *Clostridium*.

рода *Clostridium* на шесть групп: 1) споры имеют выросты в форме хвоста или расположенные лофотрихально; 2) выросты в форме султана; 3) лофо- и монотрихальное расположение выростов; 4) оболочка спор шиповидная; 5) на оболочке имеются зубчатые выросты, отчего споры напоминают звезды; 6) споры палочковидной или бобовидной формы (рис. 8). Чаще споры образуют палочковидные анаэробные и аэробные бактерии, реже шаровидные, спиралевидные микроорганизмы и вибрионы. В число непалочковидных спорообразующих входят: *S. urea*, *S. amyloferum*, *V. desulfuricans* (при 45—55°). Диаметр спор у ряда *Clostridium*, как правило, превышает толщину образующих их клеток. У многих аэробов, в том числе у *V. anthracis* и других, этого не наблюдается.

Структура споры довольно сложная и еще недостаточно хорошо выяснена. Различают центральную часть споры, именуемую споро-

014512

3-287

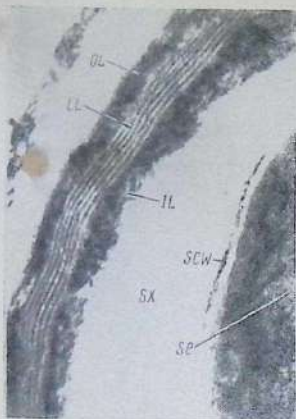


Рис. 9. Срез споры *Bac. subtilis* ($\times 247\ 000$):

SE — спороплазма; SX — кортекс; SCW — стенка спороплазмы; IL — внутренний слой оболочки споры; OL — наружный слой оболочки споры; L1 — пластинчатый слой.

В спорах имеются также полипептиды и нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК. В оболочке спор присутствуют липиды, глюкопротениды и другие химические вещества. У *B. subtilis* оболочка спор содержит, правда, в незначительных количествах, все биохимические компоненты стенки вегетативных клеток: диаминопимелиновую, муравовую и тейхонные кислоты, 0-эфирные группы, глютаминовую кислоту, глюкозамин и аланин. Количество протенинов по сравнению со стенкой вегетативных клеток повышено. Спороплазма включает сравнительно большое количество липидов, которым так же, как и солям кальция, приписывается роль обуславливать термоустойчивость спор. У сенной бациллы повышение температуры окружающей среды ведет к повышению степени насыщения липидов и ацетонорастворимых жиров.

В спорах имеются и ферменты (энзимы): аланин-рацемаза, нуклеозид-рибозидаза, аденозиндезаминназа (у *B. anthracis*). Эти ферменты считают активными. Таким образом, у покоящихся спор было установлено наличие слабого дыхания. Существуют и «покоящиеся энзимы» интактной споры, то есть эти энзимы можно вывести из состояния покоя активаторами: термическим шоком, l-аланином, аденозином и др. Сюда относят энзимы, окисляющие глюкозу, и другие углеводы. Их наличие и действие удалось обнаружить после влияния на непрорастающие споры термического шока или добавления к среде l-аланина.

плазмой, к которой примыкает стенка спороплазмы, за ней следует кора, или кортекс, и далее наружная оболочка споры. Последняя состоит из двух слоев: наружного — экзоспоры и внутреннего, получившего название стенок споры. Их две: одна примыкает к экзоспоре, другая — к корке — кортексу. У *B. subtilis* и *B. megaterium* к внутренней стенке экзоспоры прилежит пластинчатый слой, переходящий в экзоспору (рис. 9). У *B. cereus* наружная оболочка споры монолитна. На полюсах она прикрыта более толстой экзоспорой.

Химический состав и антигены. Воды, калия и фосфора в спорах меньше, кальция и магния больше, чем в вегетативных клетках. Полагают, что устойчивость к нагреванию связана с повышением количества кальция. В спорах *B. megaterium* обнаружен специальный липид — дипихолинат кальция, отсутствующий в вегетативных клетках.

В прорастающих спорах *B. cereus* появляются цитохромы, которых в покоящихся спорах нет. У *B. subtilis* через два часа от начала прорастания отмечен синтез РНК, позже ДНК. Одновременно регистрируется синтез протеннов.

Антигенный состав спор сложный. Помимо специфических споровых антигенов, имеются общие для спор и вегетативных клеток. В химическом отношении они относятся к протенновым и полисахаридным комплексам. Споровые антигены терморезистентны и выдерживают автоклавирование, антигены вегетативных клеток в этих условиях разрушаются.

Стадии спорогенеза. В настоящее время различают четыре стадии образования спор — спорогенеза.

Подготовительная стадия характеризуется прекращением деления вегетативных клеток и появлением в их цитоплазме липопротенновых зерен. Они происходят из цитоплазматической мембраны. Сливаясь в крупные образования, липопротенновые зерна отодвигаются к одному полюсу бактерии. В результате в последней образуется две зоны: с включением липопротенновых образований и без них. В зоне без включений, состоящей из гялиина, и образуется будущая спора. Цитоплазма в этой зоне конденсируется. Одновременно хроматиновое тельце — гаплоидная ядерная структура — превращается в диплоидную. Одна часть ее дегенерируется, а другая, окружаясь уплотненной (конденсированной) цитоплазмой, становится центром будущей споры. Некоторые ученые полагают, что диплоидное хроматиновое тельце делится на четыре хроматиновых тельца, из которых три распадаются, а оставшееся становится основой споры.

Стадия предспоры характеризуется появлением эллипсoidalной спороплазматической стенки вокруг конденсированной цитоплазмы, несущей ядерное вещество. В центре ее имеются два и даже четыре хроматиновых тельца.

Стадия образования оболочек споры. Для нее типична скоротечность, оболочки образуются за десять минут, и ядерное вещество становится неразличимым.

Стадия созревания споры сопровождается уменьшением объема и становлением формы и положения предспоры в клетке. Включения, размещенные в противоположном конце клетки, в этот период расщепляются и при разрыве бактерии выходят в окружающую среду. На образование и становление спор при температуре 37° уходит 18—24 часа. При 10° и 43° споры не образуются.

Прорастание спор возможно только через два или несколько более часов при 37°. В этом процессе также наблюдается ряд стадий, хотя и менее четких, чем в спорогенезе. Вначале отмечают набухание споры и снижение светопрозрачности. Далее наступает последовательный разрыв оболочек — сначала внутренней, затем наружной. Он возможен с полюса, экватора бактерии или в точке между ними. Отсюда различают полюсное, экваториальное или косое прорастание спор. Из каждой споры образуется лишь одна вегетативная клетка.

Для прорастания спор необходимы аминокислоты как источник азота, углеводы для получения энергии и предшественники нуклеиновых кислот для осуществления синтеза белков. Самыми главными факторами прорастания спор считаются L-аланин, глюкоза и аденозин. Однако каждый вид и даже вариант вида нуждается в «собственных» стимуляторах прорастания спор. *B. subtilis* var. *niger* в качестве источника азота использует только L-аланин, *B. anthracis* нуждается в L-аланине и L-тирозине, а *B. subtilis* — во всех 20 аминокислотах.

Ряд изменений претерпевает и ядерное вещество споры. Вначале исчезает околядерная цитоплазма. Она при окраске становится неразличимой в силу усиления базофильности. Далее появляются хроматиновые структуры, сливающиеся в центре споры в сплошную массу. Наконец, эта масса удлиняется, и в ней появляется перетяжка. Некоторые склонны рассматривать эти превращения как митоз ядра, что встречает серьезные возражения со стороны многих ученых-цитологов.

Превращение ядерного вещества по Красильникову. Н. А. Красильников с соавторами (1964) так описывают превращения ядерного вещества у анаэробных бактерий рода *Clostridium*: «Вегетативные, быстро размножающиеся, только что проросшие из спор клетки обладают хроматиновыми тельцами, расположенными по продольной оси клетки. Спустя некоторое время в клетках увеличивается количество хроматиновых зерен, разнообразных по форме. Базофилия протоплазмы в это время уменьшается, клетки утолщаются и удлиняются. Вскоре после этого начинается процесс спорообразования. При этом число хроматиновых телец уменьшается. В определенном, обычно слегка раздутым участке (а нередко и вне его) образуется уплотненное тело с расплывчатыми контурами — проспора. Внутри проспоры появляется хроматиновое вещество в виде длинной палочки или нити. Последняя расположена в центре по продольной оси споры. Нить хроматина нередко закручивается в спираль, что очень хорошо видно как в живых клетках, так и в фиксированных и окрашенных».

При дальнейшем формировании споры хроматиновая нить заметно укорачивается, утолщается и превращается в сравнительно крупное продолговатое или округлое тельце, лежащее в центре споры. Затем хроматиновая нить расщепляется продольно на две равные части. Одна часть отходит в сторону, примыкает к оболочке или мембране и остается здесь длительное время в виде утолщенного участка мембраны. Другая часть хроматиновой нити находится длительное время в центре споры без видимых существенных изменений. Между двумя разделившимися дочерними хроматиновыми нитями отчетливо видна поперечная перетяжка, соединяющая нити. Перетяжка слабо окрашивается и делит каждую нить на две части».

Биологическая роль спор. До сих пор по этому вопросу нет единства мнения. Прежнее представление о том, что спора является формой сопротивления спорообразующих бактерий вредным внешним влияниям, а не способом их размножения, не утратило своего значения до сих пор. Однако этот взгляд теперь мало кого удовлетворяет.

Вновь возрожденная в последнее время Н. А. Красильниковым (1965) концепция о том, что спорообразование у бактерий, помимо защитной функции, является результатом полового процесса и обеспечивает обновление и размножение бактерий, заслуживает внимания. Отмечено также, что выросты несут функцию питания спор. Во время созревания они доставляют питательные вещества клетки внутрь споры. Возможно, они представляют собой мельчайшие трубки, по которым протекает вещество. Выросты являются устойчивым видовым признаком и могут служить целям дифференциации анаэробов.

Глава 2. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, ФЕРМЕНТЫ И ВИТАМИНЫ БАКТЕРИЙ

Как все живые существа, бактерии состоят из органоенов: углерода, азота, водорода, кислорода — и включают воду, минеральные соли, белки, углеводы, липиды. В бактериях содержатся также ферменты, витамины, токсины, пигменты, антибиотики.

Вода

Количество воды в бактериальных клетках зависит от их вида, возраста и условий культивирования (среды). В среднем бактерии содержат 80% воды, колебания возможны от 75 до 85% и в более широких пределах. *E. coli* в зависимости от состава питательной среды в одних случаях содержала 60,25%, в других — 79,55% воды. Тем не менее количество воды в бактериях более или менее постоянно. В спорах воды в общем меньше, чем в вегетативных клетках. В спорах *B. tусoides* воды 70,6%, в вегетативных клетках — 87,89%. У бактерий других видов особой разницы в этом отношении нет.

Вода необходима бактериям для растворения в ней минеральных солей, для дисперсии белков, углеводов и некоторых липидов. Процессы ассимиляции и диссимиляции, роста и размножения невозможны вне водной среды. Именно поэтому все питательные среды для бактерий содержат воду, в том числе твердые среды должны иметь конденсационную воду.

Различают свободную и связанную воду. Первая испаряется при высушивании бактерий легче, вторая — труднее. Связанная вода, в свою очередь, состоит из двух фракций: гидратационной и связанной с коллоидами вещества клетки. Эта связь повышает устойчивость бактерий к отрицательным и положительным температурам. Действительно, водные растворы белков и углеводов, так же как и различные компоненты цитоплазмы, замерзают при температуре ниже нуля. Описаны бактерии, которые замораживаются при -50° . Гибель бактерий при отрицательных температурах, как выяснилось, происходит не от травмы цитоплазмы кристалликами льда, а от повышающейся токсичности ионов NaCl в этих условиях. Засолкой, замораживанием, засахариванием и высушиванием как средством консервирования скоропортящихся продуктов пользуются издавна. Повышение концентрации

Количество протеинов зависит от вида и возраста бактерий, а также от концентрации азотистых веществ в питательной среде. Показательны следующие данные: *V. anthracis* имеет 42% протеинов, *Sh. dysenteriae Flexneri* после 5-часового роста — 61%, после 20 часов — 74%, после 48 часов — 70,9%. Нечто подобное наблюдается и с другими возбудителями. Иначе говоря, стареющие клетки обедняются протеинами. Однако у человеческого типа возбудителя туберкулеза концентрация протеина с возрастом повышается, а у штамма БЦЖ не изменяется. Протеины у бактерий представлены альбуминами, глобулинами и белками типа гистона.

В качестве азотсодержащих веществ, кроме протеинов, в бактериях обнаружены полипептиды и свободные аминокислоты. Связанные в основном клеточными стенками, свободные полипептиды и аминокислоты являются главными азотсодержащими небелковыми веществами бактерий.

Полагают, что протеины находятся в бактериях чаще или в форме нуклеопротеидов, или в комплексном соединении с непротеиновой протетической группой, выполняя функцию фермента.

Нуклеопротеиды составляют 20—40% сухого остатка бактерий. Это протеины, связанные с нуклеиновыми кислотами — РНК, ДНК. Большая часть их состоит из протеинов и рибонуклеиновой кислоты, меньшая — из протеинов и дезоксирибонуклеиновой кислоты. Полагают, что 90% РНК бактерий, связанной с протеином, являются основной частью цитоплазмы.

Интересны следующие данные. Золотистый стафилококк имеет общих нуклеиновых кислот 11,57%, в том числе РНК — 8,75%, ДНК — 2,82%; тифозная бактерия — соответственно 12,84%, 9,12% и 3,72%; кишечная бактерия (R-форма) — 14,67%, 10,43% и 4,24%; S-форма: 12,37%, 8,59%, 3,78%. Однако количество нуклеиновых кислот у бактерий вариabильно. Оно зависит не только от вида, типа и фазы изменчивости возбудителя (R—S), но также и от цикла развития. В лаг-фазе и в фазе отмирания бактерий нуклеиновых кислот больше.

Нуклеопротеиды обладают антигенными свойствами, входят в состав зерен волютина, используемых бактериями в качестве источника азота и фосфора при обмене. Рибонуклеат магния обеспечивает грамположительную окраску, наконец, и это, пожалуй, самое существенное, нуклеиновые кислоты ответственны за наследственность, развитие и изменчивость бактерий.

Мукопротеиды (муцины) — комплексные соединения протеина с мукопептидной кислотой. Они вязки, тянущиеся. Антиген капсул пневмококков, гиалуроновая кислота капсул молодых культур стрептококков являются мукополисахаридами, M-антиген стрептококков — мукопептидом.

Хромопротеиды. В качестве протетической группы они содержат молекулу какого-либо металла. Сюда относятся цитохромы, каталазы, пероксидазы. Другие ферменты, тоже носящие название хромопротеидов, имеют в качестве протетической группы флавины — витамин В₂, например, желтые ферменты, участвующие в акте дыхания бактерий.

Углеводы

Содержание углеводов зависит от вида, типа, даже штамма бактерий и от условий культивирования. По мнению различных авторов углеводы составляют к общему весу сухого вещества клетки 12—18% и 10—30%.

Важно здесь сразу же подчеркнуть, что бактерии содержат принципиально две категории углеводов: моно- и дисахариды, участвующие в обменных процессах клетки, и макромолекулярные, биологически активные комплексные углеводы — полиозиды, входящие в структуру клеток. Причем последние являются не только пластическим, но и энергетическим материалом бактерий. Полиозиды представлены пентозанами, гексозанами — полимерами пентоз и гексоз, а также смешанными полимерами из пентоз, гексоз и других веществ, например уроновых кислот. Пентозаны, в частности, были обнаружены у возбудителей дифтерии и туберкулеза, гексозаны — у очень многих бактерий, смешанные — также у ряда бактерий.

В частности, капсула гемолитического стрептококка состоит из глюкуроновой кислоты, являющейся одним из представителей смешанных полисахаридов. К этой же категории веществ принадлежат камеди и слизи, состоящие из комплекса пентоз, гексоз и уроновой кислоты. Они, как уже указывалось, входят в состав стенок бактерий.

Существенное значение имеют специфические полисахариды, обнаруженные у грамположительных и грамотрицательных бактерий. Полисахариды грамположительных клеток в S-форме растворимы, не токсичны, не антигенны, но способны вступать в реакцию с гомологичными антителами. В силу последнего признака они получили название гаптенов, то есть неполных антигенов, именуемых также резидуальными антигенами. В отличие от них грамотрицательные клетки S-формы образуют полные антигены, вызывающие у животных при их иммунизации выработку агглютининов и преципитинов и вступающие с ними в специфическую реакцию. Полные антигены плохо растворимы и токсичны для человека и животных. Они получили название эндотоксинов грамотрицательных бактерий и в химическом отношении являются глицидо-липидно-протеиновыми комплексами, так как состоят из полисахаридов, фосфолипидов и протеинов. Они равноценны O-соматическим антигенам, из которых обычно извлекаются.

Антиген Vi — антиген вирулентности, химически также является глицидо-липидно-протеиновым комплексом, относительно термолabileм. Наконец, у грамотрицательных бактерий обнаружены и антигены стенок — K-антигены. Все они: полный антиген, Vi-антиген и K-антигены — серологически различны и строго специфичны.

В этой главе будет правильно рассмотреть также и наличие в составе бактериальных клеток многоатомных спиртов. Здесь должен быть назван глицерин, являющийся трехатомным спиртом. Планельес (1962), систематизируя литературные материалы по данному вопросу,

указывает, что в химическом отношении бактерии состоят из многоатомных спиртов, олигозидов, полиозидов, нейтральных олигополиозидов, содержащих N-ацетиламиногруппы, кислых полиозидов и олиго- и полиозидов, содержащих сиаловую кислоту.

Олигозиды состоят не более чем из десяти остатков моносахаридов, за исключением трегалозы, входящей в состав фракций жиров туберкулезных бактерий. Полиозиды являются полимерами, состоящими из большого количества остатков монозидов. Они входят в состав капсул, стенки, цитоплазматической мембраны и реже цитоплазмы. Гетерополиозиды включают безазотистые и азотсодержащие сахара. Они обнаружены у грамотрицательных и грамположительных бактерий. Служат целям дифференциации возбудителей (холерные вибрионы, стрептококки группы А) на типы. Кислые полиозиды, или мукополисахариды, встречаются у бактерий реже. Гиалуроновая кислота их главный представитель. Сюда же относятся мукополисахариды стрептококков группы А, являющиеся фактором вирулентности. Олиго- и полиозиды обнаружены у многих грамотрицательных бактерий. Содержат сиаловую кислоту, являющуюся, как указывалось в первой главе, полимером N-ацетилнейраминной кислоты.

Липиды

Липиды — сложные эфиры жирных кислот со спиртом. Липиды нерастворимы в воде и сравнительно легко растворимы в эфире, ацетоне, хлороформе, четыреххлористом углероде и др. Обнаруживаются в бактериях в форме крупных биологически активных молекул (макромолекулы) или, реже, в свободном состоянии. Количество липидов зависит от вида, варианта, возраста бактерий и от состава культуральной среды. Наличие в ней глицерина и особенно добавление еще глюкозы увеличивают количество липидов в туберкулезных бактериях, аланин стимулирует образование липидов в кишечных бактериях, цистеиновые среды, напротив, уменьшают его синтез. У туберкулезных бактерий нарастание общих липидов достигает максимума к 45-му дню, затем медленно снижается. Липиды, извлекаемые эфиром, увеличиваются до 63-го дня, хлороформом — 75-го дня.

У бактерий различают наличие липидов в форме нейтральных жиров, восков и фосфатидов.

Нейтральные жиры в основном состоят из пальмитиновой кислоты, в меньшем количестве в них входят масляная, капроновая, лауриновая, линолевая и линоленовая кислоты. У туберкулезных бактерий обнаружены туберкулостеариновая и фтионовая кислоты, а также ароматические кислоты: анисовая, фенилуксусная, фталевая, салицилуксусная. Спиртовой альдегид кротоновой кислоты — алдол вместе с фенилуксусной кислотой придают культуре туберкулезных бактерий специфический запах. Найдена у этих, только вирулентных, возбудителей α -миколевая кислота (до 8,3%). Она обеспечивает им вирулентность и получила название корд-фактора. Было уточнено, что корд-фактором

является трехалозо-димиколат. Однако единого мнения о роли последнего в вирулентности туберкулезных бактерий нет.

Нейтральные жиры обнаружены у ряда сапрофитов и патогенных бактерий. Их, в частности, содержат сальная палочка, кишечная бактерия, как уже говорилось, возбудители проказы, туберкулеза, дифтерии и др.

Воска — сложные эфиры жирных кислот с глицерином. Содержание их в бактериях колеблется в пределах 0,3—0,8%; у дифтерийных бактерий — 0,3%, у туберкулезных доходит до 5—11%. У человеческого и бычьего типов возбудителя туберкулеза обнаружены глицерол и фтиоцерол — омыленные производные восков.

Фосфолипиды (фосфатиды) — соединения жирных кислот со спиртом, азотистым основанием и фосфорной кислотой. Количество фосфолипидов у большинства бактерий варьирует от 0,4 до 2%, у кислотоупорных бактерий они достигают 6,5% сухого остатка. Фосфатиды содержат большинство бактерий и главным образом в комплексном соединении с сахарами, аминокислотами и протеинами. Они являются постоянным и главным компонентом цитоплазматической мембраны, находятся также и в стенке. У грамотрицательных бактерий они достигают 22% состава клеточной стенки и цементируют ее протеины. Имеются фосфолипиды и в эндотоксинах грамотрицательных клеток. У возбудителей брюшного тифа и у кишечных бактерий в эндотоксине обнаружены липидные фракции А и Б. Фракция А не иммуногенна, но является вспомогателем антигенов, стимулируя выработку антител против них. Она обладает пирогенной и нейротоксической фракциями. Фракция Б не обладает ни выраженными токсическими, ни физиологическими (фармакологическими) свойствами.

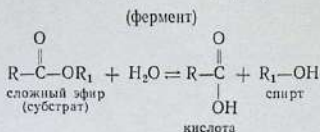
Установлено, что повышение резистентности к антибиотикам у некоторых сальмонелл, эшерихий и стафилококков сопровождалось одновременно увеличением у них липидов. Торможение синтеза последних возвращало бактериям антибиотикоподатливость.

Ферменты

Ферменты, или энзимы, — специфические белки, которые входят в состав всех клеток и тканей живых организмов. С их помощью осуществляются самые разнообразные и совершенно необходимые для жизнедеятельности превращения веществ: пищеварение, освобождение химической энергии, образующейся в результате обмена веществ, процессы газообмена и др. Существенно отметить, что ферменты сами являются продуктами жизнедеятельности клеток.

Ферменты обладают свойствами катализаторов, то есть веществ, изменяющих скорость химических реакций, следовательно они будут биологическими катализаторами. Катализаторы не влияют на величину константы равновесия реакции, а могут только изменять скорость наступления этого равновесия, то есть ускорять как прямую, так и обратную реакции. Например, фермент эстераза в системе — сложный эфир + вода ускоряет процессы гидролиза эфира с образованием

некоторого количества кислоты и спирта, а также эстераза из этих продуктов реакции при изменении условий может способствовать синтезу сложного эфира. Прямая реакция (гидролиз) и обратная (синтез) будут протекать, пока не наступит подвижное, динамическое равновесие, при котором количества распадающегося и синтезирующегося вещества в единицу времени будут равны:



В процессе ферментативного катализа образуются ферментно-субстратные комплексы, при этом частицы субстрата подвергаются некоторой деформации, что сопровождается изменением прочности отдельных химических связей. В результате происходит снижение энергетического барьера химической реакции и весь процесс протекает значительно быстрее.

Установлено, что интенсивность ферментативных процессов в бактериях во много раз превышает скорость таковых в клетках животных организмов. Это положение может быть проиллюстрировано двумя примерами: 1) поглощение O_2 в процессе обмена веществ печеночной клеткой и клеткой *Azotobacter* различно: первая использует 2—5 см³ O_2 в час на 1 мг сухого клеточного вещества, вторая же — примерно в 3000 раз больше; 2) 1 г *M. ureae* гидролизует 180—1200 г мочевины в час, а некоторые молочнокислые бактерии — 180—15 000 г лактозы за то же время.

Деятельность ферментов во многом зависит от ряда физических и химических факторов: температуры, давления, лучистой энергии, заряда, реакции среды (рН), наличия различных стимуляторов и парализаторов (ингибиторов).

Оптимальной температурой активности большинства ферментов является оптимальная температура роста бактерий: для мезофильных бактерий 37°, для психрофильных 20°, для термофильных 55—60°. Отклонение температуры в ту или иную сторону от оптимальной снижает активность ферментов. Естественно, что повышение температуры до 70° и более будет вызывать необратимую денатурацию ферментов, поскольку они являются веществами белковой природы; в то же время понижение температуры до 0° (и ниже) угнетает деятельность ферментов, которая, однако, может быть восстановлена при оттаивании (обратимая денатурация).

Все ферменты, как правило, характеризуются определенным оптимальным значением реакции среды (рН), изменения которой вызывают снижение их активности. Некоторые ферментативные процессы протекают преимущественно только в кислой среде (пепсин, папаин, амилаза, фосфатаза, некоторые окислительно-восстановительные ферменты и др.), другие же, наоборот, — в щелочной (трипсин, пептидазы,

щелочная фосфатаза, некоторые окислительно-восстановительные ферменты и др.). У щелочелюбивых бактерий (холерный вибрион) ферменты активны при наличии щелочной реакции среды. Отдельные ферменты имеют более широкие диапазоны своего действия, в пределах значения рН от 4 до 7.

Ряд химических веществ, находящихся в сфере ферментативного действия, проявляет свойства активаторов или парализаторов ферментов. Например, соли синильной кислоты стимулируют действие папаина и ингибируют активность цитохромоксидазы, каталазы, пероксидазы и других железосодержащих биологических катализаторов. Природа активаторов и ингибиторов может быть самой разнообразной: неорганической (NaCl, KCN, BaCl₂ и др.), органической (никотин, спирт, хлороформ, формалин, антибиотики и др.) и биологической (киназы, антиферменты, фитонциды и др.).

Одно из характерных свойств ферментов — их явно выраженная специфичность действия. Ферменты могут активировать химический процесс, протекающий только с каким-либо одним определенным субстратом или несколькими химически родственными веществами, воздействуя на определенный тип химической связи.

В настоящее время установлено, что каталитические свойства и специфичность ферментов зависят от наличия в их молекуле активных центров. Последние представляют собой ограниченные участки белковой молекулы фермента, обеспечивающие возможность их соединения с субстратом и образование нестойких ферментно-субстратных комплексов.

Активные центры в основном состоят из 3—5 аминокислот, расположенных в определенной последовательности (серин, гистидин и др.), и функциональных групп (—ОН, —NH₂, —SH и др.), строго ориентированных на поверхности молекул ферментов.

В настоящее время известно примерно 800 ферментов, из которых более 150 получены в кристаллическом состоянии. В результате многочисленных и весьма трудоемких исследований было выявлено, что ряд ферментов (пепсин, трипсин, папаин, уреазы и др.) может быть отнесен к простым белкам — протеинам, которые при гидролизе образуют только свободные аминокислоты; другие же, главным образом окислительно-восстановительные ферменты, являются сложными белками — протеидами, состоящими из белковой части (носитель) и протетической части — небелкового компонента или кофермента. Первая группа ферментов получила название однокомпонентных, а вторая — двухкомпонентных.

В состав коферментов входят витамины: РР, В₁, В₂, В₆, В₁₂, пантотеновая кислота, витамин Н, фолиевая кислота, а также химические вещества, не относящиеся к витаминам. Функцию кофермента витамины приобретают после соединения с рибозой и фосфорной кислотой, иначе говоря, после образования нуклеотидной формы. Так, витамин В₁ приобретает функцию кофермента, обеспечивающего декарбоксилирование α-кетокислот, когда становится тиаминпирофосфатом (ТПФ); витамин В₂ после образования соединений — флавин-

моноклеотида (ФМН) или флавинадениндинуклеотида (ФАД), осуществляющих передачу атомов водорода от одного субстрата другому; витамин В₆ после превращения в пиридоксальфосфат, производящий декарбоксилирование, переаминирование аминокислот, образование индола, антрахиловой кислоты и др.

К коферментам, в которые не входят витамины, относятся АТФ (аденозинтрифосфат) — переносчик фосфата и адениловой кислоты; УДФ (уридиндифосфат) — переносчик глюкозидных остатков и уроновых кислот; НАД (никотинамидадениндинуклеотид), НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат) — переносчик водорода и, кроме того, убихинон, липоевая кислота и др.

Хотя топографическое размещение ферментов в бактериальной клетке изучено недостаточно, все же известно, что в ядерном веществе, богатом ДНК, имеются нуклеазы, а также ферменты, синтезирующие дифосфопиридиннуклеотид (НАД), в митохондриях (мезосомах бактерий) — дегидрогеназы, системы переноса электронов и катализа цикла трикарбоновых кислот. Иными словами, в митохондриях сосредоточены ферменты, обеспечивающие клетке ее энергетический обмен.

В рибосомах — эстеразные ферменты и глюкозо-6-фосфатаза, в растворимой фракции клетки — биокатализаторы, обеспечивающие анаэробное превращение глюкозы в молочную кислоту.

Согласно рекомендации Международного Биохимического Союза («Номенклатура ферментов», 1966) в настоящее время все ферменты разделяются на следующие шесть главных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы или синтетазы. В 1930 г. Карстром предложил подразделить бактериальные энзимы на конститутивные и адаптивные. Позднее термин «адаптивный» был заменен более точным — «индуцированный». По этому вопросу существуют и другие мнения, в силу которых можно предполагать, что между этими двумя группами существуют не качественные, а скорее количественные различия; например, кристаллический препарат фермента пенициллиназы, как индуктивно, так и конститутивно образованный клетками бактерий, — идентичен, то же и для β-галактозидазы.

Конститутивные ферменты передаются по наследству и регистрируются при отсутствии в среде вещества, на которое они воздействуют. К этим ферментам относятся липазы, карбогидразы, протеиназы, оксидазы и др. Адаптивные ферменты появляются у бактерий только в присутствии катализируемого вещества. Например, *B. agabinosus* способен образовывать заново ферменты, расщепляющие арабинозу, галактозу, мальтозу и лактозу, если в этих ферментах возникает необходимость, то есть когда в питательной среде имеются соответствующие углеводы. В иных условиях названный микроорганизм указанных ферментов не имеет.

Существует ряд теорий о механизме происхождения индуцированных ферментов. Но единого мнения по этому вопросу пока нет. Нам кажется наиболее вероятной теория, согласно которой новый (индуцированный) фермент образуется при участии индуктивно измененной рибонуклеиновой кислоты информатора (и-РНК), без которой синтез протеинов невозможен. Например: в период индукции к лактозе у *E. coli*

происходит включение $C^{14}O_2$ в РНК-информатор. Сразу же после этого синтезируется соответствующий фермент — лактаза. В других опытах было показано, что тотчас после добавления в питательную среду β -галактозида синтез и-РНК у растущей на этой среде кишечной бактерии изменяется. Индуцированная и-РНК соединяется с рибосомами и обеспечивает синтез нового индуцированного фермента — β -галактозидазы.

I. Оксидоредуктазы. Само название данного класса ферментов указывает на участие их в процессах окисления и восстановления.

Аэробные дегидрогеназы переносят водород от окисляемого субстрата непосредственно на кислород, вследствие чего образуется перекись водорода.

Вещество — донатор водорода при этом окисляется. Субстрат $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix} + O_2 \rightarrow$ окисленное вещество + H_2O_2 . Аэробными дегидрогеназами наделены многие аэробные и факультативно анаэробные бактерии.

Анаэробные дегидрогеназы переносят водород от окисляемого вещества (донатора водорода) на другое вещество (акцептор водорода), которое при этом восстанавливается в лейкосоединение:

$R \begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix} + R_1 \rightleftharpoons R + R_1 \begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix}$. Эти ферменты действуют как в отсутствие, так и при наличии кислорода в окружающей среде.

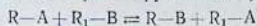
В последнем случае в качестве акцептора водорода участвует флавиновый фермент, а также некоторые пигменты бактерий. Анаэробные дегидрогеназы найдены у большого количества бактерий, у некоторых бруцелл и клостридий, кишечных палочек и др.

Пероксидаза переносит водород вещества на перекись водорода: $R \begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{matrix} + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$. Пероксидазами наделены все аэробы. Пероксидазы участвуют в различных реакциях: окислении веществ (донаторов водорода), восстановлении цитохрома С, разрушении некоторых токсинов и т. д.

Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. Как и пероксидаза, каталаза является комплексным соединением, состоящим из протенина, порфирина и железа. Каталаза и пероксидаза имеются у всех аэробных бактерий и факультативных анаэробов, но у строгих анаэробов она отсутствует. По данным М. В. Федорова (1963), настоящие анаэробы никогда не содержат железопорфириновых ферментов, имеют лишь пиридиннуклеотидные и в отдельных случаях флавиннуклеотидные ферменты.

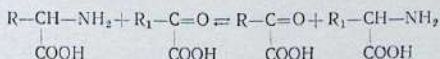
Оксидазы активируют кислород для связывания протона и электрона водорода. К оксидазам относятся цитохромы (а, в, с, c_1), а также цитохромоксидаза, передающая электроны от одного из цитохромов на молекулярный кислород.

II. Трансферазы. Действие этих ферментов сводится к переносу атомов, групп атомов и радикалов от одной молекулы к другой или внутримолекулярно:



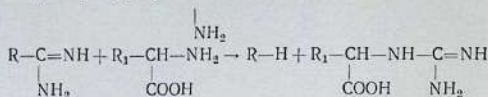
Они играют большую роль в метаболизме нуклеиновых кислот, в катаболизме углеводов, в передаче макроэргических фосфорных групп от АТФ на АДФ и т. д. К трансферазам относят аминотрансферазы, амидинотрансферазы и др.

Аминотрансферазы (аминоферазы) переносят аминогруппу ($-NH_2$) различных аминокислот α -кетокислотам: пировиноградной, α -кетоглутаровой, шавелевоуксусной:

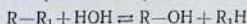


Существует ряд аминотрансфераз различных аминокислот. При переаминировании аминотрансферазы посредством своего кофермента — фосфопиридоксала переносят группу ($-NH_2$) аминокислоты на α -кетокислоты. Аминотрансферазы обнаружены у значительного количества бактерий, в том числе у кишечных бактерий, стрептококков, стафилококков, пневмококков, у *Cl. Welchii*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*.

Амидинотрансферазы (амидиоферазы) переносят с одного субстрата к другому амидиновую группу $-C=NH$



III. **Гидролазы.** С помощью этих ферментов бактерии обеспечивают гидролиз (расщепление путем присоединения молекулы воды) липидов, поли- и дисахаридов, протеинов, нуклеиновых кислот. Расщепление происходит в местах связи между атомами углерода с азотом, кислородом или серой по схеме

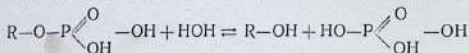


Энергии при этом выделяется мало, так как остающиеся после расщепления химические соединения содержат ее еще в большом количестве.

К гидролазам относятся эстеразы, глюкозидазы, протеазы, амидазы, нуклеазы и др.

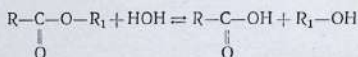
Эстеразы гидролизуют так называемые эстерные связи, то есть связи в молекуле сложных эфиров, образованных с рядом органических и неорганических кислот — фосфорной, угольной, серной. Поэтому различают:

фосфотэстеразы (фосфатазы), гидролизующие сложные эфиры фосфорной кислоты:



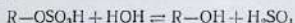
К ним относятся: нуклеотидазы, рибонуклеазы, дезоксирибонуклеазы и др. Практически фосфатазы обнаружены у всех организмов. Эти ферменты обеспечивают клетке ее углеводный обмен, брожение, фосфорилирование, в результате которого высвобождается значительное количество энергии.

Карбокситэстеразы, гидролизующие связи в молекуле сложного эфира с органической кислотой:

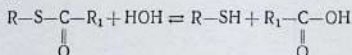


В группу карбокситэстаз входят: простые эстеразы, лецитиназы А, В, С и D, липазы. Последние найдены у *E. coli*, *B. anthracis*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum* (внеклеточная липаза);

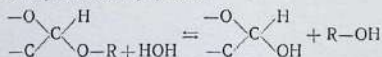
сульфотэстеразы (сульфатазы), гидролизующие связи в молекуле сложных эфиров серной кислоты:



тиоэстеразы, гидролизующие связи в молекуле сложных эфиров органических кислот и тиоспиртов:



Гликозидазы расщепляют гликозидные связи, присоединяя к молекуле моно-, ди- и полисахаридов молекулу воды:



Дисахариды при этом расщепляются на моносахариды, полисахариды — на моно- и дисахариды, мукополисахариды — на углеводы, гиалуроновая кислота — на глюкуроновую кислоту и N-ацетилглюкозамин. Сюда относятся: инвертаза, мальтаза, лактаза, амилаза (α и β):

инвертаза превращает (инвертирует) правовращающий сахар в левовращающий. Этот фермент содержат *V. comma*, *Proteus vulgaris*, капуста и картофельная бацилла;

мальтаза гидролизует мальтозу на две молекулы глюкозы, обнаружена она у возбудителей дифтерии и ботулизма, пневмококков, кишечной бактерии;

лактаза гидролизует лактозу на молекулу глюкозы и молекулу галактозы, найдена у многих бактерий;

амилазы (α и β) гидролизуют крахмал на дисахариды. Амилазу вырабатывают возбудители сибирской язвы, холеры, некоторые представители газовой инфекции, кишечная бактерия, сениная и капуста бацилла.

Ферментативная деятельность бактерий в этом направлении была использована для их биохимической дифференциации. Хорошо известна дифференциация по этому признаку бактерий рода *Escherichia* и *Salmonella*.

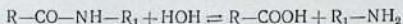
Гиалуронидазная активность обнаружена у гемолитических стрептококков, стафилококков, пневмококков, клостридий, сифилитической трепонемы и у ряда других микроорганизмов. Существенно отметить, что гликозидазы моно- и дисахаридов локализируются внутриклеточно, амилазы, гликогеназы и гиалуронидазы обычно выделяются бактериями за пределы клетки.

Протеазы — протеолитические ферменты, действие которых определяется разжижением желатин или пептонизацией молока.

В настоящее время различают протеиназы и пептидазы:

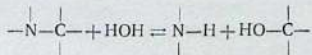
протеиназы расщепляют протеины до полипептидов. Одни из них устойчивые к кислороду — внеклеточные, другие лабильные к кислороду — внутриклеточные. Представителями протеиназ являются желатиназа, обеспечивающая гидролиз желатин, и коллагеназа — расщепляет коллаген мышечной ткани. Этот экзофермент, как и желатиназа, обнаружен у некоторых анаэробных бацилл рода *Clostridium*: *Welchii*, *hystolyticum*, *septicum*, обладающих инвазионными свойствами. У необладающих этими качествами *Cl. tetani* и *Cl. botulinum* коллагеназа не образуется; *стрептокиназа*, гидролизующая фибрин и вырабатываемая стрептококками группы А и С, также является протеиназой;

пептидазы гидролизуют промежуточные продукты распада протеинов, разрывают пептидные связи —CO—NH—



В зависимости от разрываемых ими связей различают карбоксипептидазы, аминопептидазы (их вырабатывают некоторые клостридии, тифозная и кишечная бактерии и др.), пролинпептидазы и дипептидазы.

Амидазы. В данном случае речь идет о гидролитических ферментах, разрывающих связи между атомами углерода и азота по схеме:

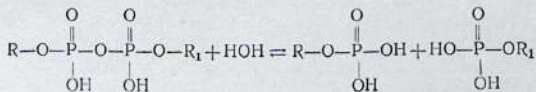


пурин и *пиримидиндезаминазы* (аденаза, гуаназа, дезаминирующие аденин и гуанин; аденилатдезаминаза и др.);

ациламидазы гидролизуют амиды аспарагиновой, глутаминовой и других кислот. Сюда относится уреазы, расщепляющая мочевину на аммиак и уголекислоту. Ею обладают кишечные, ложнодифтерийные бактерии и некоторые возбудители бруцеллеза;

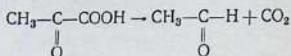
амидиназы отщепляют амидиновую группу с присоединением к ней гидроксильной воды. Стафилококки и бациллы сибирской язвы имеют принадлежащий к данной группе фермент аргиназу, гидролизующую аргинин.

Полифосфатазы гидролизуют фосфорноангидридные связи по схеме:



К данной группе гидролиза относятся нуклеазы и некоторые другие ферменты. Нуклеазы обеспечивают как полный гидролиз нуклеиновых кислот на различном уровне, так и их синтез. Ферменты, расщепляющие связи между нуклеотидами, получили название рибонуклеаз и дезоксирибонуклеаз; в фосфорных группах мононуклеотидов — нуклеотидаз; между пуриновыми и пиримидиновыми основаниями — нуклеозидаз и т. д. Рибонуклеаза деполимеризует РНК, дезоксирибонуклеаза — ДНК. Оба эти фермента обнаружены у сравнительно большого количества микроорганизмов.

IV. **Лиазы** — ферменты, отщепляющие от субстрата ту или иную химическую группу негидролитическим путем. Сюда относится пируватдекарбоксилаза, разрушающая названную связь в пирувиноградной кислоте:



В эту же группу входят лиазы, разрывающие связи между С и S, С и N, С и О и т. д.

V. **Изомеразы** — ферменты, при участии которых протекает углеводный обмен значительного числа бактерий.

Изомеразы (от изомерия) перегруппировывают атомы внутри молекулы вещества, превращая, например, глюкозу во фруктозу, галактозу в глюкозу и т. д.

Рацемазы действуют на левовращающие или правовращающие изомеры веществ. Обнаружены рацемазы аланина у фекального стрептококка, лактата у золотистого стафилококка и др.

VI. **Лигазы, или синтазы**, катализируют реакции синтеза, используя энергию расщепления аденозинтрифосфата (АТФ) и его аналогов.

Витамины

Можно представить указанную проблему следующим образом.

Прототрофные бактерии, то есть микроорганизмы с простейшим типом питания, могут самостоятельно синтезировать все компоненты своего тела из минеральных соединений. Они не нуждаются в добавлении каких-либо готовых соединений, скажем, витаминов, аминокислот, пуриновых или пиримидиновых оснований и других сложных химических веществ, без которых рост клетки невозможен.

Гетеротрофные бактерии также в большинстве случаев способны самостоятельно синтезировать необходимые им биохимические вещества, но уже из органических соединений. Однако отдельные представители гетеротрофных бактерий не способны сами синтезировать ряд важных для их жизнедеятельности веществ, как-то: витамины, аминокислоты, азотистые соединения и др.

Витамины нужны микроорганизмам для построения простетической группы ферментов. Основной потребностью для синтеза ферментов являются витамины группы В, хотя и в незначительных количествах: витамина В₁₀ около 1 мкг/мл, В₇ и В₉ — 0,2 мкг/мл, В₁₂ — 0,4 мкг/мл, В₂ — 0,5 мкг/мл, В₁ — 5 мкг/мл, В₃ — 20 мкг/мл и т. д.

Витамин В₁ (тиамин) необходим бактериям для построения простетической группы декарбоксилазы — фермента, декарбоксилирующего пирувиноградную кислоту с образованием уксусного альдегида и углекислоты. Многие бактерии синтезируют витамин В₁ сами, а лептоспиры, стафилококки и некоторые другие возбудители нуждаются в готовом витамине.

В и т а м и н В₂ (рибофлавин) входит в состав простетической группы флавиновых дегидраз. Необходим в готовом виде возбудителю столбняка, молочнокислым и некоторым другим бактериям.

В и т а м и н В₃ (пантотеновая кислота) необходим ряду бактерий для построения кофермента А, катализирующего процессы ацетилирования. Витамин В₃ стимулирует рост стрептококков, стафилококков, пневмококков, отдельных видов рода *Clostridium*, молочнокислых и уксуснокислых бактерий и дрожжей.

В и т а м и н В₄ (холин) нужен только пневмококкам для построения лецитина и процессов трансметилирования.

В и т а м и н В₅ (никотинамид) входит в состав простетической группы первичных дегидрогеназ. Эту функцию он приобретает после вхождения вместе с аденином в динуклеотид (НАД) или образуя никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). В этом витамине нуждаются золотистые стафилококки, возбудители дизентерии Флекснера, дифтерии, паратифов, некоторые бактерии рода *Pasteurella*, пневмококки.

В и т а м и н В₆ (пиридоксин) входит в состав ферментов, катализирующих процессы декарбоксилирования и переаминирования некоторых аминокислот. Необходим стрептококкам, некоторым видам рода *Clostridium*, молочнокислым бактериям.

В и т а м и н В₇ (биотин) катализирует синтез бактериями ненасыщенных жирных кислот. Нужен в целостном виде молочнокислым бактериям и в форме отдельных компонентов дрожжам.

В и т а м и н В₈ (инозит). Функция его для жизнедеятельности бактерий пока неясна.

В и т а м и н В₉ (фолиевая кислота) необходим для синтеза серина, рибонуклеиновой кислоты (РНК), участвует в синтезе тимина и пуриновых оснований. Не синтезируют фолиевую кислоту только виды рода *Clostridium* и молочнокислые бактерии.

В и т а м и н В₁₀ (парааминобензойная кислота) катализирует синтез пуриновых оснований, входит в состав фолиевой кислоты. Нужен для роста и размножения многих бактерий, в том числе пневмококков, менингококков, дизентерийных бактерий и др. Сульфонил-амиды являются ингибиторами парааминобензойной кислоты, на чем и основано их лечебное действие.

В и т а м и н В₁₂ связан с синтезом дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Является коферментом метилфераз. Необходим лептоспирам и молочнокислым бактериям, которые сами этого витамина не синтезируют.

В и т а м и н В₁₅ (кальций пангамат). Потребность в нем для бактерий не выяснена.

Некоторые бактерии являются активными продуцентами ряда витаминов. Например, кишечная палочка синтезирует 9 витаминов и выделяет их в окружающую среду: В₂, В₃, В₅, В₆, В₇, В₉, В₁₀, К₂, Е.

В и т а м и н С стимулирует рост *Cl. tetani*, *Cl. perfringens* и ферментативные реакции у молочнокислых бактерий.

В и т а м и н К. Доказано, что паратуберкулезная бактерия для своего роста нуждается в довольно сложном веществе, названном

витамином К. Это вещество синтезирует бактерия пчелиной моли *Mycobacterium phlei*. Многие другие бактерии также синтезируют витамин К.

К ростовым веществам для некоторых бактерий следует отнести некоторые аминокислоты (глутаминовая и др.), пуриновые и пиримидиновые основания, липоевую кислоту, шавелевую кислоту, жирные кислоты, пировиноградную кислоту, гепарин и др.

Глава 3. МЕТАБОЛИЗМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Термин «метаболизм» объединяет два взаимосвязанных (однако не всегда), но противоположных процесса — анаболизм и катаболизм, присущих всем живым существам и являющихся основными критериями живого.

Анаболизм (ассимиляция, конструктивный обмен, питание) сводится к использованию микроорганизмами пищевых веществ для биосинтеза собственного тела. Это достигается синтетическими реакциями, имеющими чаще восстановительный характер и характеризующимися эндотермическими процессами (В. Н. Шапошников, 1968).

Катаболизм (диссимиляция, биологическое окисление, энергетический обмен, дыхание) обуславливается извлечением энергии из питательных веществ, используемой микроорганизмами для проявления своей жизнедеятельности, физиологических функций.

Анаболизм и катаболизм в редких случаях могут быть разъединены: при гомоферментативном молочнокислом брожении углеводы, по-видимому, совсем не принимают участия в конструктивном обмене. Во всех других случаях, наоборот, одно и то же вещество участвует как в ассимиляции, так и в диссимиляции. Более того, оба эти процесса взаимозависимы и один влияет на течение другого.

Микроорганизмы, как и все живые существа, нуждаются в веществах, содержащих С, Н, О, N, P, K, Na, S, Fe, Mg, Ca, иначе говоря, — в белках, углеводах, липидах. Бактерии вовлекают их в конструктивный и энергетический обмены. Крупные молекулы питательных веществ — белки, клетчатка, крахмал — бактерии, грибки, PPLO подвергают внеклеточному перевариванию с помощью экзоферментов. Более простые соединения, легко проникающие внутрь микробных тел, подвергаются влиянию эндоферментов. Микроорганизмы нуждаются также в минеральных солях, витаминах и микроэлементах Mn, Zn, Cu, Co, Mo и др., идущих на образование коферментов. Имеются микроорганизмы, способные использовать нефть, керосин, парафин, карболовую кислоту, мыло и др.

Классификация микроорганизмов по способу питания

По способу питания (конструктивному обмену) микроорганизмы принято делить на две основные группы: автотрофы и гетеротрофы. В. Н. Шапошников считает, что правильнее говорить об автотрофном и гетеротрофном образе жизни.

Автотрофы (греч. авто — сам, трофик — питающийся) углерод используют из углекислоты воздуха или карбонатов, а азот — из аммиака или иных неорганических соединений азота. Для роста им вполне достаточно таких неорганических веществ, как NaCl , K_2HPO_4 , FeCl_3 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. За счет этих простых соединений автотрофы синтезируют свои белки, липиды, углеводы, витамины, ферменты, цитоплазму, клеточные структуры и нуклеиновые кислоты.

По способу извлечения энергии различают фотоавтотрофы и хемоавтотрофы.

Фотоавтотрофы для синтеза используют энергию солнца и в этом отношении весьма схожи с зелеными растениями. Однако имеются и отличия: зеленые растения в процессе фотосинтеза используют четыре кванта лучистой энергии и выделяют кислород, фотоавтотрофные используют один квант энергии и не выделяют кислорода. К фотоавтотрофам относятся зеленые бактерии, красные серные бактерии и красные несерные бактерии.

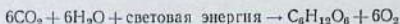
Зеленые бактерии для восстановления CO_2 используют водород H_2S .

Серные красные бактерии окисляют неорганические производные серы и сульфаты, используя для этого или сернистый, или молекулярный водород двуосновных кислот.

Несерные красные бактерии восстанавливают CO_2 за счет органических производных.

Фотохимический синтез производится в особых цитоплазматических структурах, получивших название хроматофор.

Синтез углеводов из CO_2 протекает, в принципе, как у хлорофилл-содержащих зеленых растений.

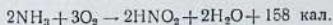


Световая энергия в этом процессе с помощью хроматофора трансформируется в макроэргические фосфатные связи, она же способствует высвобождению электронов из различных доноров водорода.

Хемоавтотрофы используют углерод из CO_2 воздуха (могут и из углеводов), а азот — из аммиака, нитратов или нитритов. Энергию при этом извлекают путем химических реакций за счет окисления таких неорганических соединений, как H_2S , NaNO_2 , NH_4OH .

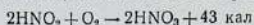
К хемоавтотрофам относится ряд групп бактерий: нитрифицирующие и нитчатые серобактерии, тионовые бактерии, железобактерии и др.

Нитрифицирующие бактерии были открыты С. Н. Виноградским. Углерод они ассимилируют из CO_2 воздуха, а азот — из аммиака. Энергию получают, окисляя NH_3 в HNO_2 и HNO_2 в HNO_3 . Соответственно им два рода — *Nitrosomonas* и *Nitrobacter*. Бактерии рода *Nitrosomonas* извлекают энергию для ассимиляции CO_2 воздуха по следующему химическому уравнению:



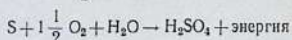
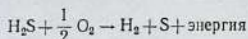
Типичными представителями этого рода являются *Nitrosomonas*

еигореае. Нитробактеры с целью извлечения энергии осуществляют вторую фазу этой реакции, окисляя азотистую кислоту в азотную:

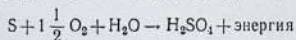
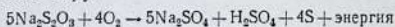


Nitrobacter Winogradsky представляют этот род. В почве данный процесс протекает с образованием не кислот, а солей азотистой и азотной кислот.

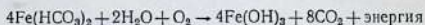
Нитчатые серобактерии (*Beggiatoa thiothrix*) извлекают энергию, окисляя сероводород в элементарную серу, окисляемую затем в серную кислоту:



Тионовые бактерии (*Thiobacillus thioarparvis* и *thiooxidans*) окисляют тиосульфаты или серу:



Железобактерии (*Leptothrix* и др.) окисляют закисные соли железа в окисные.

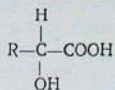


К хемоавтотрофам относятся также водородные и метановые бактерии. Нитрифицирующие бактерии, как указывалось, и некоторые другие микроорганизмы используют азот из аммиака путем простого амминирования. Щавелевоуксусная и кетоглутаровая кислоты, реагируя с аммиаком, превращаются в аспарагиновую и глутаминовую кислоты, идущие на синтез белка. Однако образование большинства аминокислот автотрофами происходит путем переаминирования с привлечением трансминаз. В этом случае датчиками аминокрупп являются аспарагиновая и глутаминовая кислоты, а акцепторами — различные кетокислоты, превращающиеся в аминокислоты, включаемые в белок бактерий.

Кроме аммиака, многие автотрофные бактерии в качестве источника азота используют соли азотной кислоты — нитраты. Рядом бактерий и грибов они восстанавливаются в нитриты (из которых некоторые автотрофы извлекают азот) или до более простых соединений, вплоть до аммиака. Этот последний идет на синтез аминокислот, а они — на построение белка.

Азотфиксирующие микроорганизмы. *Clostr. pasteurianum*, *B. radicola* с помощью фермента нитрогеназы ассимилирует азот воздуха. В результате довольно сложных химических превращений молекулярный азот, наконец, восстанавливается и становится пригодным для синтеза аминокислот и протеннов. Уробактерии используют азот мочевины, гидролизировав ее до угольной кислоты и аммиака; некоторые плесневые грибки — цианистые соли и т. д.

Принципиальное отличие автотрофов от гетеротрофов заключается в том, что первые могут сами синтезировать вещества с асимметрическим атомом углерода (R), а вторые нет. (Однако в этих веществах нуждаются как автотрофы, так и гетеротрофы).



Гетеротрофы (греч. гетеро — другой, трофик — питать) — наиболее многочисленная группа микроорганизмов, которые используют углерод из органических соединений (некоторые используют и CO_2 воздуха), а азот — из нативного белка, аминокислот, неорганических соединений азота — аммиака, нитратов, нитритов и из воздуха. Все они, кроме того, нуждаются в неорганических ионах, а многие — в витаминах группы В и иных ростовых факторах. Энергию извлекают путем окисления или сбраживания органических веществ.

Для большинства гетеротрофов источниками углеродного питания и энергии являются одни и те же углеродсодержащие органические вещества животного или растительного происхождения, а также искусственные питательные вещества. Все они окисляются гетеротрофами до CO_2 и H_2O или не до конечных продуктов. Возможно и сбраживание их.

Азотистое питание гетеротрофов крайне разнообразно. Одни для построения белка нуждаются в готовых аминокислотах — а м и н о г е т е р о т р о ф ы, другие сами строят аминокислоты из минеральных солей и безазотистых органических веществ — а м и н о а в т о т р о ф ы.

В качестве минеральных веществ для питания необходимы соли фосфорной кислоты, сера, Ca, Mg, Fe, K, Na, Cl и микроэлементы. Поэтому в питательные среды почти всегда вносят KH_2PO_4 или K_2HPO_4 , или их смесь, а также MgSO_4 , NaCl, CaCO_3 , CaCl₂, CaSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MnSO_4 , K_2MoO_4 , ZnSO_4 .

Гетеротрофы делятся на сапрофиты и паразиты.

Сапрофиты для питания используют мертвые органические соединения. Сапрофитами являются большинство бактерий и грибов.

Паразиты. Условные паразиты ассимилируют азот и углерод из мертвых органических соединений и из живого вещества живых тканей. К ним относится большинство патогенных бактерий. Obligатные паразиты вегетируют в живых тканях. Это вирусы, риккетсии и некоторые патогенные простейшие.

Портер разделил группу гетеротрофов на пять категорий.

1. Гетеротрофы, ассимилирующие азот воздуха. Это азотфиксирующие бактерии, о которых немного говорилось выше и которые отмечены рядом авторов к хемоавтотрофам. В эту категорию входят азотфиксирующие бактерии — симбионты (род *Rhizobium* и *Mycobacterium tubifasciatum*) и несимбиозные бактерии, развивающиеся в почве и воде. Симбионтные азотфиксаторы живут в симбиозе с тропическими расте-

ниями семейства Rubiaceae, передают им связанный азот воздуха и получают от них некоторые ростовые вещества, в частности витамин В₁ и В₂. Свободные азотфиксаторы (*Clostr. pasteurianum*) живут в почве и для ассимиляции азота воздуха нуждаются в углеводах.

2. Гетеротрофы, ассимилирующие азот аммонийных солей, нитратов и нитритов. Энергию для этих целей они извлекают, преимущественно окисляя углеводы и органические кислоты, из них же получают углерод. В факторах роста не нуждаются. К ним относят сапрофиты, кишечные бактерии, бактерии рода *Klebsiella*, желтые стафилококки и др.

3. Гетеротрофы, ассимилирующие азот аммонийных солей, нитратов и нитритов в присутствии аминокислот и пуринов. Ряд сапрофитов и некоторые патогенные бактерии используют азот названных минеральных соединений при добавлении в питательную среду строго определенных аминокислот. *V. mycoides* ассимилирует азот аммиака при наличии в среде глюкозы как источника углерода и энергии и некоторых аминокислот: аланина, глицина, лейцина, аргинина, валина, глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, пролина, гистидина, лизина и серина. К этой категории относятся многие виды *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Proteus*.

4. Гетеротрофы, ассимилирующие азот в присутствии факторов роста. Микроорганизмы, входящие в эту категорию, могут ассимилировать азот солей аммония, углерод ряда углеводов и органических кислот, но при наличии в среде одного или нескольких факторов роста: для *Pr. vulgaris* — никотиновой кислоты, для *Cl. sporogenes* — 16 аминокислот, для *Past. pestis* — пролина, фенилаланина и цистина, хотя лучше эта бактерия развивается при наличии в среде 12 аминокислот и т. д.

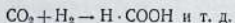
К этим микроорганизмам относят коринебактерии, микобактерии и др.

5. Гетеротрофные бактерии, нуждающиеся в сложных питательных средах. В данную категорию входят: *List. monocytogenes*, *Erys. rhusiopathiae*, *Streptob. moniliformis*, *Bart. bacilliformis* и др. Перечисленные патогенные возбудители могут развиваться лишь на средах, содержащих компоненты живых тканей животных. Едва ли эта категория научно обоснована. Известно, что возбудитель рожи свиней растет на простых мясопептонных средах.

Следует еще указать на то, что многие гетеротрофы нуждаются в CO₂ воздуха, используя ее для различных целей. *Esch. coli*, *Staph. aureus*, *Micr. lysodeikticus* ассимилируют CO₂, превращая ее в щавелевоуксусную кислоту



Кишечная бактерия может восстанавливать CO₂ в муравьиную кислоту



Bt. abortus не может развиваться в среде, не содержащей газообразной CO₂. Рост многих бактерий и прорастание спор прекращается, если окружающая среда содержит менее 0,01% CO₂.

Прототрофы — микроорганизмы, занимающие промежуточное положение между автотрофами и гетеротрофами. К ним относятся клубеньковые бактерии *Bact. radicola* и свободные азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter* или анаэробные виды рода *Clostridium*. *Bact. radicola*, вегетируя на корнях бобовых растений, ассимилирует азот воздуха, обеспечивает им клубеньковое растение, а взамен получает углеводы. Как осуществляется клубеньковыми и азотфиксирующими бактериями синтез молекулярного азота, точно не установлено, хотя на этот счет существует ряд взглядов, в том числе М. В. Федорова (1962). Советские исследователи относят клубеньковых азотфиксирующих бактерий в группу хемоавтотрофных бактерий.

Механизм обмена веществ

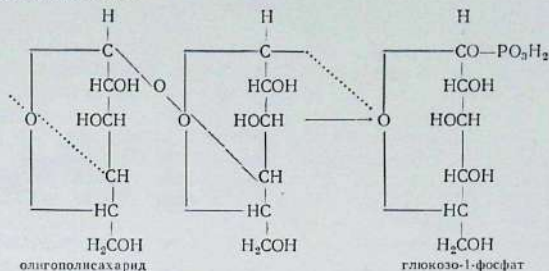
Поступление химических веществ в клетку и выделение отработанных продуктов из нее в окружающую среду основано на диосмотических процессах. При этом вода диффундирует в сторону большей концентрации вещества, а коллоиды и кристаллоиды — в сторону меньшей. Однако аминокислоты могут проникать внутрь клетки и при равных концентрациях их в ней и окружающей среде и даже против градиента плотности. Поступление химических веществ в клетку осуществляется также путем адсорбции.

Тургор — внутреннее напряжение бактериальной клетки — одно из основных условий, обеспечивающее нормальное поступление в нее питательных веществ. Для большинства бактерий тургор наиболее выражен при 0,5%-ной концентрации соли (преимущественно NaCl) в окружающей среде. При повышении концентрации соли до 2—3% наступает явление **п л а з м о л и з а** — сжатие цитоплазмы и отставание ее от стенки клетки. При помещении бактерий в гипотонический раствор, например в дистиллированную воду, последняя поступает внутрь клетки, предельно увеличивает ее объем и может даже происходить разрушение бактерий (грамотрицательных). Это явление получило название **п л а з м о п т и з а**. При плазмолизе и плазмоптите поступление питательных веществ в клетку затруднено или вовсе отсутствует.

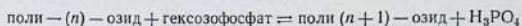
Немаловажную роль играет и растворимость химических веществ в воде и липидах. Только благодаря растворимости создается разница в концентрации химических веществ вне клетки и внутри нее, без чего процессы диффузии затруднительны. Высокомолекулярные вещества — полисахариды, протеины, не обладающие способностью проникать через полупроницаемую мембрану бактерии, должны быть предварительно гидролизованы экзоферментами на более мелкие молекулы. Лишь вещества, растворимые в липидах и нерастворимые в воде, проникают через липидные «окна» в цитоплазматической мембране бактерий.

Большое значение имеет электрический заряд бактерий, их потенциал. Обычно бактерии заряжены электроотрицательно (движутся к аноду), поэтому положительно заряженные химические вещества

фосфорной кислоты:

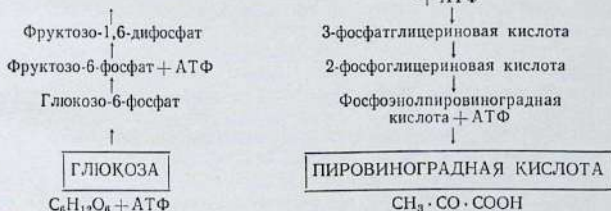
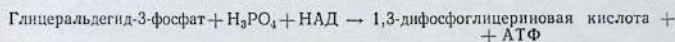


Гексозофосфаты используются бактериями на синтез собственных полисахаридов. Гексозофосфаты активны и поэтому могут соединяться с полиозидами, высвобождая при этом фосфорную кислоту:



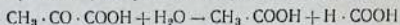
Реакция эта обратима и катализируется специфическими ферментами. Однако многие бактерии синтезируют полисахариды из моносахаридов и не нуждаются в их предварительном соединении с фосфорной кислотой, другие способны образовать полиозиды из глюкозы, маннозы, рамнозы и других, третьи обеспечивают синтез комплексных соединений из аминокислот и т. д.

Расщепление глюкозы внутри бактериальной клетки происходит путем брожения — гликолиза в анаэробных условиях до стадии пировиноградной кислоты. При этом высвобождается известное количество энергии, ибо при брожении разрывается цепь молекулы углерода. Сбраживаются моносахариды, связанные с фосфорной кислотой. Этот процесс иллюстрируется упрощенной схемой Эмбдена-Мейергофа.



Пировиноградная кислота образуется не только при расщеплении углеводов, но жиров и белков. В анаэробных условиях она расщепляется с образованием уксусной, муравьиной, молочной кислот и других продуктов (рис. 10). Кишечные, тифозные и некоторые другие бактерии

расщепляют пировиноградную кислоту на уксусную и муравьиную:



Муравьиная кислота в анаэробных условиях расщепляется под влиянием фермента гидрогенлазы до CO_2 и H_2 , под действием дегидрогеназы муравьиной кислоты обеспечивается передача водорода этой кислоты на кислород с образованием CO_2 или какому-либо другому акцептору (AH_2), возможно и восстановление молекулярного водорода (AH). Указанные ферменты обнаружены у энтеробактерий. С их помощью возможен и обратный синтез CO_2 в муравьиную кислоту или метан: $\text{CO}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{HCOOH}$ или $4\text{H}_2\text{A} + \text{CO}_2 \rightarrow 4\text{A} + \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ (А-акцептор водорода).

В настоящее время ассимиляция CO_2 воздуха и восстановление ее не более чем до карбоксильной группы обнаружены у многих гетеротрофов. Именно этим гетеротрофы отличаются от аутотрофов.

В аэробных условиях пировиноградная кислота в присутствии НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и пируватдекарбоксилазы может окисляться до активной формы уксусной кислоты и CO_2 .

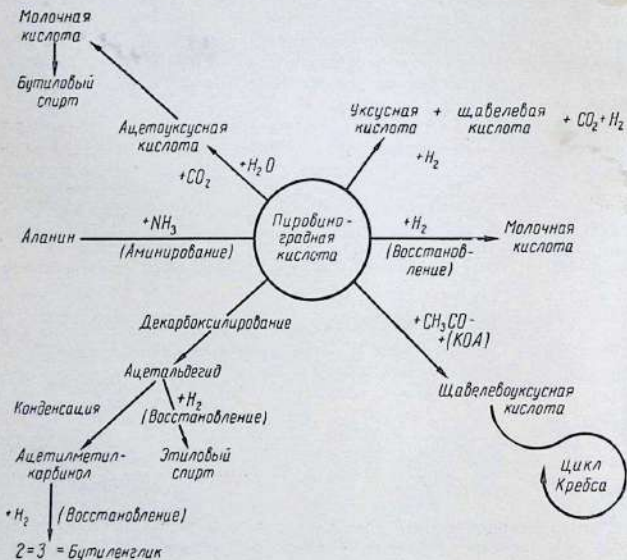
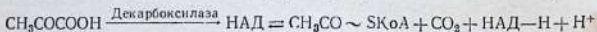
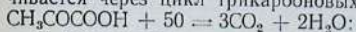


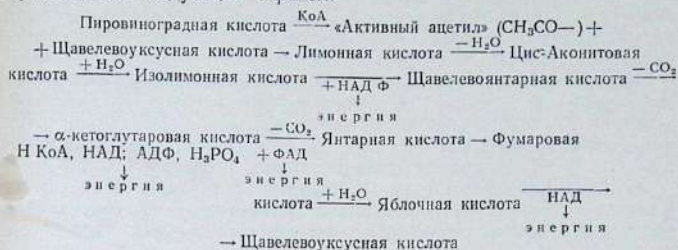
Рис 10. Схема анаэробного расщепления пировиноградной кислоты.

Реакция эта может протекать и значительно сложнее.

Полное окисление пировиноградной кислоты до H_2O и CO_2 обеспечивается через цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса):



В действительности реакция протекает значительно сложнее через ряд этапов, в которых принимает участие большое количество различных ферментов и коферментов. Упрощенная схема цикла Кребса представлена следующим образом.



Расщепление углеводов у бактерий происходит и путем брожения: спиртового (дрожжи, кишечные бактерии), молочного (молочнокислые и многие другие бактерии), лимоннокислого, пропионовокислого и др.

Белковый обмен. Источником азота для гетеротрофов могут быть белки, пептиды, аминокислоты, аммиак.

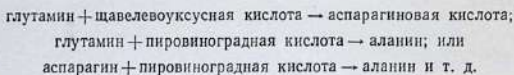
Белковая молекула слишком крупна, чтобы проникнуть через оболочки бактерий. Однако ряд патогенных возбудителей (некоторые клостридии, бациллы сибирской язвы, холерный вибрион и др.) имеет протеолитические ферменты — **экзопротеазы**, выделяемые в окружающую среду, при участии которых белковая молекула гидролизует до пептидов, способных диффундировать внутрь клетки. Здесь пептиды подвергаются гидролизу под воздействием **эндопро-теаз** (пептидаз) до аминокислот. Аминокислоты могут идти на синтез протеинов бактерий, протекающий при участии нуклеиновых кислот. У грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки) синтезу протеинов предшествует накопление свободных аминокислот в клетке и в питательной среде. Так, золотистые стафилококки накапливают глутаминовую кислоту, фекальный стрептококк — лизин. В обоих случаях установлены пределы концентрации указанных кислот внутри бактерий и в питательных средах. Глутаминовая кислота накапливается в бактериях до тех пор, пока концентрация ее в среде снизится до 10—15 мг/мл. Обнаружено расходование энергии на процесс накопления глутаминовой кислоты у стафилококков и простая диффузия (без затраты энергии) лизина внутрь фекального стрептококка.

Предполагают, что накопление свободных аминокислот бактериями протекает при участии транслоказ, находящихся в цитоплазме. Тран-

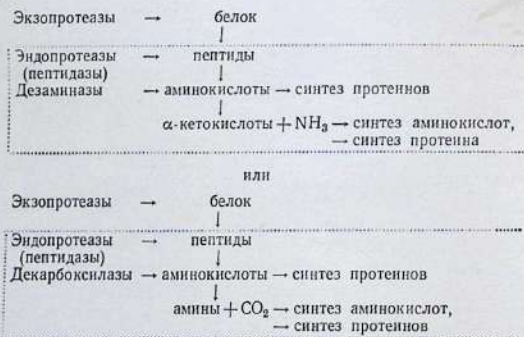
словазы обеспечивают перенос указанных аминокислот внутрь бактерий. (Имеются и возражения против этого представления). Затем аминокислоты подвергаются дальнейшему внутриклеточному расщеплению путем дезаминирования (с образованием аммиака) или декарбоксилирования (с высвобождением аминов). При дезаминировании аминокислот происходит отщепление аминной группы, в итоге образуются α -кетокислоты и аммиак, азот которого используется бактериями для синтеза собственных аминокислот и протеинов. Дезаминирование в зависимости от аминокислоты и вида бактерии может протекать в аэробных или анаэробных условиях при участии комплекса соответствующих ферментов.

Декарбоксилирование аминокислот сопровождается отрывом от них карбоксильной группы с образованием аминов: $R-CHNH_2COOH - CO_2 \rightarrow R-CH_2NH_2 + CO_2$. Установлено декарбоксилирование тирозина, лизина, орнитина, аргинина, глутаминовой кислоты микроорганизмами рода *Clostridium*, стрептококками, кишечными бактериями.

Синтез аминокислот с использованием азота аминного радикала у паратрофов происходит с помощью аминотрансфераз. В этом процессе участвуют и кетокислоты, альфа-углеродные атомы которых связывают аминный азот. Так, например:



Изложенное можно представить в виде следующей схемы белкового обмена:

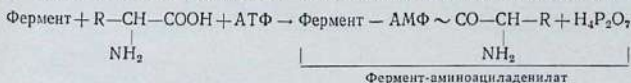


Пунктиром показаны реакции, протекающие внутри клетки.

Синтез бактериальных протеинов. Готовые или синтезированные внутри клетки аминокислоты идут на синтез пептидных цепей. Для этого используются только *l*-аминокислоты. Процессу синтеза полипептидной цепи предшествует образование гибридной

ДНК и активирование аминокислот. В ядерном веществе бактерии к одной из нитей ДНК (образующихся вследствие ее раскручивания на две нити) присоединяются необходимые нуклеотиды РНК. Как только этот процесс закончен, так РНК, сняв копию информации (расположение азотистых оснований) с ДНК, отщепляется от нее, и в форме информационной РНК (и-РНК) поступает в цитоплазму. Здесь на нее последовательно нанизываются или скользят по ветви РНК рибосомы, образуя так называемые полирибосомы или полисомы. Число их на одной ветви и-РНК может быть различным.

Одновременно происходит активирование аминокислот. Оно заключается в освобождении из АТФ пирозината и в присоединении вместо него аминокислоты, вследствие чего образуется аминоациладенилат.



Активированная таким образом аминокислота (аминоациладенилат) с помощью специального фермента присоединяется к транспортной рибонуклеиновой кислоте (т-РНК), которая «подвозит» ее к первой рибосоме на и-РНК и выстраивает на соответствующее место согласно считанному рибосомой коду и-РНК. После этого т-РНК отщепляется от аминокислоты и, вероятно, может описанную функцию повторить. Поскольку аминокислот 20, то существует и соответственное количество разновидностей молекул т-РНК. Однако у *E. coli* выделено 56 видов т-РНК, специфичных для 20 аминокислот. Три различных т-РНК специфичны для аспарагина, цистеина, глицина, гистидина и треонина, а четыре т-РНК — для пролина, пять — для триптофана.

Первая рибосома, получившая первую аминокислоту будущей полипептидной цепи, скользит на следующий триплет и-РНК, считывает его, а другая т-РНК выстраивает здесь вторую аминокислоту. Освобожденное место на и-РНК занимает вторая рибосома. Все повторяется снова до тех пор, пока первая рибосома не считает код всех триплетов и-РНК и пока на первой рибосоме не выстроится все аминокислоты синтезирующейся полипептидной цепи. Тогда готовая полипептидная цепь отщепится от первой рибосомы, а освободившаяся рибосома сходит с ветви и-РНК и может включиться в указанный процесс снова.

Как уже отмечалось, продвижение рибосомы по ветви и-РНК завершается занятием ее места следующей рибосомой, точно повторяющей ее деятельность. Процесс этот идет непрерывно. Таким образом, в каждый момент на ветви и-РНК можно обнаружить ряд рибосом и все этапы синтезируемой пептидной цепи (рис. 11). Установлено, что синтез полипептидной цепи у *E. coli* осуществляется с участием нескольких рибосом с константой седиментации 70S, составляющих комплекс полирибосом 200S. За два часа при 30° синтезировалась цепь, состоящая из 100 аминокислотных остатков.

Синтез белка у бактерий идет в логарифмической фазе их роста, которому предшествует накопление в клетках растворимой рибонук-

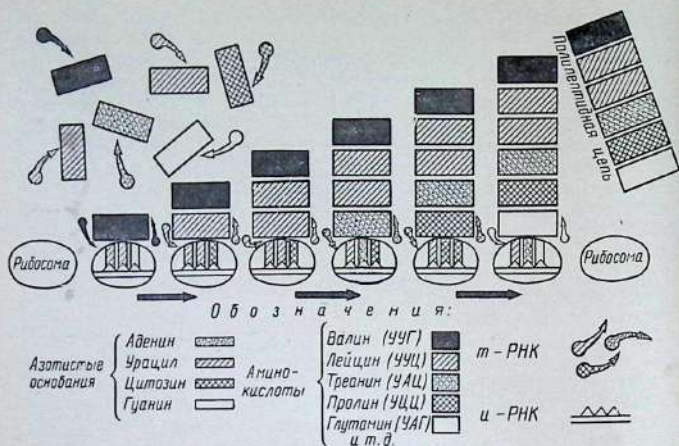


Рис. 11. Схема синтеза белка.

леиновой кислоты. Количество дезоксирибонуклеиновой кислоты в клетке остается практически постоянным.

Полагают, что с одной стороны ускорение синтеза протеннов является одновременно необходимым для синтеза ДНК и и-РНК, с другой — торможение синтеза протеинов блокирует также синтез ДНК. Вместе с тем помещение в питательную среду для бактерий аналога урацила (5-фторурацила) ведет к включению его в синтезируемую РНК, что изменяет качество строящегося протеина. Следовательно, некоторые компоненты внешней среды могут влиять на специфичность информации и-РНК. Об этом же свидетельствуют данные А. Г. Скавронской: левомицетин в концентрации 0,3—1 мкг/мл тормозит деление кишечных бактерий и синтез белка, а синтез нуклеиновых кислот от 1 мкг/мл стимулируется; в дозе 60 мкг/мл левомицетин вызывает почти полное блокирование синтеза белка и одновременно торможение синтеза нуклеиновых кислот, а в дозе 120 мкг/мл — полное угнетение синтеза белка и ДНК и резкое торможение синтеза РНК.

Лучший продукт белкового питания бактерии на искусственных средах — мышечный пептон (продукт ферментативного переваривания белка пищи). Однако в настоящее время создан ряд искусственных сред, в которые вместо пептона вводятся необходимые в качественном и количественном соотношении аминокислоты.

Любопытно, что в течение суток бактерии перерабатывают питательных веществ в 25—30 раз больше своего веса, и в этом отношении они резко отличаются от животных организмов.

Усвоение бактериями минеральных веществ. Минеральные вещества входят в состав органических веществ цитоплазмы, в ионном состоянии обеспечивают устойчивость коллоидов клетки. Наиболее необходимыми минеральными элементами являются сера, фосфор, калий, кальций, железо и некоторые микроэлементы: бор, молибден, цинк, марганец, кобальт, никель, медь, йод, бром, ванадий и др.

С е р а участвует в синтетических реакциях, влияет на окислительно-восстановительный потенциал клеток, входит в состав белка и активных групп ферментов. Лучший источник серы для бактерий — сернистые соли, содержащие окисленный атом серы. Отдельные бактерии, наоборот, ассимилируют восстановленную серу в форме H_2S или элементарную серу; некоторые патогенные бактерии ассимилируют только серу, входящую в состав органических соединений.

Ф о с ф о р входит в состав ДНК, РНК, АТФ, АДФ, простетических групп двухкомпонентных ферментов, фосфолипидов. Потребность в нем у бактерий значительна. Лучшая форма для ассимиляции — соли ортофосфорной кислоты.

К а л и й — неотъемлемый компонент всех питательных сред, так как все бактерии нуждаются в нем. Калий участвует в синтезе клеточного вещества, в превращениях углеводов. Для его ассимиляции используют калиевые соли фосфорной кислоты.

М а г н и й входит в состав хлорофилла серобактерий, в состав некоторых ферментов (эндолаза) и является активатором некоторых из них. Однако большая часть магния находится в микроорганизмах в ионном состоянии. Лучшие источники магния — сернистые соли магния и др.

Ж е л е з о входит в состав простетических групп цитохромов, цитохромоксидазы, пероксидазы, каталазы. В железе нуждаются все строгие аэробы, хотя их потребность в этом металле незначительна.

М и к р о э л е м е н т ы необходимы многим бактериям, хотя и в ничтожно малом количестве. Микроэлементы входят в состав ряда ферментов: оксидаза аскорбиновой кислоты содержит медь, карбоангидраза — цинк, фосфатазы, пептидазы, дегидрогеназы, альдолазы, карбоксилаза активируются ионами марганца, цинка, кобальта, железа.

Дыхание и брожение

Извлечение бактериями энергии для физиологических нужд обеспечивается с помощью биологического окисления субстрата, что и составляет сущность процесса дыхания. Оно реализуется аэробным и анаэробным путями. Соответственно этому микроорганизмы, живущие при свободном доступе кислорода воздуха, называются аэробами, а в условиях его отсутствия — анаэробами. Имеются микроорганизмы, занимающие промежуточное положение между этими двумя группами. Аэробы извлекают энергию либо путем прямого окисления простых элементов кислородом воздуха с помощью оксидаз, либо аэробного дегидрирования, главным образом, углеводов. Анаэробы получают энергию вследствие анаэробного дегидрирования субстрата и брожения, являющегося одной из форм анаэробного дыхания. Дыхание и брожение ныне объединяются общим термином — биологическое окисление.

Деление бактерий по типу дыхания. По типу дыхания микроорганизмов классифицируют на четыре основные группы.

О б л и г а т н ы е (безусловные) аэробы растут при свободном доступе кислорода воздуха, обладают ферментами, позволяющими передать водород от окисляемого субстрата конечному акцептору — кислороду воздуха. К ним относят уксуснокислые бактерии, возбудителей туберкулеза, холеры и многих других.

Микроаэрофильные бактерии развиваются при низкой (до 1%) концентрации кислорода в окружающей атмосфере. Такие условия благоприятны для лучистых грибов, лептоспир.

Факультативные анаэробы вегетируют как при доступе кислорода воздуха, так и в отсутствие его. Имеют соответственно два набора ферментов. Это многочисленная группа микроорганизмов, к которым относится, в частности, семейство энтеробактерий.

Облигатные (безусловные) анаэробы развиваются при полном отсутствии кислорода в окружающей среде. Анаэробные условия необходимы маслянокислым бактериям, возбудителям столбняка, ботулизма, некоторым бактериям газовой гангрены.

Отдельные ученые выделяют еще два типа микроорганизмов: 1) капнические бактерии нуждаются в повышенной концентрации в окружающей среде углекислоты и пониженной кислорода. Этим критериям отвечает возбудитель бычьего типа бруцеллеза; 2) Аэротолерантные бактерии могут развиваться при минимальных количествах остаточного воздуха (кислорода) в среде. В названных условиях нуждается *Cl. welchii*.

Для облигатноаэробных микроорганизмов типично наличие цитохромов и цитохромоксидазы, занимающих определенное положение в окислительно-восстановительных реакциях. Цитохромоксидаза соединяет водород с кислородом воздуха. Для аэробов характерны также положительные (повышенные) значения окислительно-восстановительного потенциала в логарифмическую фазу роста. Анаэробный метаболизм характерен для анаэробов, окислительно-восстановительные реакции у которых протекают в бескислородной среде. Цитохромов анаэробы не имеют. Главным источником энергии являются азотсодержащие вещества, иногда углеводы, подвергающиеся сбраживанию — ферментации. Значения окислительно-восстановительного потенциала для них минимальны. Микроаэрофильные, факультативноанаэробные и аэротолерантные бактерии, по приведенным характеристикам метаболизма, занимают промежуточное положение.

Смена характера биохимических реакций метаболизма зависит от степени насыщения среды газообразным кислородом или водородом, от окислительно-восстановительного потенциала (способность вещества отдавать или принимать электроны). Величину этого потенциала принято выражать символом μH_2 — отрицательный логарифм парциального давления газообразного водорода. Аэробы культивируются при μH_2 в пределах 14—20, факультативные анаэробы — 0—20, облигатные анаэробы — 0—12.

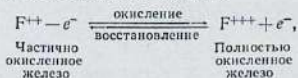
Окислительно-восстановительный потенциал подвижен. На него могут влиять SH-группы, проницаемость цитоплазматической мембраны, функциональное состояние белков цитоплазмы, а в искусственных средах — температура, растворенные в среде газы, pH среды. Наличие в цитоплазме растворенных веществ, содержащих SH-группу, повышает μH_2 ; уменьшение проницаемости цитоплазматической мембраны,

наблюдающееся под влиянием малых доз урана, сдвиг реакции в кислую сторону, ингибирование функции ферментов снижают окислительно-восстановительный потенциал бактерий, как и отклонение окружающей температуры в ту или другую сторону от оптимальной.

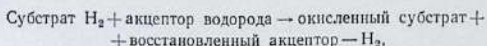
Окислительно-восстановительный потенциал среды изменяется от растущих на ней микроорганизмов. Аэробы и анаэробы, прежде чем начать размножаться, приспособляют rH_2 среды к оптимальному для их роста значению. Анаэробы снижают его с 20—22 до 1—5. Все это следует учитывать при изготовлении питательных сред.

Типы биологического окисления. С биохимической точки зрения окисление субстрата может достигнуто прямым (непосредственным) окислением вещества кислородом воздуха или же путем дегидрирования (отнятия от субстрата водорода, точнее его электрона), которое может протекать как в аэробных условиях (аэробное дегидрирование), так и в анаэробных (анаэробное дегидрирование). Прямое окисление и дегидрирование приводят к одному результату — окислению субстрата, ибо по современным представлениям окисление есть отдача субстратом водорода, точнее отрицательного электрона (символически: H или e^-), а восстановление — получение отрицательного электрона или водорода.

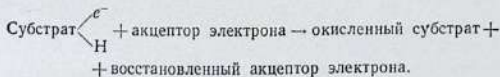
Изложенное можно иллюстрировать схемами:



или

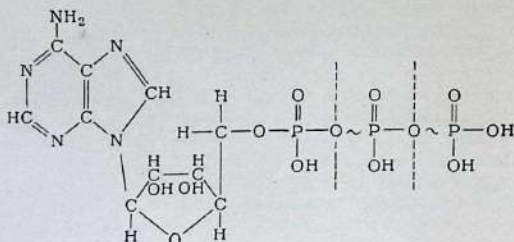


или



Перенос электрона всегда сопровождается высвобождением энергии за счет субстрата. Энергия немедленно утилизируется клеткой с помощью особых соединений, получивших название *аденозиндифосфат* (АДФ) и *аденозинтрифосфат* (АТФ). В них она накапливается в органических фосфатных (макроэргических) связях и расходуется по мере необходимости клеткой на ее нужды. Процесс этот в животных клетках, как полагают, происходит в митохондриях. У бактерий обнаружены их аналоги — мезосомы. Возможно, подобным образом протекает процесс и у бактерий. В этом и заключается смысл биологического окисления или энергетического обмена или, еще более

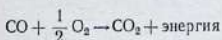
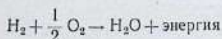
упрощенно, дыхания бактерий. Формула АТФ следующая:



Волнистой линией помечены богатые энергией (макроэргические) фосфатные связи. Разрыв происходит в том месте, где атомы фосфора соединяются через атом кислорода (показано пунктирной линией). При разрыве конечной макроэргической связи АТФ переходит в АДФ (В. А. Энгельгардт, 1969).

Во всех случаях биологическое окисление начинается одинаково: дегидрогеназы отнимают от субстрата водород (электрон). А далее, в зависимости от ферментных систем, которыми обладают данные микроорганизмы, условно различают аэробное (конечным акцептором водорода — электрона может являться кислород воздуха), анаэробное (конечными акцепторами водорода могут быть N, S, C, которые восстанавливаются до NH_3 , H_2S и CH_4) и, наконец, смешанное дыхание; анаэробно-аэробное.

Прямое окисление H_2 , CO и S кислородом воздуха осуществляют некоторые сапрофитные почвенные бактерии:

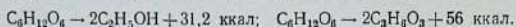


Здесь энергия выделяется в результате окисления водорода, а также окиси углерода и серы.

Общая схема процесса дегидрирования может выглядеть так: один из коферментов дегидрогеназы пировиноградной кислоты — никотинамидадениндинуклеотид (НАД) отнимает водород от субстрата, в результате чего образуется НАД- H_2 . Этот последний отдает водород следующему коферменту дегидрогеназы — флавинодениндинуклеотиду (ФАД). Он превращается в ФАД- H_2 . Освобожденная энергия тотчас накапливается в молекулах АТФ. Этим как бы заканчивается анаэробное дегидрирование, анаэробное дыхание, с которого начинается процесс как у анаэробов, так и у аэробов.

Далее, электроны водорода от ФАД- H_2 переносятся на систему цитохромов, которыми располагают аэробы, и вновь происходит освобожде-

до молочной кислоты, выделяют 56 ккал тепла:



Б р о ж е н и е. Если в биологическом окислении конечным акцептором водорода является сам субстрат, то такую форму метаболизма называют брожением. Классический пример брожения — сбраживание глюкозы. Фосфорилируясь, глюкоза расщепляется на две триозы — молекулы, состоящие каждая из трех атомов углерода. Одна из них, отщепляя остаток фосфорной кислоты, превращается в пировиноградную кислоту. Процесс этот согласно схеме Эмбдена — Мейергофа (стр. 43) протекает не в два, а в девять или десять этапов. Важно отметить, что образование пировиноградной кислоты сопровождается потерей водорода, что приводит к ее окислению, при восстановлении пировиноградной кислоты образуется молочная кислота.

Выделение и использование бактериями энергии в процессе окисления-восстановления. Установлено, что максимум энергии при аэробном дегидрировании получается на конечной стадии этого процесса, когда акцептированный водород соединяется с кислородом, образуя воду. Избыток энергии на этом этапе с помощью окислительного фосфорилирования депонируется веществами, имеющими макроэргические связи: АТФ, ацетилкоэнзим А и др. Расходование энергии для синтеза, извлеченной аэробным дегидрированием, происходит различно: кишечная палочка использует лишь 30,8% образующейся энергии, синегнойная — 27,7%, протейная — 19,9%, тифозная — 11,6%. Остальная часть энергии выделяется в форме тепла.

Извлечение энергии происходит также и с помощью анаэробного расщепления глюкозы и цикла трикарбоновых кислот. И в этом случае часть ее депонируется в АТФ, другая часть остается неиспользованной.

М. В. Федоров (1962) по этому поводу приводит соответствующие расчеты: из 57 340 г/кал запаса химической энергии, имеющегося у каждой пары водородных атомов, мобилизованных из глюкозы пировиноградными дегидразами, аккумулируется клеткой только 36000 г/кал (три макроэргические связи), остальные 21340 г/кал, или 37% общего запаса энергии, теряется в форме тепла. Эта потеря продолжается и далее, если клетка использует энергию АТФ для синтеза, что может зависеть от меньшей потребности в энергии, чем ее выделяется АТФ.

Светящиеся бактерии могут терять энергию в форме света.

Глава 4. РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ БАКТЕРИЙ

В данной главе целесообразно рассмотреть: рост и размножение бактериальных клеток, особенности размножения бактерий в популяции на жидкой питательной среде и рост колоний.

Под ростом понимают увеличение массы и веса бактериальной клетки. Некоторые ученые полагают, что при этом из «массы клетки» необходимо исключить неорганические включения, скажем, капли серы у серобактерий и др. Под ростом часто понимают также увеличение числа особей в единице объема среды, что, однако, правильнее отнести к размножению бактерий в популяции. Рост можно регистрировать визуально под микроскопом, на экране, на серийных фотоснимках и в окрашенных препаратах.

Темп и характер роста у бактерий разной формы отличаются. У палочковидных бактерий стенка и масса растут равномерно, у шаровидных бактерий — неравномерно: масса пропорционально кубу, а стенка — пропорционально квадрату радиуса клетки. Поэтому кокки вначале растут быстро, а затем увеличение их массы сдерживается отставанием роста стенки. Шмальгаузен нашел, что объем бактерий в любое время их роста можно определить по формуле: $V = V_0 e^{ct}$, где V_0 — исходный объем, C — постоянная скорость роста, t — время от начала наблюдения, l — основания натуральных логарифмов. Объем (V) разных бактериальных клеток можно вычислить по формулам: $V = 2\pi b^2(a + \frac{2}{3}b)$ — для цилиндрических бактерий с закругленными концами; $V = 2\pi ab^2$ — для цилиндрических клеток с плоскими концами; $V = \frac{4}{3}\pi r^3$ — для сферических клеток; $V = \frac{4}{3}\pi ab^2$ — для эллипсоидных клеток (где a — половина ширины клетки, b — половина ее длины).

Массу бактериальной клетки можно определить путем деления общей массы бактериальных клеток на число бактерий, составляющих ее, и другими косвенными способами.

Размножение бактерий обычно происходит путем их прямого деления или (по Биссету, 1960) почкования. Однако возможен половой процесс. Спорообразование считают также размножением бактерий.

Прямое деление. Рост бактериальной клетки сопровождается равномерным нарастанием общего азота, начальным увеличением количества РНК, после прекращения которого накапливается белковый азот. В конце роста перед самым делением клетки начинает увеличиваться количество ДНК. Хронология процесса такова: репликация ДНК (по всей длине) предшествует делению ядра, деление ядра — делению клетки. В разделении клеток ДНК не участвует.

Как показала электронная микроскопия, деление бактерий начинается с увеличения ядра и последующего разделения его на две половины, каждая из которых вскоре составит нуклеоид молодой клетки. Существуют различные взгляды на этот процесс: разделение ядра путем отщипывания (А. А. Имшенецкий, 1940), продольным делением хроматинового тельца (Робинуо, 1960), митотически (Де Ламатер, 1960). Если отбросить митотический характер деления ядра, как не только ни кем не доказанный и не разделяемый, но и не нужный бактериям, то следует признать, что хромосома действительно делится на два фрагмента. Каждый, в конечном счете, идет в разные клетки. Следовательно, деление ядра у бактерий не выравнивающее, а редуцирующее.

Чуть позднее деления ядра начинается образование поперечной двуслойной перегородки за счет цитоплазматической мембраны. Между этими слоями, в результате синтеза или выделения, появляется вещество, из которого строятся два слоя стенки двух будущих молодых клеток. Возможно, что некоторые бактерии с помощью цитоплазматической мембраны вначале делятся на две дочерние клетки, а уже после этого окружаются собственными стенками. Считают, что во всех случаях в этом процессе принимает участие мезосома. Но какое? Перегородка чаще образуется в середине делящейся клетки, и поэтому

молодые особи получают одинакового размера (изоморфное деление).

Робинуо нашел, что «делящаяся бактерия может обладать двумя, четырьмя и восемью хроматиновыми тельцами» и что, следовательно, она может быть многоядерной. Этот взгляд общепризнанный. Тот же автор утверждает, что большинство палочковидных бактерий в молодых культурах «являются двумя клетками, которые приближаются к тому, чтобы стать четырьмя клетками».

Ряд бактериологов считают грамположительные виды (споровые бактерии, кокки) многоклеточными, эшерихии и сальмонеллы — двухклеточными. Описаны кокки с двумя и четырьмя клетками, причем каждая из них содержала свое ядро.

Деление не есть синоним разделения клеток. Вероятны три возможные схемы этого процесса: А — клеточное деление опережает разделение, приводя к многоклеточным палочкам и коккам; В — синхронное клеточное деление, разделение и деление ядра дает одноклеточные организмы; С — деление ядра опережает клеточное деление, являясь причиной многоядерных бактерий. В действительности так всегда и происходит.

Разделение бактерий, в свою очередь, возможно несколькими (тремя) приемами.

Разламывающееся. Две индивидуальные клетки, неоднократно переламываясь в месте сочленения, разрывают протоплазматический мостик и отталкиваются друг от друга. Этот способ разделения характерен для бактерий, образующих цепочки: *V. anthracis*, R-формы (шероховатые) бактерии рода эшерихий и др. Разламывание происходит без перетяжки (сужения) места контакта делящихся особей, а путем расщепления или дельминации поперечной перегородки.

Скользящее. Наблюдается у S-форм (гладких) кишечных бактерий. После деления клетки немедленно обособляются, и одна из них скользит по поверхности другой. В итоге в колонии они лежат рядами. Разъединение в этом случае происходит с помощью перетяжки (перешнуровки) места деления двух особей.

Секущее. Отмечено у коринбактерий. Одна из разделившихся клеток свободным концом описывает дугу круга, центром которого является точка ее контакта с другой клеткой. Движение это возникает внезапно (отсюда секущее) и также внезапно останавливается, при этом движущаяся клетка по отношению к покоящейся занимает угловое положение, напоминающая римскую пятерку или клинопись. Образовавшаяся дочерняя клетка растет из одного пункта, часто полюсного, что получило название точки роста.

Вещества, понижающие поверхностное натяжение (мыла, соли желчных кислот), глюкоза, сахароза; D-формы серина, метионина и других аминокислот; ультрафиолетовое облучение; некоторые антибиотики (пенициллин и др.) препятствуют делению, но не задерживают роста микроорганизма. В результате образуются длинные нити. Происхождение этого явления полностью не выяснено. Однако установлено, что вещества, тормозящие синтез ДНК и не влияющие на синтез белка и рост клеток, приводят к небалансированному росту, то есть к крупным неделившимся клеткам, которые обычно умирают.

Половой процесс. У большинства бактерий бесполое размножение (изоморфное деление) — единственное. Однако электронная микроскопия позволила установить у некоторых бактерий наличие пола и полового процесса размножения, воспроизводимого искусственно. Оказалось, что среди клеток *E. coli* K-12 имеются мужские особи F^+ , обладающие фактором пола — F (фертильность), и женские F^- — нефертильные. Между ними возможно скрещивание, при этом в F^- клетки от F^+ переносится фактор пола и некоторые гены хромосомы. В результате женская клетка приобретает ряд признаков мужской

донорской клетки. Частота передачи последних незначительна — около 10^{-6} . В то же время фактор пола от F^+ к F^- передается в 1000 раз чаще других генов. Это происходит потому, что фактор F пола небольшого размера и в F^+ клетках находится в свободном состоянии в цитоплазме.

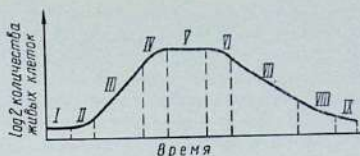


Рис. 12. Кривая роста бактериальной популяции (М. Н. Лебедева и А. А. Прозоров).

У мутантов F^+ *E. coli* K-12 ген фертильности оказался связанным с хромосомой. Женским клеткам он или вовсе не передается, или происходит это как исключение. Другие гены мужской клетки, напротив, передаются часто, около 10^{-1} — 10^{-5} . Такие мутанты, обозначенные Hfr (high frequency of recombination), дают высокую частоту рекомбинаций.

Искусственное скрещивание оказалось возможным между *E. coli* K-12 и бактериями рода *Salmonella* и *Shigella*. Подобное (или сходное) явление обнаружено у микроорганизмов рода *Achromobacter*, *Serratia*, *Actinomyces*.

Мнение отдельных ученых о наличии у спирохет определенного цикла размножения сейчас не действительно. Спирохеты размножаются подобно бактериям и относятся к шизофитам.

Размножение бактерий в популяции. Теоретически допускается, что если бактериям создать условия непрерывного притока и прогрессивного увеличения массы свежей питательной среды и оттока продуктов выделения, то размножение будет возрастать логарифмически. Однако в замкнутых резервуарах с питательной средой при оптимальных условиях выращивания численность популяций бактерий меняется и строго закономерно.

Если на оси абсцисс отложить участки, соответствующие времени в часах, а на оси ординат логарифмы чисел живых клеток, выросших в бульоне за соответствующее время, и точки их воображаемого пересечения соединить кривой, то для большинства бактерий она будет приблизительно одинаковой (рис. 12).

Итак, существуют IX фаз размножения бактерий в популяции (другие ученые усматривают всего IV фазы).

I и II. Исходная стационарная фаза и фаза задержки. Часто обе фазы объединяют термином лаг-фаза, то есть фаза задержки. В этот период бактерии адаптируются к новым условиям, не размножаются, часть их, по-видимому, отмирает. Кривая полого, с небольшим конечным подъемом. Отмечено, что в этот период бактерии впитывают воду, набухают. Вероятно, в них протекают какие-то другие процессы, пока невыясненные. Продолжительность лаг-фазы зависит от видовых особенностей микроорганизмов, их возраста, количества засеваемого материала, питательных веществ и др. Для большинства бактерий этот период равен четырем часам, для лепто-

спир — 3—5 дням. Старые культуры размножаются позднее молодых; большое количество засеянных бактерий укорачивает лаг-фазу, вероятно, в связи с внесением нужных для начала роста компонентов (затраченные ферменты, метаболиты и др.); достаточное количество питательных и ростовых веществ, оптимальная температура, рН, CO_2 , необходимые данному виду микроорганизма, ускоряют его размножение.

III. Л о г а р и ф м и ч е с к а я ф а з а получила также название экспоненциальной — показательной. Она характеризуется предельно быстрым и постоянным, через равные промежутки времени, размножением бактерий — логарифмическим ростом их популяции. Кривая почти вертикальна.

Время генерации, то есть время, прошедшее между двумя последовательными делениями бактерий, в этой стадии будет постоянным для данного вида, а количество бактерий станет удваиваться, то есть увеличиваться в геометрической прогрессии: за время, равное одной генерации — в 2 раза, за два срока — в 4 раза, за три генерации — в 8 раз и т. д. Зная исходное число бактерий в популяции N_p , легко вычислить количество бактерий K_b за n генераций по формуле:

$$K_b = N_p \cdot 2^n. \quad (1)$$

Длительность генерации (g) устанавливается по времени (1), в течение которого образовалось данное число генераций:

$$g = \frac{t}{n}, \quad (2)$$

а число генераций (n), в свою очередь, соответствует

$$n = \frac{t}{g}. \quad (3)$$

Когда число генераций за время t и время, потраченное на одну генерацию, установлены, то количество бактерий K_b вычисляют по формуле:

$$K_b = N_p \cdot 2^{\frac{t}{g}}. \quad (4)$$

Легко заметить, что данная формула (4) является иной формой первого уравнения. Подсчитав исходное (N_p) и конечное количество бактерий (K_b), а также, имея в виду, что после каждой генерации их количество удваивается, зная, наконец, время (t), в течение которого росла культура, число генераций (n) подсчитывают по формуле:

$$n = \frac{\log K_b - \log N_p}{\log 2}.$$

Установив число генераций, можно решить формулы (2), (3) и (4).

Однако приведенные расчеты пригодны на тот случай, если в логарифмической фазе все нарождающиеся бактерии остаются живыми. В действительности же 20% бактерий к концу названного периода отмирают. Следовательно, нарастание бактерий происходит в геометрической прогрессии с основанием не в 2, а 1,6. Поэтому в последней формуле вместо $\log 2$ ставят $\log 1,6$.

Длительность генерации зависит от вида микроорганизма, температуры, состава среды, рН и т. д.

Величина g для стафилококков составляет 15—17 минут, для бактерий групп *Salmonella* 20—30 минут, для возбудителя туберкулеза — 12 часов. Любые неблагоприятные условия увеличивают время генерации.

В логарифмическую фазу роста все бактерии приблизительно одинакового размера, но меньше, чем в лаг-фазе, физиологически «мо-

лоды», биологически и биохимически активны, имеют тонкую стенку, легко ранимы, слабо резистентны, некоторые грамотрицательные виды красятся по Граму положительно.

IV. Фаза отрицательного ускорения, или замедленного роста характеризуется увеличением времени с определенным ускорением на каждую последующую генерацию и параллельным замедлением деления в них (генерациях) бактерий. Оба процесса обуславливаются истощением питательной среды, уменьшением акцепторов водорода, накоплением отработанных, ядовитых для бактерий, продуктов, изменением рН среды и др. Вследствие этого размножение микроорганизмов все более замедляется, отмирание увеличивается. Кривая IV приближается к горизонтальной положению. Отсасывая испорченную питательную среду и добавляя свежую, ученые не смогли добиться продолжения логарифмического роста культуры бактерий. Возможно, как всем живым существам, микроорганизмам необходим минимум пространства, без которого их накопление невозможно. Однако это только предположение.

V. Стационарная фаза роста характеризуется сбалансированным (уравновешенным) размножением и отмиранием бактерий. Вследствие этого в каждую единицу времени в среде имеется определенное количество живых и столько же мертвых микроорганизмов. Кривая V становится параллельной оси абсцисс. В эту стадию концентрация живых бактерий в среде максимальна, отсюда — «фаза M — концентраций». Ее значение зависит от вида микроорганизма. Действительно, M — концентрация для кишечно-паратифозных бактерий равна 1,5 млрд/мл, для брюшнотифозных — 800 млн/мл, для дизентерийных — 300 млн/мл и т. д. Причина данного явления не ясна. Мертвые бактерии на M — концентрацию живых не влияют, минимальное пространство, как будто тоже. В частности, выращивание бактерий в условиях усиленной аэрации среды повышает M — концентрацию. Разумеется, что такие факторы, как температура выращивания, объем сосуда и среды, состав последней и многое другое, также могут повлиять на M — концентрацию бактерий.

VI, VII, VIII. Фазы отмирания (VI. Фаза ускорения отмирания) характеризуются прогрессивным превосходством числа умирающих бактерий над количеством нарождающихся. Кривая VI приобретает наклонное положение. VII фаза соответствует логарифмической фазе гибели микроорганизмов, то есть гибели с постоянной скоростью через равные промежутки времени. Кривая VII еще более наклонна. Для VIII фазы — замедленной скорости отмирания, или фазы приспособления, типично новое уравнивание числа нарождающихся и умирающих клеток, но при весьма малой численности популяций. Эта фаза переходит в IX — конечную стационарную фазу.

К концу вторых суток живых кишечных бактерий остается всего 24%, холерных вибрионов — 17%, пневмококки нацело отмирают через 2—3 суток, другие микроорганизмы погибают через недели и многие месяцы. Причины отмирания: истощение питательной среды

и наводнение ее ядовитыми продуктами обмена; изменение физико-химических свойств, «естественное старение» (!) клеток. В фазе отмирания бактерии изменяют морфологию, при этом появляются инволюционные формы (нити, шары и др.); плохо воспринимают окраску; утрачивают часть биохимической активности, вирулентности и антигенных свойств и т. д.

Разумеется, что при изменении оптимальных условий культивирования вся кривая на рисунке 12 приобретает иной вид. Культура, помещенная в ледяную воду, прекратит рост, и кривая не только не поднимется вверх, но после некоторой протяженности по горизонтали соопустится вниз. Субоптимальные плюсовые температуры, реакция не соответствующая оптимальному рН и др., сделают кривую низкой и т. д.

Рост микроорганизмов в жидкой питательной среде проявляется различными признаками: помутнением (кишечные бактерии) или крошковатой мутью (стрептококки); наличием или отсутствием пленки; характером пленки (рыхлая, слизистая — возбудитель чумы, сухая гладкая или воршистая — возбудитель туберкулеза человека); наличием или отсутствием осадка (слизистый осадок — возбудитель сипа, выплывший осадок — возбудитель сибирской язвы; окрашиваемость среды (бесцветная, окрашенная у *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Золотистый, в отличие от известных микроорганизмов, среды не изменяет и никаких визуальных признаков роста не образует.

Рост колоний. Колония бактерий на твердой питательной среде производится из одной или нескольких клеток данного вида. Критериями характеристики колоний могут быть: поверхность (гладкая и выпуклая — кишечнотифозные бактерии, шероховатая — возбудитель сибирской язвы), край (ровный — у большинства S-форм бактерий, зубчатый — у некоторых R-форм бактерий, каемчатый — у возбудителя чумы), цвет (бесцветные, окрашенные — у *Pseudomonas aeruginosa* и др.), консистенция (сухие — у возбудителя туберкулеза человека, слизистые — у капсульных пневмококков мелкие), просвечиваемость (мутные, прозрачные), подвижность (неподвижные — у подавляющего большинства бактерий, подвижные — у некоторых анаэробов), размер (точечные, мелкие, крупные) и т. д.

Мелкими считают колонии размером 1—2 мм, средними — 2—4 мм, крупными — 4—5 мм и более. Размер колоний, как указывалось, зависит от вида микроорганизма. Кроме того, он лимитируется небольшим количеством питательной среды, достигающей верхних слоев вблизи их; накоплением отработанных запасов пищевых веществ вокруг нее; близким расположением других колоний, что приводит к конкуренции, ограничивающей рост одной или обеих колоний.

Мутации бактерий ведут к изменению их морфологии, характеристики колоний, а также биохимических и вирулентных свойств.

Глава 5. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА БАКТЕРИЙ

Нуклеиновые кислоты и их роль в метаболизме бактерий. В клетке бактерии содержатся дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновая (РНК) кислоты. Нуклеиновые кислоты представляют биологические полимеры, состоящие из чередующихся нуклеотидов. В состав каждого нуклеотида входят азотистое основание, пентозный сахар и фосфатный остаток. В состав ДНК входят два пуриновых (аденин и гуанин) и два пиримидиновых (тимин и цитозин) основания. В отличие от ДНК в молекуле РНК вместо тимина содержится урацил. Пентозный сахар в ДНК представлен дезоксирибозой, а в РНК — рибозой (рис. 13).

Однако ДНК и РНК отличаются не только по строению пентоз и составу азотистых оснований. Согласно модели, предложенной Уотсоном и Криком на основании данных рентгеноструктурного анализа, молекула ДНК представляет двойную спираль, состоящую из двух полинуклеотидных цепочек (рис. 14). Пуриновые основания одной цепочки противостоят пиримидиновым основаниям другой и между ними устанавливаются водородные связи. Обе полинуклеотидные цепочки в молекуле ДНК являются комплементарными в отношении оснований, входящих в их состав. Так, гуанин одной цепочки всегда связан с цитозином другой, соответственно аденин оказывается связанным с тимином. В противоположность ДНК молекула РНК представляет одну полинуклеотидную цепочку. Для конфигурации РНК при определенных условиях характерно образование коротких биспиральных структур, обусловленных комплементарностью оснований в некоторых участках одной цепочки молекулы РНК.

Несмотря на сходство химического строения ДНК и РНК, они имеют различное, но взаимосвязанное значение в метаболизме клетки.

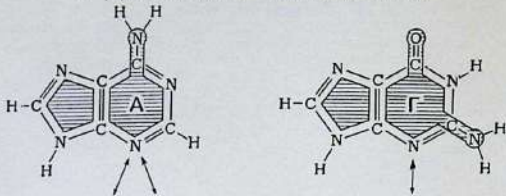
Но какая зависимость существует между структурой ДНК и ее функцией, что определяет специфичность ее как носителя генетической информации? Изучение количественного соотношения пуриновых и пиримидиновых оснований у различных видов микроорганизмов позволило обнаружить ряд интересных закономерностей. Было обнаружено, что соотношение суммы пуриновых оснований к сумме пиримидиновых, а также соотношение аденина (А) к тимину (Т) и гуанина (Г) к цитозину (Ц) в молекуле ДНК составляет 1 : 1, что объясняется комплементарностью оснований в двух полинуклеотидных цепочках молекулы ДНК (правило Чаргаффа). Важно отметить, что независимо от фазы роста, возраста культуры и условий выращивания отношение пуриновых оснований к пиримидиновым в ДНК остается постоянным. В противоположность этому соотношение $A + T/G + C$ в зависимости от вида микроорганизма бывает различным: больше 1 (так называемый АТ тип) или меньше 1 (ГЦ тип). Чем ближе в родственном отношении изучаемые микроорганизмы, тем меньше разница в соотношении $A + T/G + C$.

Еще Даунс в 1952 году сделал предположение о том, что последовательность нуклеотидов в ДНК определяет последовательность аминокислот в молекуле белка, то есть ДНК является генетическим кодом, в котором записана структура белковых молекул. Подтверждение и дальнейшее развитие идеи генетического кодирования нашли в работах Крика с сотрудниками. Было высказано предположение о том, что генетический код является триплетным, неперекрывающимся, вырожденным и без «запятых».

Триплетность кода означает, что последовательность из трех нуклеотидов является кодом одной аминокислоты. Последовательность из двух нуклеотидов не может быть кодирующей единицей (кодонам), так как в этом случае возможно лишь 16 сочетаний нуклеотидов (4×4), в то время как аминокислот 20. В случае триплетного кода возможно 64 сочетания нуклеотидов ($4 \times 4 \times 4$). При этом либо часть триплетов «бессмысленна», либо два или несколько триплетов могут кодировать одну аминокислоту (так называемая вырожденность кода). Неперекрывающимся является код, в котором ни один из нуклеотидов одного триплета не входит в состав смежных с ним триплетов (рис. 15). Отсутствие «запятых» означает, что между кодирующими аминокислоты триплетами нет нуклеотидов или групп нуклеотидов, разграничивающих триплеты.

Блестящее подтверждение того, что кодовое число равно трем или кратно трем, получено в работе Крика с сотрудниками (1961), выполненной на модели фага Т4.

Пуриновые основания



Пиримидиновые основания

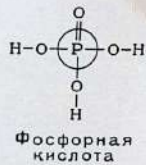
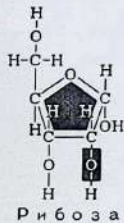
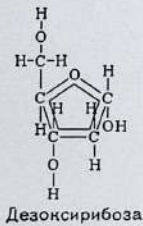
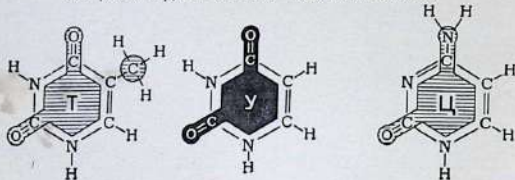


Рис. 13. Компоненты нукленновых кислот.



Рис. 14. Схема строения ДНК (двойная спираль).

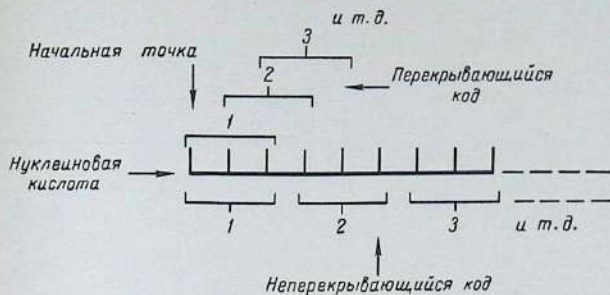


Рис. 15. Различия между перекрывающимися и неперекрывающимися кодами. Короткими линиями изображены основания нуклеиновой кислоты. Схема относится к триплетному коду.

Ими было установлено, что профлафин вызывает выпадения или вставки оснований в молекуле ДНК бактериофага, приводящие к нарушению «смысла» кода и утрате функции гена, в котором произошло это изменение. Такой тип изменений в кодирующей структуре ДНК можно сравнить с выпадением буквы или вставкой лишней буквы при наборе какого-нибудь слова. В этом случае слово теряет смысл и читается неверно.

Однако функция гена, нарушенная вследствие мутации такого типа, может быть восстановлена, если в соседнем участке молекулы ДНК произойдет изменение, противоположное тому, которое обусловило нарушение функции (то есть вставка основания), если первая мутация обусловлена выпадением или выпадение основания, если первая мутация обусловлена вставкой. При этом «бессмысленным» остается небольшой участок, локализованный между первой и второй мутациями.

Механизм действия таких внутригенных «супрессорных» мутаций можно объяснить только предположением, что генетический код читается односторонне с определенной «стартовой» точки. Каждый участок ДНК, определяющий структуру того или иного фермента, иными словами каждый ген, имеет «стартовую» точку. Это предположение является правомочным, так как было показано, что выпадение значительного участка между двумя генами (делеция) приводит к функциональному объединению этих генов. При этом чтение кода начинается от «стартовой» точки того гена, у которого она не повреждена в результате делеции.

Важные данные о природе генетического кода были получены при изучении биосинтеза полипептидов в бесклеточной системе. Впервые Ниренберг (1961) показал, что когда в бесклеточную систему, представляющую набор всех необходимых для биосинтеза белка клеточных компонентов (меченные по C^{14} аминокислоты, рибосомы, т-РНК, активирующие ферменты, АТФ), добавляли полиуридиловую кислоту, то наблюдали включение фенилаланина в синтезируемый полипептид с образованием полифенилаланина. В данном случае матрицей для синтеза полипептида был искусственный полириботид, состоящий из трех молекул урацила (УУУ). Эти данные позволили предположить, что кодирующим триплетом для фенилаланина является последовательность УУУ.

В дальнейшем было показано, что добавление различных синтетических полириботидов определенного нуклеотидного состава неодинаково стимулирует включение разных аминокислот в синтезируемый полипептид. Путем изучения взаимосвязи между включением той или иной аминокислоты в полипептид и нуклеотидным составом искусственных полириботидов, являющихся матрицей для синтеза полипептида в бесклеточной системе, в лабораториях Ниренберга, Очоа и Корана был расшифрован нуклеотидный состав триплетов, а затем и последовательность нуклеотидов в триплетах, кодирующих 20 аминокислот (табл. 1).

Расшифровка триплетов, кодирующих аминокислоты

Первый нуклеотид кодона	Второй нуклеотид кодона				Третий нуклеотид кодона
	У	Ц	А	Г	
У	фенилаланин	серин	тирозин	цистеин	У
	фенилаланин	серин	тирозин	цистеин	Ц
	лейцин?	серин	охра	?	А
	лейцин	серин	амбер	триптофан	Г
Ц	лейцин	пролин	гистидин	аргинин	У
	лейцин	пролин	гистидин	аргинин	Ц
	лейцин?	пролин	глутамин	аргинин	А
	лейцин	пролин	глутамин	аргинин	Г
А	изолейцин	треонин	аспарагин	серин?	У
	изолейцин	треонин	аспарагин	серин?	Ц
	изолейцин?	треонин	лизин	аргинин?	А
	метионин	треонин	лизин	аргинин?	Г
Г	валин	аланин	аспарагиновая к-та	глицин	У
	валин	аланин	аспарагиновая к-та	глицин	Ц
	валин	аланин	глутаминовая к-та	глицин	А
	валин	аланин	глутаминовая к-та	глицин	Г

Примечание: охра и амбер — триплеты, детерминирующие генетическую трансляцию.

Причем было установлено, что специфичность кодона определяется главным образом последовательностью двух первых нуклеотидов триплета.

Но каким образом происходит реализация генетической информации, закодированной в нуклеотидной последовательности молекулы ДНК? Как известно, синтез белка происходит не в ядрах, где содержится ДНК, а в рибосомах — цитоплазматических образованиях рибонуклеопротеиновой природы. Следовательно, можно было предположить, что существует какой-то посредник, переносящий информацию ДНК в рибосомы.

Впервые переносчик генетической информации — информационная РНК (и-РНК) была обнаружена Волкиным и Астраханом (1960), которые показали, что скорость синтеза этой РНК в клетках *E. coli*, инфицированных бактериофагом T2, прямо пропорциональна скорости синтеза белка бактериофага. Хол и Шпигельман (1961) показали возможность образования двухцепочечной гибридной молекулы, содержащей одну из полинуклеотидных цепочек денатурированной теплом молекулы ДНК и комплементарную ей цепочку молекулы и-РНК, что явилось неоспоримым доказательством аналогии их кодирующей структуры.

При осаждении в градиенте плотности сахарозы или хлористого цезия фракция и-РНК из *E. coli* имела константу седиментации 8S, что соответствует молекулярному весу 100 000—300 000. Однако, как показали дальнейшие исследования, низкая константа седиментации объясняется исключительной неустойчивостью молекулы и-РНК. При щадящих методах выделения обнаружена и-РНК- константой седиментации до 30—45 S.

Молекула ДНК участвует в двух функционально различных процессах — репликации и транскрипции. Репликация представляет процесс самоудвоения ДНК, что обеспечивает приемственность генетической информации, то есть полное и точное воспроизведение наследственных признаков родителя у дочерних клеток.

В настоящее время доказано, что ДНК реплицируется полуконсервативным способом, который заключается в следующем. Перед делением клетки происходит разрыв

лабильных водородных связей между двумя полунуклеотидными цепочками молекулы ДНК, и каждая из этих цепочек служит матрицей для построения новой комплементарной ей полинуклеотидной цепочки. Таким образом синтезируются две дочерние двуцепочечные молекулы ДНК, каждая из которых несет одну родительскую полинуклеотидную цепочку и одну вновь синтезированную. Последовательность комплементарных пар оснований в этих дочерних молекулах ДНК аналогична, что и обуславливает преемственность генетической информации (рис. 16).

Процесс реализации генетической информации (транскрипция) заключается в том, что одна из двух цепочек ДНК является шаблоном для построения комплементарной ей молекулы и-РНК. Однако протяженность молекулы ДНК достаточно велика и составляет у бактериофага Т4 4×10^9 нуклеотидов, а у бактерий — 10^8 нуклеотидов. Молекулярный вес и протяженность молекулы и-РНК значительно меньше, что ставит под сомнение возможность переноса всей генетической информации, закодированной в ДНК, одной молекулой и-РНК. Под понятием ген в настоящее время подразумевают участок молекулы ДНК, кодирующий аминокислотный состав одного белка — фермента. С этих позиций кажется более вероятным, что процессе транскрипции представляет последовательный синтез многих молекул и-РНК, каждая из которых несет информацию в отношении структуры лишь нескольких ферментов, детерминированной соответствующими генами. Имеется ряд доказательств существования молекул и-РНК достаточно большой величины, чтобы нести информацию в отношении нескольких ферментов.

В цитоплазме бактериальных клеток обнаруживают еще один тип РНК, обладающий растворимостью в молярном растворе поваренной соли, тогда как основная часть клеточной РНК выпадает при этом в осадок (рис. 17). Специфической особенностью растворимой (транспортной) фракции РНК (т-РНК) является способность образовывать комплексы с аминокислотами. При этом для каждой аминокислоты существует специфическая РНК, способная образовывать с ней комплекс. Основная функция т-РНК заключается в связывании аминокислот и переносе их в полирибосомы. Для связи т-РНК с аминокислотой необходима предварительная активация последней специфическими ферментами.

Специфичность трансляции генетической информации в рибосомах определяется связью между кодирующими триплетами и-РНК (кодонами) и комплементарными к ним триплетами молекул т-РНК (антикодонами), что и обуславливает заданное расположение аминокислот в синтезируемом полипептиде.

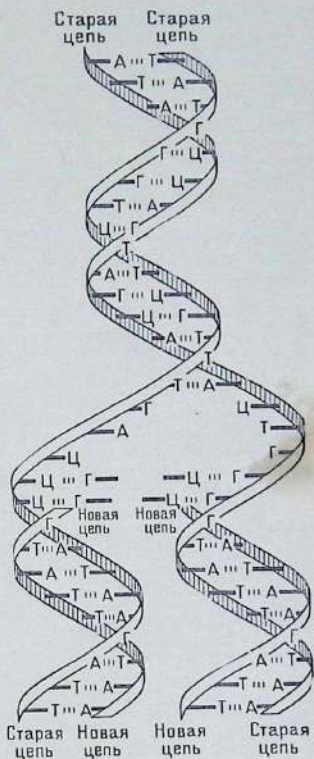


Рис. 16. Схема возможного удвоения ДНК (раскручивание и удвоение происходит одновременно).



Рис. 17. Схема возможных конфигураций и структурных переходов макромолекул высокополимерной РНК в растворе в зависимости от ионной силы и температуры:

a — рыхлый беспорядочный клубок или развернутая цепь (отсутствие солей или повышенная температура); *b* — компактная палочка с более или менее упорядоченно расположенными спиральными участками (низкая ионная сила при низкой температуре); *a'* — компактный клубок со спирализованными участками внутри (высокая ионная сила при низкой температуре)

из продуктов этих реакций, чаще всего конечным. Так, гистидин подавляет синтез нескольких ферментов, участвующих в последовательных реакциях биосинтеза его.

Генетическими исследованиями установлено, что индукция и репрессия — это один из видов генетической регуляции метаболизма клетки. В разработке этой проблемы ведущая роль принадлежит французским ученым Жакобу и Моно. Согласно предложенной ими модели скорость синтеза ферментов в бактериальной клетке контролируется двумя генами — геном регулятором и геном оператором. Взаимодействие между этими генами и генами, определяющими структуру ферментов (структурными генами), удобно рассмотреть на примере усвоения лактозы *E. coli*.

Скорость синтеза ферментов, участвующих в усвоении лактозы (пермеазы, β -галактозидазы и трансацетилазы), зависит от концентрации лактозы в среде и определяется специфическим взаимодействием между геном регулятором и геном оператором. Ген оператор функционирует наподобие замка, включая и выключая синтез ферментов, контролируемых структурными генами, подчиненными оператору. Синтез ферментов подавляется, когда на оператор воздействует репрессор — вещество, структура которого контролируется геном регулятором. Репрессор, обладая сродством к специфическому индуктору, в данном случае лактозе, образует с ней комплекс и при этом уже не может воздействовать на оператор. Следовательно, ключом к гену оператору является репрессор — продукт гена регулятора. Способность гена

Таким образом, реализация генетической информации в бактериальной клетке представляет собой многоэтапный процесс. Первый этап — транскрипция, или «переписывание» генетической информации ДНК в нуклеотидную последовательность молекул и-РНК. Второй этап — трансляция, или перевод генетической информации, записанной в нуклеотидной последовательности и-РНК, в последовательность аминокислот в синтезируемом полипептиде. Второй этап происходит в полирибосомах с участием специфических для каждой аминокислоты молекул т-РНК. Вопрос о том, какой из этих двух этапов реализации информации подлежит контролю со стороны генетического аппарата клетки и каков механизм этого контроля, будет рассмотрен ниже.

Генетическая регуляция биосинтеза бактериальных ферментов. Способность к синтезу, а также скорость синтеза некоторых ферментов может изменяться в широких пределах в зависимости от внутренних и внешних условий. Это явление наиболее ярко выражено у микроорганизмов и называется «ферментативной адаптацией». В основе ее лежат два процесса — индукция и репрессия синтеза ферментов.

При индукции значительно увеличивается скорость синтеза ферментов, катализирующих последовательные реакции превращения определенного вещества, обусловленное присутствием его в окружающей среде. Так, внесение лактозы в среду до определенной концентрации приводит к увеличению скорости синтеза фермента β -галактозидазы в клетках *E. coli* дикого типа в 1000 раз, а пермеазы — в 100 раз по сравнению с исходной. При удалении лактозы из среды исходный низкий уровень синтеза этих ферментов восстанавливается.

При репрессии подавляется синтез ферментов в цепи биохимических реакций одним

оператора включать или выключать синтез зависит от того, в каком состоянии, свободном или связанном с индуктором, находится репрессор.

Согласно гипотезе Жакоба и Моно оператор представляет генетическую структуру, контролирующую синтез переносчика генетической информации (и-РНК) на структурных генах, подчиненных оператору. Синтез молекул и-РНК возможен лишь при условии, если оператор не связан с репрессором.

Существует несколько гипотез, касающихся природы репрессора и механизма его действия на оператор. Допускается, что репрессор-полирибонуклеотид, последовательность оснований которого комплементарна к оператору. Связываясь с оператором, репрессор препятствует синтезу и-РНК. Согласно другой гипотезе репрессор блокирует не транскрипцию, а препятствует переводу генетической информации с и-РНК на белок, то есть блокирует трансляцию.

Что касается природы оператора, то в настоящее время считают, что оператор не самостоятельный ген, а лишь участок проксимального структурного гена оперона.

Ретроторможение, как генетический механизм регуляции активности бактериальных ферментов. Несмотря на то, что многие положения предложенной Жакобом и Моно модели являются гипотетическими и многие вопросы, связанные с проблемой генетической регуляции, еще не разрешены, остается бесспорным и доказанным тот факт, что регуляция синтеза белка в клетке подчинена контролю со стороны генетического аппарата клетки. Но генетическая регуляция, осуществляемая регуляторными генами, — это лишь одна из форм клеточной регуляции синтеза белка. Другая не менее важная форма регуляции, в которой косвенное участие принимают структурные гены, — так называемое подавление конечным продуктом, или ретроторможение. Это явление заключается в избирательном подавлении активности фермента, катализирующего первую степень биосинтеза, конечным продуктом реакции. Ретроторможение широко распространено в природе и касается многих систем биосинтеза клеточных метаболитов. Так, изолейцин специфически подавляет активность 1-треонин-дезаминазы фермента, катализирующего превращение 1-треонина в 1-кетобутират, являющийся предшественником изолейцина (табл. 2).

Таблица 2

Примеры ингибирования первого фермента цепи биосинтеза конечных продуктов (Умбаргер, 1964)

Реакция	Ингибитор	Микроорганизм
1-Треонин → 1-Кетобутират	Изолейцин	<i>E. coli</i>
Аспарат + Карбамилфосфат → Уреидосулфинат	Цитидин-5-фосфат	<i>E. coli</i>
Пируват → α-Ацетолактат	Валин	<i>E. coli</i> <i>A. aerogenes</i>
АТФ + Фосфорибозилпирофосфат → Соединение III	Гистидин	<i>E. coli</i>
Инозин-5-фосфат → Ксаптозин-5-фосфат	Гуанозин-5-фосфат	<i>A. aerogenes</i>
Гуанозин-5-фосфат → Инозин-5-фосфат	АТФ	<i>A. aerogenes</i>
Гомосерин → фосфогомосерин	Треонин	<i>E. coli</i>
N-Ацетилглутамат → N-Ацетилглутамилфосфат	Аргинин	<i>Micrococcus glutamicus</i>
5-фосфошникемат → Антранилат	Триптофан	<i>E. coli</i>
Аспарат → β-Аспартилфосфат	Лизин, треонин	<i>E. coli</i>

Ретроторможение принципиально отличается от рассмотренной ранее репрессии. При репрессии конечный продукт подавляет синтез соответствующих ферментов, воздействуя на генетический регуляторный механизм клетки. При ретроторможении конечный продукт подавляет активность уже синтезированного фермента. Важно отметить, что ингибитор фермента — конечный продукт не является стерическим аналогом субстрата, превращение которого катализируется данным ферментом. Следова-

тельно, действие ингибитора не обусловлено конкуренцией за активный центр фермента, как это бывает между стерическими аналогами. Это заставляет предположить наличие двух активных центров в молекуле фермента, один из которых определяет ферментативную активность в отношении субстрата, а другое химическое превращение катализируется этим ферментом, другой центр обуславливает способность связываться с конечным продуктом. В пользу этого говорят факты, указывающие на возможность тепловой инактивации активного центра фермента, ответственного за связывание с конечным продуктом, без потери ферментативной активности.

Механизм ретроторможения является генетически обусловленным, так как ген, определяющий структуру ингибируемого фермента, должен заключать в себе информацию относительно структуры того и другого активных центров. С этой точки зрения ретроторможение — это механизм клеточной регуляции синтеза, который возник как следствие естественного отбора в направлении наиболее экономичного использования клеточных ресурсов.

Глава 6. ГЕНЕТИКА БАКТЕРИЙ

В течение многих лет бактериологи держались того ошибочного мнения, что явления случайных мутаций и генетических рекомбинаций, наблюдавшиеся в мире высших организмов, не приложимы к микроорганизмам. Их смущала кажущаяся пластичность бактериальных клеток по отношению к вредным факторам внешней среды: температуре, кислотам, щелочам, солям тяжелых металлов и т. д. Они считали, что внешняя среда прямо влияет на многие или все клетки микробной популяции, вызывая у них наследуемую адаптацию (приспособление). Были высказаны соображения, касающиеся механизма адаптации, ныне полностью отвергнутые большинством ученых.

Тем не менее факторы внешней среды влияют на микроорганизмы, вызывая у них временную, ненаследуемую изменчивость, получившую название модификаций, или фенотипических изменений. Они множественны, касаются всей популяции микроорганизмов или большинства ее сочленов и наблюдаются на протяжении действия фактора внешней среды, вызвавшего модификацию, или несколько дольше. Внешней среде принадлежит также роль фактора отбора, или селекции отдельных особей из популяции микроорганизмов, случайно оказавшихся наиболее приспособленными к данным условиям. Эти особи, размножаясь, вытесняют из популяции менее приспособленные микроорганизмы. Наконец, некоторые факторы внешней среды способствуют активированию функций генов, без внешних воздействий гены не проявили бы своего эффекта. Однако наследуемые изменения микроорганизмов происходят главным образом в результате мутаций.

Первое доказательство спонтанного (возникшего самопроизвольно) происхождения мутаций у бактерий было представлено в 1943 г. Лурией и Дельбруком. Их исследования во многом определили становление современной генетики бактерий. Эти ученые доказали, что вторичные фагоустойчивые колонии бактерий, вырастающие на агаре после лизиса фагом клеток фагочувствительных культур, возникают из фагорезистентных мутантов, присутствовавших в популяции до воздействия на нее фагом. Они также установили частоту спонтанных мутаций. В 1952 г. Д. Ледерберг и Э. Ледерберг подтвердили открытие Лурии и Дельбрука, применив для изоляции различных мутантов метод реплик.

В 1928 г. Гриффит наблюдал явление трансформации бактерий, которая, как впоследствии было доказано, обусловлена ДНК (Эвери, Мак-Леод, Мак-Картни, 1944). В 1946 г. Ледерберг и Тетум открыли конъюгацию бактерий, а в 1952 г. Циндер и Ледерберг — трансдукцию. Одновременно были изучены основные свойства лизогенных бактерий и сформулированы представления о профаге (Львов, 1952). В 1952 г. Крик и Уотсон создали пространственную модель ДНК и этим выясняют структурные особенности материального носителя генетической информации. В 1954 г. Гамов высказал предположение о структуре кода ДНК, полагая, что комплекс из трех азотистых оснований — триплет, или кодон, соответствует одной определенной аминокислоте.

В 1959—1961 гг. Бензер изучил тонкую структуру гена фага T4. В r_{11} — области генома этого фага обнаружены два цистрона, состоящие из единиц рекомбинации —

реконов и точек мутации — мутонов. Примерно в это же время устанавливаются некоторые детали тонкой структуры отдельных генов кишечной палочки и сальмонелл. В 1967 г. Корнбергу удалось синтезировать искусственную ДНК и в тот же период Очоа с соавторами создают искусственную РНК. В 1961 г. Жакоб и Моно сформулировали представление о генах операторах, генах регуляторах и структурных генах.

Существенный вклад в изучение генетики бактерий и вирусов внесли советские исследователи: Г. А. Надсон, Г. С. Филиппов, Д. Ф. Петров, В. Д. Тимаков, А. Г. Скворонская, Д. Г. Кудлай, С. И. Алиханян, А. С. Кривисский, С. Е. Бреслер, Д. М. Гольдфарб, Н. П. Дубинин, Н. Н. Жуков — Вережников, Ю. З. Гендон, А. П. Пехов.

Материальная основа генетической информации, передача ее и изменения

В настоящее время известны лишь два биохимических вещества, ответственных за хранение и передачу наследственной информации от родительских клеток их потомкам. Это нуклеиновые кислоты: ДНК и РНК. Они обладают свойством «записывать» генетическую информацию, хранить ее, «передавать» другим молекулам нуклеиновых кислот. Способны к саморепродукции, то есть к самовосстановлению или саморепликации, или просто к репликации, и к переходу из одной клетки в другую. Обеспечивают контроль за образованием белков и ферментов внутри клеток, за активностью, скоростью и специфичностью многих биохимических процессов, протекающих внутри и вне клеток. Известно, что наследуются (передаются по наследству из поколения в поколение) генетические детерминанты или генетическая информация.

Принято считать генотипом или геномом сумму всех генетических детерминантов, которыми располагает клетка, и которые она получила по наследству от своего родителя. Материальным носителем, как указывалось, являются нуклеиновые кислоты, состоящие из генов, поэтому генотипом можно назвать сумму генов, которыми располагает живое существо. Важно подчеркнуть, что по наследству передаются не сами особенности индивида, а лишь материальная основа к их проявлению — нуклеиновые кислоты и записанная в них сумма морфологических признаков и физиологических функций. Они раскрываются и формируются под влиянием факторов внешней среды, что получило название фенотипа.

Генотип наследуется, фенотип не наследуется. Он лишь проявляется внешней средой. Различные внешние условия вызывают разные фенотипы, то есть модификации фенотипов. Генотип тоже подвержен изменениям. В основном это мутации, которыми называют молекулярные изменения в отдельных генах хромосомы бактериальной клетки. Они случайны, ненаправлены и, как правило, редки: происходят чаще в одной клетке из 10 млн.

Кроме мутаций, ведущих к изменению генотипа, у некоторых бактерий наблюдается еще передача генетической информации от донорской клетки с одним генотипом реципиенту с другим генотипом. Она осуществляется принципиально четырьмя различными способами: трансформацией, трансдукцией, конъюгацией и фаговой конверсией

(см. соответствующие разделы). Первые три способа завершаются объединением генетического материала донорской бактерии с геномом реципиентной клетки и немедленной его перетасовкой — рекомбинацией. При этом донорская информация не просто приплюсовывается к информации реципиентной клетки, а определенным образом замещает ее. Фаговая конверсия характеризуется передачей материала наследственности с помощью эписомы — нехромосомной ДНК. Она, как и другие эписомы, является примером добавления генетической информации (ДНК) к информации (ДНК) реципиентной клетки. Рекомбинации ДНК и признаков не наблюдается. Более того, вновь обретенные реципиентной клеткой изменения регистрируются только до тех пор, пока фаговая эписома (ДНК) находится в цитоплазме реципиентной бактерии. Других самореплицирующихся детерминантов носителей генетической информации у бактерий не найдено.

Эволюция взглядов на изменчивость бактерий

Французский биолог Ламарк (1744—1829) создал учение о наследуемости приобретенных признаков. Этот ошибочный взгляд в свое время был распространен на весь живой мир. Но особенно долгое время он удерживался в микробиологии. Считали, что микроорганизмы крайне податливы влиянию внешних условий. Они легко приспосабливаются, адаптируются к ней, создавая новые варианты, типы и даже виды живых одноклеточных существ. Этому представлению особенно способствовали длительные модификации, возникающие под влиянием факторов внешней среды и еще продолжающиеся некоторое время после их устранения. Они создавали иллюзию наследственно закрепленной изменчивости, индуцированной средой, являясь в действительности фенотипической модификацией в современном понимании.

С удивительной легкостью адаптацией объяснялся ранний феномен Нейсера и Массини (классический пример спонтанной мутации биохимических свойств кишечной бактерии); явление диссоциации по типу $S \rightleftharpoons R$; фазовые вариации антигенных свойств и многие другие явления изменчивости, наблюдаемые у микроорганизмов.

Ныне все эти и другие факты нашли свое научное объяснение. Ламаркизм и в этой последней области биологии был отвергнут. Современная генетика утверждает, что в основе многих (но далеко не всех) явлений изменчивости лежат мутации, независимые от условий внешней среды. Среда лишь случайно отбирает из них наиболее к ней приспособленных.

Мутации

Имеются различные определения мутаций. Определение, сформулированное Н. П. Дубининым (1967), нам представляется наиболее полным. *Под мутацией он понимает молекулярные изменения в отдельных генах, изменения в числе или структуре хромосом.* Пригодно и такое определение: мутации это спонтанные или индуцированные ненаправленные молекулярные изменения в ядерной и эписомной нуклеиновых кислотах, ведущие к изменению генотипа микробной клетки.

Мутации, как правило, основная причина изменчивости всего живого. Возникают они с частотой $1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-10}$ на одну бактерию на одну генерацию. Следовательно, из 10 тыс. или 10 млрд. клеток лишь одна будет мутантной. У бактерий наиболее часты г е н н ы е м у т а -

ции, изменяющие любой признак особи; в редких случаях наблюдают делеции, инверсии и дупликации.

Делеции — утраты целого сегмента хромосомы или значительной части одного гена. Они тоже ведут к мутациям. Делеции не ревертируют (не возвращаются) в исходное положение и не рекомбинируют с соответствующими участками хромосом в том случае, если они (делеции) обширные и перекрывают друг друга. Не рекомбинируют и мелкие, но идентичные делеции. В этом случае они ведут себя аналогично любым идентичным мутационным изменениям. Делеции отмечают не только у бактерий, но и у фагов.

Инверсии — нарушение порядка генов, допустим, АВСДЕ на АВЕДС.

Дупликации — удвоение участка хромосомы.

Бактерии, несущие мутации, получили наименование **мутантных** в отличие от их исходных штаммов, названных **дикими**.

В некоторых случаях мутантные формы могут вернуться к исходной родительской форме (обратная мутация). Иногда за счет мутации в другом гене наступает реверсия к родительскому (дикому) типу (супрессорная мутация). Реверсия может возникнуть в результате мутации в том же гене, что и прямая, но в другом участке (внутригенная супрессия).

Исход мутации зависит от природы мутагенного агента, вида микроорганизма, окружающих условий. Иногда мутации благоприятны для микроорганизма, но в основном они вредны для него или даже вызывают летальный исход.

Методы обнаружения мутантных клеток в популяции. Метода выявления отдельно взятой (единичной) мутантной клетки не существует. Однако ее размножение с образованием клона уже позволяет выявить мутантную культуру, накопить ее и изучить свойства. Для выявления и выделения клона мутантных клеток чаще используют плотные питательные среды (применяют и жидкие среды).

Известно много методов обнаружения мутантов. В данном разделе приводятся некоторые из них, рассчитанные на обнаружение в культуре бактерий фагоустойчивых или антибиотикорезистентных мутантных клеток, возникших спонтанно до обработки микроорганизмов фагом или антибиотиками, а не вследствие адаптации к ним после их воздействия.

Метод Ньюкомба. Культуру чувствительных к фагу бактерий высевают на восемь чашек с агаром. Выращивают при 37° до появления микроколоний. Затем в четыре чашки добавляют немного физиологического раствора и колонии растирают шпательом на поверхности агара (остальные чашки остаются контрольными). После этого все чашки орошают фагом, ставят в термостат и через несколько часов подсчитывают число колоний, образовавшихся из выживших устойчивых к фагу бактерий.

Результат оказывается следующим: в контрольных клетках, в которых микроколонии не растерлись, а среди них не растерлись и состоящие из мутантных фагорезистентных клеток, число фагоустойчивых колоний будет небольшим. В других четырех чашках с распределенным посевом и в том числе и из бактерий, устойчивых к фагу, количество выросших фагорезистентных колоний будет значительным, ибо из каждой растертой микроколонии, состоящей из фагорезистентных бактерий на чашках после их обработки фагом адаптировалась к нему, то число фагоустойчивых колоний в опыте и контроле было примерно одинаковым.

Подобным образом в культуре бактерий можно обнаружить и стрептомицинорезистентные клетки.

Флуктуационный тест Лурья и Дельбрука. Культуру, чувствительную к фагу, рассеивают в 12 пробирок с жидкой средой. Посевы выращивают до определенной густоты и ими засевают чашки с агаром, содержащим фаг; из каждой пробирки одну чашку. Всего 12 чашек. После инкубирования чашек в термостате подсчитывают число колоний в каждой из них, а затем выводят среднеарифметическое. Как правило, в каждой чашке вырастает различное, отличающееся большим диапазоном число фагорезистентных колоний или их вообще не будет. Это происходит потому, что при рассеивании культуры в жидкую среду в одни пробирки попадает одна или несколько мутантных фагорезистентных клеток, в другие нет. Поэтому при выращивании посевов в пробирках разовьются тем больше фагорезистентных клеток, чем больше их попало при засеивании. Подсчет ведут выросшим фагорезистентным колониям.

Одновременно аналогичные посевы из исходной культуры делаются из одну пробирку с жидкой средой. Ее выдерживают в термостате до получения плотности роста, равного концентрации бактерий в каждой из 12 пробирок, так называемой независимой культуры. Затем из этой пробирки засеивают 12 чашек с агаром и фагом. После выдерживания чашек в термостате подсчитывают выросшие на них фагорезистентные колонии. Их будет примерно равное число в каждой чашке, так как в каждую попадает относительно одинаковое количество фагорезистентных клеток. Колебания флуктуации в содержании устойчивых к фагу клеток в образцах, отобранных из одной культуры, будет значительно менее выражено, чем в пробах из независимой культуры. Среднеарифметические данные опыта и контроля можно обработать по критерию Хи квадрат и этим установить достоверность полученных результатов.

Флуктуационным тестом обнаруживают в культуре мутантные клетки, устойчивые к различным антибиотикам, радиации, обладающие различной антигенностью или различными биохимическими свойствами, или потребностями в факторах роста.

Метод реплик Дж. Ледерберга и Э. Ледерберга. На чашку с агаром высевает фагочувствительную культуру бактерий, содержащую фагорезистентные мутантные клетки. Образовавшиеся колонии снимают на обтянутой бархатом штамп, диаметром несколько меньшим диаметра чашки, путем легкого прижатия к выросшей культуре. Вместе с фагочувствительными клетками на ворсе бархата оказываются и фагорезистентные. После этого штампом делают отпечаток на поверхности агара в чашках с фагом. Чашки ставят в термостат. Вырастают колонии фагорезистентных бактерий, причем территориально в тех местах, в которых они были на исходной чашке без фага. Метод реплик с успехом применим для выделения чистой культуры мутантных клеток с различными свойствами.

Пенициллиновый метод Гольдштейна широко применим в генетике. Добавление к минимальной среде (среда без определенного фактора, на которой не может развиваться так называемый ауксотрофный мутант) пенициллина позволяет выявить ауксотрофных мутантов в культуре диких бактерий. Последние, делаясь, будут убиты пенициллином, а не делящиеся ауксотрофы останутся живыми. Таким способом можно повысить концентрацию ауксотрофов в жидкой среде в 100 и более раз. Последующий высеивание пенициллиновой культуры на полную среду, содержащую необходимый фактор роста для ауксотрофа, позволит получить его культуру. Во всех описанных случаях фаг и пенициллин играют роль селекционирующих факторов, способных выявить и отобрать мутантные клетки из популяции дикой культуры.

Частота мутаций. Известно, что частота спонтанных мутаций невелика и колеблется в широких пределах (от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-10}$). В принципе она определяется как вероятность мутации на один цикл деления одной клетки. Из этого правила существуют исключения. Имеется ряд методов определения частоты мутаций.

Браун (1968) считает, что наиболее простой из них основан на флуктуационном тесте с использованием сред, содержащих селективные агенты, подавляющие рост родительских клеток и не влияющих на рост мутантов. Автор так описывает его.

В серии независимых культур, выращенных из небольшого числа исходных клеток, после обработки селективным агентом, определяют количество культур с мутантными клетками и без них. Для этого обычно переносят содержимое каждой пробирки с культурой на чашку с питательным агаром, содержащим селективный агент (фаг, стрептомицин и др.), и подсчитывают число чашек, на которых после инкубации выросли колонии. При данном методе фактическое число мутантов в каждой культуре, то есть число выросших на чашке колоний, не имеет значения, им можно пренебречь и тем самым исключить возможные ошибки, связанные с тем, что мутанты, отличаясь от клеток дикого типа скоростью роста, могут отличаться от них по своей селекционной ценности. Единственным критерием, используемым для расчета частоты мутации, является регистрация возникновения или отсутствия в культуре мутаций. Чтобы оценить частоту мутаций (a) на одну бактерию на одну генерацию, достаточно знать среднее число клеток в культуре во время посева (обработки фагом и т. д.) и долю (%) культур, не содержащих мутантных клеток. Расчет производится по формуле Лурья и Дельбрука: $a = (1/n^2) (1/nP) N$, где P — доля культур, не содержащих мутантов; N — среднее число бактерий в культуре в конце инкубации; $1/n^2$ — коэффициент поправки на среднее число клеток в популяции, равный 0,6931.

Этот метод позволяет отличить частоту мутаций от частоты мутантных клеток. «Спонтанные» мутации редки, индуцированные экспериментально возникают чаще на один, два и даже три порядка. Описаны микроорганизмы с частотой мутации от 1,3 до 15%. «Спонтанные» резистентные к фагу T_5 мутанты кишечной палочки возникают с частотой $0,74 \cdot 10^{-7}$, индуцированные теофилином — $11,4 \cdot 10^{-7}$, «спонтанные» фазорезистентные мутанты золотистого стафилококка к пенициллину появились с частотой $1 \cdot 10^{-7}$, к стрептомицину — $1 \cdot 10^{-9}$.

Частота делеции низка, хотя в различных областях хромосомы они встречаются с разной частотой. Так, из 279 мутантов сальмонелл, нуждающихся в гистидине, делеции обнаружены лишь у восьми; из 38 мутантов по пролину — у шести; из семи мутантов по цистину — у одного и т. д. Делеций вовсе не было среди 120 мутантов по лейцину, среди 37 — по треонину и т. д. (Хейс, 1965). Обнаружены штаммы кишечных бактерий и сальмонеллы мышинного тифа, у которых частота спонтанных мутаций различных генов может на три порядка превышать обычную частоту. Оказалось, что это качество контролируется особым локусом — *mut* (ген мутатор). Ген мутатор ответствен за все изменения, происходящие в ДНК микробной клетки.

Проявление мутаций. В разделе роста и размножения сообщалось, что, как правило, деление ядра опережает деление клетки, вследствие чего образуются многоядерные бактерии. Отсюда, бактерия, в одном ядре которой произошла мутация, становится гетерокарионом, в отличие от предшествовавшего состояния с одинаковым ядром гомокариона.

В случае доминантной мутации она проявится в гетерокарионе сразу после изменения одного ядра, но накопление мутантов в куль-

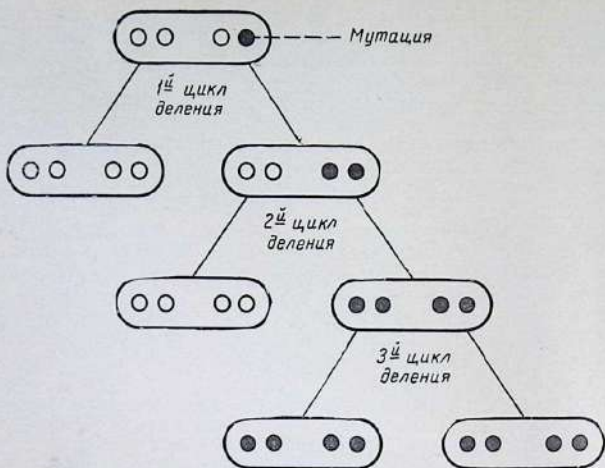


Рис. 18—19. Выщепление мутантных ядер у многоядерных бактерий (светлые кружки — ядра дикого типа; черные — мутантные ядра).

туре начнется лишь после того, как все ядра мутантной клетки станут мутантными, то есть когда она превратится в мутантный гомокарцион. Для этого нужен определенный период. Его продолжительность зависит от числа ядер в клетке. У четырехядерной клетки с доминантной мутацией на это уйдет два цикла деления (или три с момента мутации), прежде чем все ядра станут мутантными и в культуре начнут накапливаться мутантные клетки (рис. 18—19). Эта задержка получила название сегрегационного лаг-периода. Если мутация будет рецессивной, то сегрегационный лаг-период будет таким же, но мутация проявится не сразу, как в первом случае, а лишь после второго деления клетки, когда два из четырех доминантных (диких) ядер уйдут к одной дочерней клетке, а другая клетка с двумя рецессивными ядрами станет мутантным гомокарционом. Задержка в проявлении приобретенного признака называется фенотипическим лаг-периодом (Хейс, 1965).

Фенотипический лаг-период иногда удлиняется на одно или несколько лишних делений по другим причинам: для освобождения от продуктов жизнедеятельности, с избытком накопленных в клетке под влиянием деятельности нормального — дикого, доминантного гена или для сбрасывания фагорецепторов мутантной резистентной клеткой и др. В силу указанного часто ауксотрофные мутанты еще некоторое время растут на минимальной среде, а фагорезистентные мутанты

бактерий адсорбируют на своей поверхности фаг на протяжении 12 циклов деления. Это последнее происходит потому, что синтез рецепторов мутантной клеткой прекращается, а старые рецепторы еще удерживаются и переходят к дочерним клеткам. Удлиняют фенотипический лаг-период ультрафиолетовое облучение, время затрачиваемое на синтез РНК и ДНК.

Некоторые факторы могут затруднять определение числа мутантных клеток в популяции.

Часто бактерии дикого штамма настолько сильно угнетают размножение мутантных клеток, что серьезно искажают истинную частоту мутации. Это, в частности, наблюдалось у стрептомицинрезистентных мутантов под влиянием их стрептомицинчувствительной культуры. Иногда при постановке флуктуационного теста на селективных средах, помимо мутантных клеток, в небольшом количестве остаются также дикие клетки. Они могут дать дополнительные мутации и этим изменить истинную частоту мутации.

Определение частоты мутаций по критерию одна бактерия на одну генерацию приемлемо для быстро делящихся клеток, когда репликация ДНК точно коррелирует с делением ядра и самой клетки. Если же время генерации клеток удлиняется и перерастает некоторую критическую величину (для кишечной бактерии более двух часов), то частота мутаций становится в зависимость от времени их культивирования. Поскольку теперь доказано, что репликация ДНК происходит уже в покоящихся клетках, то и мутации могут возникать в покоящейся популяции бактерий.

Мутагены и молекулярный механизм мутагенеза. Вещества, повышающие частоту мутаций, названы мутагенами, а процесс формирования мутантов — мутагенезом. Самопроизвольно возникающие мутации именуют спонтанными, вызванные экспериментатором с помощью мутагенов — индуцированными. В настоящее время большинство генетиков находят такое деление нецелесообразным, так как все мутации индуцированы мутагенами и «без ничего» не возникают. Все же оба термина еще удерживаются в литературе. Мы ими также будем пользоваться. Это по ряду соображений оправдано. Например, в отличие от спонтанной низкочастотной, индуцированная мутация высоко частотна. Отдельные мутагены повышают частоту мутаций в 100 000 раз.

В принципе все мутагены должны изменить порядок или число нуклеотидов в ДНК. Однако различные мутагены по-разному приводят к такому эффекту. Именно этим они и отличаются друг от друга. Любое вещество, предупреждающее мутацию или снижающее ее частоту, называют антимутагеном. Каталаза, пуриновые нуклеозиды — активные антимутагены.

Различают химические и физические мутагены.

К химическим мутагенам относят неорганические кислоты, щелочи, соли аммония, перекиси, органические кислоты, формальдегид, фенолы, производные мочевины, красители, некоторые канцерогены, алкилирующие агенты (диметил, диэтилсульфат), акри-

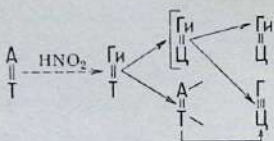


Рис. 20. Дезаминирование. Замена в ДНК пары оснований А : Т на пару оснований Г : Ц, вследствие дезаминирования аденина и превращения его в гипоксантин (Ги) (скобкой отмечена мутация).

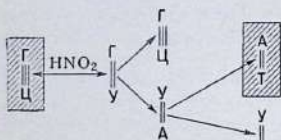


Рис. 21. Схема дезаминирования цитозина (образуется урацил тяготеющий к аденину).

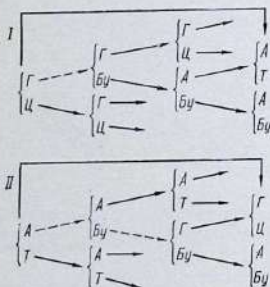


Рис. 22. Индукция простых замен пар оснований ДНК под влиянием 5-бром урацила (Freese, 1962) на модели *S. typhimurium*.

пару А : Т (рис. 21). В итоге азотистая кислота вызывает простые замены пар оснований А : Т → Г : Ц и Г : Ц → А : Т; при этом последняя замена наблюдается в 3—6 раз чаще первой.

Действие аналогов азотистых оснований. В целях изучения генетических свойств ДНК довольно широко исполь-

дины, йод, азотные аналоги иприта, аналоги пуринов и пиримидинов, нагревание, кислая реакция среды (рН = 4) и др.

Физические мутагены. Все виды радиации с длиной волны менее 4000 Å мутагенны. Наиболее изучены ультрафиолетовый свет, лучи Рентгена, температура.

Многие мутагены — перекиси, формальдегид, аденин, как и антимуагены — каталаза, аденозин, образуются *in vivo* в результате нормальных физиологических реакций.

Молекулярный механизм мутаций. В настоящее время молекулярные механизмы мутаций известны для ряда мутагенов. Наиболее существенные из них следующие.

Дезаминирование. Применение в качестве мутагена азотистой кислоты вызывает в ДНК эффект дезаминирования азотистых оснований, то есть утраты ими аминной группы (NH₂). В результате аденин превращается в гипоксантин, гуанин — в ксантин, а цитозин — в урацил. Дезаминирование гуанина, и вследствие этого превращение его в ксантин, не приводит к мутации потому, что ксантин сходен с гуанином по водородным связям, ответственным за спаривание оснований. Дезаминирование аденина приводит к образованию гипоксантина, комплементарного цитозину, при этом пара А : Т превращается в пару Ги : Т. В следующих двух циклах репродукции ДНК происходит замена оснований и превращение А : Т в Г : Ц (рис. 20).

Дезаминирование цитозина в урацил приводит к спариванию урацила с аденином и к замене пары Г : Ц на

зуются структурные аналоги естественных азотистых оснований ДНК — 5-бромурацил (Бу), 2-аминопурин и др.

5-бромурацил в стабильной кето-форме является аналогом тимина и поэтому легко спаривается с аденином. Иногда он переходит в нестойкую энольную форму, близкую к цитозину, и тогда спаривается с гуанином. Спаривание 5-бромурацила с гуанином, чаще после двух циклов репликации, приводит к образованию мутантного гена, в котором пара Г : Ц заменяется на А : Т или А : Бу (рис. 22, I). Такую мутацию называют ошибкой включения. Спаривание 5-бромурацила с аденином не приводит к мутации, ибо не изменяет функции ДНК. Однако при следующей репликации 5-бромурацил спаривается с гуанином, и это уже дает стойкую мутацию. Она названа ошибкой репликации, при ней пара А : Т перешла в Г : Ц (II).

Оба примера с 5-бромурацилом — свидетельство простых замен пурина на пурин и пиримидина на пиримидин, следствием которых явилась взаимная замена пар А : Т ↔ Г : Ц. Однако чаще 5-бромурацил вызывает переход Г : Ц → А : Т.

Аналогичный мутагенный эффект наблюдают от применения 2-аминопурина.

Возможны сложные, или перекрестные, замены: пурина на пиримидин и пиримидина на пурин. Это происходит при потере пурина или пиримидина. Тогда на место утерянного пурина может встать любой пиримидин и соответственно на утраченный пиримидин — пурин. Все это закончится заменой пары А : Т на Т : А или Ц : Г (рис. 23).

Действие акридинов. Если акридин включился в синтезирующую нить ДНК, то через один цикл репликации наступит выпадение мононуклеотида, место которого занимал акридин, и одна нить ДНК уменьшится. При включении акридина в матричную нить ДНК напротив произойдет вставка лишнего мононуклеотида на место, занимаемое акридином, и соответственно одна нить ДНК удлинится (рис. 24).

И в том и в другом случае произойдет смещение ряда нуклеотидов в пределах гена, это нарушит порядок триплетов, следующих за точкой мутации, что приведет к изменению контролируемого данным геном признака. Дефект от выпадения нуклеотида можно устранить близлежащей вставкой нуклеотида, а вставку исправить потерей нуклеотида. В обоих случаях порядок нуклеотидов будет «испорчен» лишь в пределах от вставки до утери нуклеотида. На остальном протяжении нить ДНК и синтезируемая на ней нить и-РНК будут нормальными, что обеспечит и нормальное расположение аминокислот в образующейся полипептидной цепи.

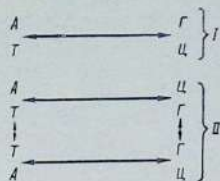


Рис. 23. Возможные замены пар оснований ДНК (Freese, 1962):

I — простые замены; II — перекрестные замены.

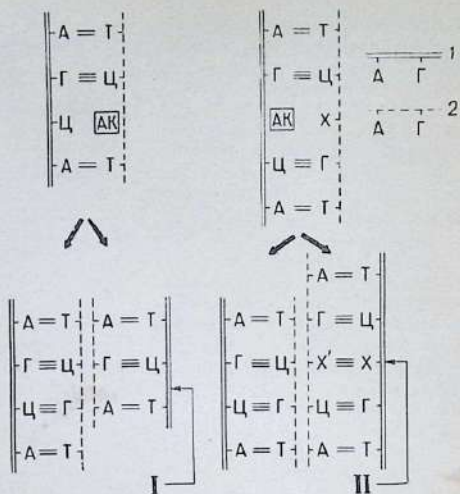


Рис. 24. Схема внутригенных перестроек — выпадения (I) и вставки (II) нуклеотидов; последствия включения акридина в ДНК:

1 — матрица, 2 — синтезируемая нить (копия)

Алкилирование — процесс введения в органические соединения остатков углеводов: метила, этила, пропила и др. Этилирование гуанина этилэтансульфонатом приводит к утрате данного азотистого основания, место которого может быть занято другим некомплементарным азотистым основанием. Это в процессе репликации вызовет замену пары Г : Ц на А : Т. Возможно алкилирование аденина и превращение пары А : Т в Г : Ц. Выпадение гуанина может закончиться и перекрестными заменами, о которых говорилось выше. Этилэтансульфонат, вступая в реакцию с фосфатными группами ДНК, может привести к разрывам ее нити, к потере участков, оказавшихся между разрывами, и, следовательно, к внутригенным и межгенным перестройкам.

Выраженным мутагенным эффектом обладают формальдегид, перекиси и прежде всего перекись водорода.

Действие радиации. Влияние различных излучений на бактериальные клетки может привести к летальному эффекту или к мутациям. Летальный эффект связывают с первичным повреждением радиацией ДНК клеток. Установлено, что проникающая радиация (гамма-лучи, лучи Рентгена) тормозит синтез ДНК, приводит к ее

деполимеризации, угнетает функцию других клеточных систем, участвующих в биосинтезе белка. Это и является причиной гибели клеток.

Ультрафиолетовые лучи временно ингибируют функцию ДНК, но биосинтез РНК и белки непосредственно после облучения как будто не страдают. Под влиянием ультрафиолета в ДНК могут произойти изменения оснований, разрывы водородных и фосфорно-эфирных связей. Разрыв водородных связей в отдельных местах внутри спирали ДНК приводит к тому, что тиминные основания, теперь тесно соприкасаясь друг с другом, образуют **т и м и н о в ы е д и м е р ы**, обуславливая перекрестную сшивку нитей ДНК (рис. 25). Она утрачивает способность реплицироваться. Помимо этого, возникают очаги локальной денатурации нитей ДНК. Клетка с таким ядром не может размножаться, она погибает. Летальный исход может быть предотвращен световой или темновой реактивацией (А. Г. Скавронская).

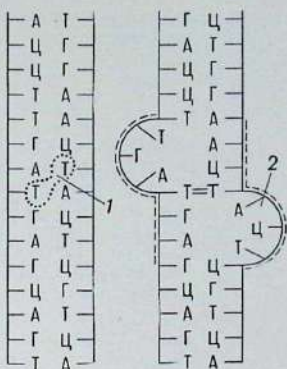


Рис. 25. Модель, объясняющая формирование сшивки и локального денатурированного участка в ДНК под влиянием ультрафиолетового облучения:

1 — тимины, образующие сшивку;
2 — локальный денатурированный участок (А. П. Савин и Г. Б. Завильгельский, 1965).

Клетка располагает ферментами (или комплексом ферментов), способными расщепить тиминные димеры на исходные мономеры, и этим восстановить функцию ДНК. Однако эти ферменты связываются с поврежденной частью ДНК и инактивируются. Световое облучение активирует комплекс фермента, он приобретает возможность расщепить тиминные кольца и вернуть ДНК ее возможность к репликации. При темновой реактивации тиминные димеры удаляются из состава ДНК, и ее функция восстанавливается. Это тоже происходит под влиянием имеющегося в бактериальной клетке фермента, активирующегося в темноте. Если радиационные воздействия на бактериальные клетки умеренны и они вызвали незначительные изменения в ДНК, то такой эффект может закончиться мутацией.

Для некоторых мутагенов есть такие точки в ДНК, которые поражаются чаще других (**горячие точки**). Имеются они почти в каждом изученном гене и являют собой своеобразную внутригенную специфичность. Существуют мутагеностабильные участки ДНК, в которых мутации возникают реже. У сальмонелл мутагеностабильные участки занимают 60%, у кишечной палочки — 15% протяженности ДНК.

Некоторые химические мутагены индуцируют мутации только в определенных участках (сайтах) того или иного локуса и ни в каких

других. Подобные мутагены могут иметь большое практическое значение при получении бактерий с заданными свойствами.

В изучении тонкой структуры гена бактерий и фагов определенную роль играют делеции.

Типы мутантов

Мутанты, устойчивые к стрептомицину и пенициллину. Если стрептомициночувствительную культуру бактерий (Ss) высеять на агар, содержащий определенную концентрацию стрептомицина, то погибнут не все бактерии. Часть из них окажется мутантной, стрептомицинорезистентной (Sg). Она вырастет на агаре. Выяснилось, что в культуре Ss-бактерий могут оказаться особи с небольшой, средней или значительной устойчивостью к стрептомицину. Встречаются и зависимые (Sd) от этого антибиотика мутанты.

Оказалось, что разная Sg, как и Sd, объясняется мутациями в различных участках генома бактерий. Частота Sg мутантов $1 \cdot 10^{-9}$.

Устойчивость бактерий к пенициллину, как и к стрептомицину, ауреомицину, хлорамфениколу, неомицину, тетраамицину и, вероятно, другим антибиотикам, увеличивается ступенчато. Поэтому для формирования пенициллинрезистентных мутантов необходимы последовательные посевы культуры на среды с постоянно и нерезко возрастающим количеством антибиотика. Это приведет к многоступенчатости мутации. Каждая из них повышает антибиотикорезистентность примерно в геометрической прогрессии: к двум, четырем, восьми и т. д. единицам действия пенициллина. Как и в примере со стрептомицином, ступенчатость объясняется мутациями в разных точках ДНК. Чтобы избежать формирования антибиотикорезистентных штаммов в процессе лечения, целесообразно начинать его с больших доз и комбинации взаимодействующих антибиотиков.

Ауксотрофные мутанты. Ауксотрофность — потребность микроорганизма в определенных факторах роста: в витаминах, аминокислотах, нуклеиновых основаниях, а также других органических соединениях, без которых данный мутант расти не может и которые сам не синтезирует.

Для выявления ауксотрофов применяют так называемые *минимальные среды* без данного фактора роста. На них ауксотроф не размножается и проявляет рост лишь после добавления требуемого метаболита. Чаще ауксотрофов выявляют методом реплик. Культуру с различными клонами клеток, в том числе и ауксотрофами, высевают на *полную среду* в чашки Петри, содержащую все необходимые метаболиты. На ней вырастают прототрофы и ауксотрофы. Затем бархатной печаткой снимают колонии и наносят их на минимальную среду в чашки Петри. Ауксотрофы на ней не растут и остаются в виде пятна неделящихся клеток либо дают слабый рост. Отсеивая их с полной среды на среду, содержащую данный метаболит, получают популяцию ауксотрофа. Таким методом изолируют ауксотрофные мутанты дрожжей, нейроспоры и других одноклеточных микроорганизмов.

Используют также способ обогащения популяции ауксотрофами

пенициллином. Его добавляют к минимальной питательной среде, на которой прототрофы растут, а ауксотрофы не растут, но и не погибают. Пенициллин убивает только делящиеся клетки прототрофов и этим способствует накоплению ауксотрофов в культуре, часто в 100 и более раз. Найдены ауксотрофные штаммы кишечной палочки с потребностью в метионине, гистидине, треонине, в витаминах (биотине, тимине и др.), среди ауксотрофов возбудителя мышинного тифа потребность выявлена к 17 факторам. Некоторые штаммы нуждались в двух, трех и более факторах роста.

Имеются сообщения о понижении или полной утрате ауксотрофными мутантами вирулентности, реже о повышении ее. Мутанты возбудителя ложного сапа, зависящего по пурину, и мышинного тифа по аденину утрачивали вирулентность, лецитинзависимые мутанты повышали вирулентность.

Ферментативные мутанты характеризуются утратой или приобретением ферментативной активности в отношении сахаров и многоатомных спиртов, используемых для извлечения энергии. Изолируются на соответствующих селективных средах, содержащих в качестве источника углерода определенный углевод или многоатомный спирт. Например, лактозообразующие мутанты (Lac^+) кишечной бактерии из лактозонегативной культуры (Lac^-) выявляются на среде с лактозой даже в том случае, если единичные Lac^+ мутанты находятся среди 10^{-8} — 10^{-9} Lac^- клеток. Известны мутанты кишечной бактерии штамма К-12, неспособные сбраживать лактозу, мальтозу, галактозу. Их изоляция проводится иным способом.

Морфологические мутанты затрагивают жгутики, фимбрии (бахромки), споры, клеточную оболочку. У сальмонелл обнаружены гены, ответственные за образование жгутиков, гены, контролирующие биосинтез белка жгутиков, флагеллина, антигенную специфичность жгутиков и форму их. Мутации лишают бактерий жгутиков или их качественного состояния. Описаны мутанты, лишенные фимбрий, спор, утратившие частично или полностью оболочку. Последнее привело к образованию сферопластов, протопластов и L-форм (см. анатомию бактерий). У листерий мутации приводили либо к утрате жгутиков, либо к потере подвижности.

Мутации, изменяющие форму колоний. Часто, но не всегда, мутации изменяют форму колоний и одновременно морфологию бактерий, их биохимические, а нередко вирулентные и антигенные свойства. Классическим примером могут служить M-(слизистые, мукоидные), S-(гладкие), R-(шероховатые) и O-промежуточные типы колоний сальмонелл. Долгое время они считались стадиями жизненного цикла развития, именовавшегося диссоциацией, развивающейся в направлении $M \rightarrow S \rightarrow O \rightarrow R$ или $S \rightarrow O \rightarrow R$, или просто $S \rightarrow R$, или $S \rightarrow R \rightarrow M$. Описаны также g-мелкие колонии, состоящие из мельчайших зерен, D-колонии, содержанием которых являются дифтероидные формы и, наконец, L-формы.

Диссоциация по линии $S \rightleftharpoons R$ для сальмонелл закономерно сопровождается снижением или утратой типичной морфологии бактерий, их

вирулентности, серологических и биохимических свойств и восстановлением перечисленных особенностей при $R \rightarrow S$ развитии. Если R -форма типична для данного возбудителя, например *P. pestis*, то ее «переход» в S -форму сопровождается утратой типичной морфологии, вирулентности и других свойств. При возврате S - в R -форму морфология и все ее свойства восстанавливаются.

В настоящее время доказано, что подобные изменения являются следствием вытеснения из популяции исходного типа клеток мутантами, обладающими селективными преимуществами. Помимо мутационного происхождения, описанные изменения могут быть вызваны фагом или профагом (см. ниже), также некоторыми факторами внешней среды. В последнем случае они имеют характер временных фенотипических изменений.

Возбудитель туберкулеза изменяет вид и пигментацию колоний в зависимости от состава питательной среды, присутствия или отсутствия глицерина, изменения рН. S -форма возбудителя бруцеллеза на среде с пенициллином образует либо шероховатые, либо слизистые колонии. Изъятие из среды антибиотика восстанавливает гладкие формы колоний.

Возбудитель брюшного тифа при 20° образует капсулу, не появляющуюся при культивировании при 37° .

Мутанты с измененной антигенностью. Антигенная изменчивость, связанная с R , S , O и другими типами колоний, а также фаговые вариации H -антигена известны давно. Однако их генетическое происхождение выяснено сравнительно недавно. Чаще оно носит мутационный характер, реже обусловлено конверсией. Известно, что специфическая (I) фаза H -антигена имеет ряд разновидностей — a , b , c и т. д. Они довольно часто дают начало вариантам «1,2», «1,5», «1,7» групповой (II) фазы H -антигена. Наблюдается и утрата жгутиков, о чем говорилось выше.

Фазовая изменчивость происходит спонтанно, с высокой частотой и имеет мутационное происхождение. У *S. typhimurium*, например, мутации от групповой фазы к специфической происходили с частотой от $1 \cdot 10^{-4}$ до $4,7 \cdot 10^{-3}$, в обратном направлении — от $1 \cdot 10^{-5}$ до $8,6 \cdot 10^{-4}$. В общем фаговые варианты появляются не реже $1 \cdot 10^{-4}$ клеточных делений. Описаны и другие мутационные изменения антигенов.

Наряду с ними зарегистрированы и фенотипические антигенные изменения. Стрептококки при культивировании на средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом образуют протеазу, а она гидролизует M -антиген.

Мутанты с измененной вирулентностью. Одним из механизмов изменения вирулентности и токсигенности в сторону повышения или понижения их являются мутации. Повышение и утрата токсигенности, однако, чаще происходит под влиянием фага. Это, в частности, доказано для токсина возбудителя дифтерии и гиалуронидазы стрептококка.

Модификации

К модификациям относят временные, однообразные, фенотипические формы изменчивости физиологических, биохимических и структурных особенностей бактерий, возникающие под влиянием некоторых внешних факторов и исчезающие тотчас или позднее после их устранения. Примером фенотипической изменчивости является утрата возбудителем сибирской язвы спорообразования, если культура находится при 43° или в пределах до 10°. В промежутке между этими критическими температурами спорогенез восстанавливается.

Предположительно считают, что длительные модификации, индуцированные внешними воздействиями, обусловлены временным изменением нехромосомных генетических систем. К ним у бактерий можно отнести рибосомы, гранулы жгутиков, клеточные мембраны и, возможно, хроматофоры (Джинкс, 1966). Они наделены физической непрерывностью, то есть передаются по наследству, определяют тот или иной признак бактерии, и, возможно, удваиваются и самовоспроизводятся при делении клетки. Именно этими критериями и определяются нехромосомные факторы наследственности.

Модификационная антибиотикорезистентность. Антибиотикорезистентность не обязательно связана с мутациями. Она может быть фенотипическим проявлением «в пределах нормы реакции данного генотипа». Пределы эти, как правило, незначительны и связаны с изменением рН, состава среды, фазы роста культуры и других причин.

Генетический обмен

Генетический обмен у бактерий — процесс передачи ДНК от донорской клетки к реципиентной, заканчивающийся рекомбинацией. Наблюдается он среди родственных, но генетически различных микроорганизмов при трансформации, при неспецифической трансдукции и конъюгации. Как правило, реципиентная клетка получает фрагмент донорской хромосомы. Поэтому она становится лишь частично диплоидной — по донорскому генетическому материалу. Частичная передача его получила название меромиксиса, а образующаяся неполная зигота — мерозиготы. Донорские гены названы экзогенотами, а соответствующие реципиентные — эндогенотами.

В мерозиготе происходит формирование рекомбинантной хромосомы. Существенно подчеркнуть, что количество информации в реципиентной клетке не увеличивается. Оно остается прежним, но качество информации изменяется, ибо донорская ДНК обменивается с ДНК реципиентной бактерии (В. Браун, 1968) (рис. 26). (Неинтегрированный участок хромосомы теряется или остается в одной клетке).

Процесс этот напоминает кроссинговер (перекрест хромосом), при котором отмечают разрывы и воссоединения двух взаимодействующих хромосом в мерозиготе. Возникают рекомбинанты — бактерии с признаками донорской и реципиентной клеток. Они могут быть на уровне гена и внутригенных частиц: реконов, участвующих в реком-

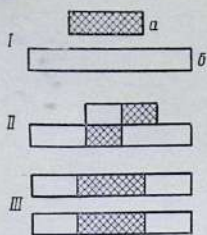


Рис. 26. Схема образования гибридной ДНК:

a — фрагмент донорской ДНК; *б* — ДНК реципиентной клетки; *I* — спаривание донорской и реципиентной ДНК; *II* — обмен фрагментами ДНК; *III* — гибридная ДНК после репликации.

бинации. В настоящее время ген считают функциональной единицей ДНК, ответственной за контроль образования полипептида. Некоторые формы генетического обмена наблюдаются и в естественных условиях в организме животного, но, как правило, они воспроизводятся экспериментально для проведения генетического анализа. Его сущностью является идентификация генов, установление их локусов (места локализации) на хромосоме (картирование генов), последовательности расположения вдоль хромосомы, размеров, расстояний между ними и внутренней структуры. Получаемые результаты в форме символов наносят на кольцевую карту бактерий. С помощью рекомбинации определяют и внутреннюю структуру генов.

В отличие от генетического обмена, не изменяющего суммарного объема информации в реципиентной клетке, а лишь нарушающего порядок нуклеотидов в ней, эпизодная передача, напротив, добавляет реципиентной клетке дополнительную генетическую информацию (см. соответствующий раздел).

Трансформация — изменение генотипа реципиентной бактерии под влиянием воспринятых ею генетических детерминантов от другой бактерии в форме химически чистой ДНК. Явление трансформации открыто Гриффитом в 1928 г. Заразив мышью культурой бескапсульного авирулентного пневмококка II типа вместе с убитой капсульной культурой пневмококка III типа, ученый высевал от павших животных капсулообразующий пневмококк III типа. Повторение опытов дало те же результаты. Открытие Гриффита вскоре было подтверждено другими учеными в опытах *in vivo* и *in vitro*. В 1944 г. Эвери, Мак-Леод и Мак-Картти сообщили, что трансформирующим фактором (ТФ) является ДНК пневмококка III (в описанном опыте это донорская клетка). При разрушении пневмококка III ДНК высвобождалась, проникала в пневмококк II и передавала ему качество вирулентности и капсулообразования. Полисахариды и белки пневмококка III этими свойствами не обладали. Освобожденный от них, а также от РНК, ТФ-пневмококка III не снижал своей активности.

Трансформацию установили у *H. influenzae*, *E. coli* K-12, *B. subtilis*, у менингококков, гонококков, стафилококков, стрептококков и других микроорганизмов. Трансформация может наблюдаться и в естественных условиях. Методом трансформации удалось передать пневмококкам не только гены, контролирующую капсулообразующую способность, но резистентность к пенициллину, стрептомицину, у *H. influenzae* переход R-типа в S-тип, стрептомицинрезистентность (с частотой $1 \cdot 10^{-3}$). Доказана трансформация M-протеина у стрептококков, синтеза специфических ферментов, споруляции и других признаков.

Оптимальный размер передающегося участка ДНК по молекулярному весу равен 10^7 , участки меньше 10^5 не обладают трансформирующей способностью. Молекулярный вес трансформирующей ДНК пневмококков составляет $5 \cdot 10^6$, *H. influenzae* $15 \cdot 10^6$. Подсчитано, что молекулярные веса такого порядка соответствуют 1 : 200*—1 : 500 всего генома бактерии. У сенной палочки трансформантами становятся не более 10% популяции компетентных клеток, у гемофильной бактерии менее 1%.

На эффект трансформации влияет ряд факторов: качество питательной среды, рН, температура, фаза роста, «компетентность» реципиентных клеток. Трансформация пневмококков лучше протекает в среде, содержащей пирофосфат, агглютинирующие R-форму антитела и сывороточный альбумин; *H. influenzae*, напротив, не нуждается в альбумине. Пенициллин, добавленный к компетентной культуре *B. subtilis*, повышает число трансформантов в 10 раз.

Трансформация удается только в экспоненциальной фазе роста клеток и максимально при 37°. Обязательным условием ее является компетентность реципиентных клеток, то есть физиологическое состояние клеток, способствующее проникновению в них ДНК и восприятию ее. Компетентность кратковременна и у пневмококков составляет 15 минут (половину времени генерации). Факторы, обуславливающие ее, еще не известны. Но значение некоторых установлено. У гемофильной палочки фактором компетентности оказался спермин. Удаление его из среды лишало 97% гемофильных бактерий компетентности; у стрептококков трансформация стрептомицинрезистентности зависела от надосадочной жидкости культуры стрептококка после ее центрифугирования. В ее присутствии стрептомицинрезистентность передавалась 30—40% всех клеток, участвующих в опыте. Обнаруженный стимулятор трансформабильности у штамма Challis стрептококка группы H оказался специфичным ферментом «компетазой». Он обуславливал переход некомпетентных клеток в компетентные только у гомологичных штаммов.

Активатором компетентности у пневмококков является белок с молекулярным весом 10 000, входящий в состав стенки компетентных клеток. Активатор «заразен». За десять минут он превращает сотни тысяч некомпетентных клеток в компетентные. Компетентность зависит от плотности культур пневмококков в среде. Оптимальная концентрация — 1—10 млн. клеток в 1 мл.

Трансформация оказалась возможной и между отдельными видами бактерий, в пределах их родственной группы, например гемофильных бактерий. Однако частота ее невелика. Это ставится в связь с нежесткостью объединяемых ДНК в процессе трансформации.

Различают четыре (или пять) стадий трансформации.

1. *Связывание ДНК* реципиентной клеткой лимитируется молекулярным весом фрагмента, который не должен быть меньше 10^7 с его

* По расчетам Хейса (1965), ДНК у *B. subtilis* и *B. megaterium* имеют 10 000 000 пар нуклеотидов, гены могут состоять из 1000 пар оснований, вся хромосома содержит 10 000 генов, 1/200 часть ее — 50 генов.

двуниевой структурой. Однонитевая ДНК не участвует в трансформации, так как компетентные клетки ее не поглощают. Однако внутри реципиентной клетки рекомбинацию обеспечивает все-таки одна нить ДНК. Разрушение ДНКазой, а также денатурация ее различными способами, ведущая к расщеплению на отдельные полинуклеотидные нити, лишают ДНК трансформирующих свойств. Связывание возможно не только гомологичной, но и гетерологичной ДНК. Например, пневмококки связывают как ДНК пневмококков, так и ДНК кишечной бактерии и даже ДНК, извлеченную из тимуса теленка. Однако трансформацию вызывает лишь гомологичная ДНК. То же наблюдается и у стрептококков. С другой стороны, бактерия инфлюэнцы может связать ДНК близкородственных видов. Нетрансформирующая неактивная гомологичная и гетерологичная ДНК угнетают эффект активной и таким образом ингибируют трансформацию. Механизм ингибирования трансформации гомологичной и гетерологичной ДНК еще не выяснен. Уже через несколько минут при 37° часть связанной ДНК проникает внутрь клетки, другая остается снаружи. Первая получила название необратимой, вторая — обратимосвязанной ДНК.

2. *Проникновение* необратимосвязанной ДНК внутрь реципиентной клетки происходит всего за 10 секунд. После этого наступает скрытый период. Если через 10 минут скрытого периода реципиентную клетку растворить фагом и извлечь из нее трансформирующую ДНК, то оказывается, что она еще не включилась в геном реципиентной бактерии и не потеряла своей активности. В скрытом периоде происходит включение донорской ДНК в реципиентную и лишь после этого в культуре начинают появляться трансформанты. Радионуклеотидным методом удалось доказать, что в геном реципиентной клетки включается одна нить донорской ДНК, другая распадается под влиянием ДНКазы. И все же это положение спорно.

3. *Спаривание* предшествует интеграции донорской и реципиентной ДНК и в генетическом понимании совершенно необходимо. Полагают, что происходит синапсирование гомологичных областей обеих ДНК, хотя прямых доказательств этой стадии процесса трансформации не имеется. Доказательством ее является слабое или полностью отсутствующее синапсирование гетерологичной ДНК с ДНК реципиентной клетки вследствие неактивности гетерологичной ДНК. Несовместимость, в свою очередь, объясняют различием в последовательности азотистых оснований гетерологичной ДНК и ДНК реципиентной клетки.

4. *Интеграция* заканчивается образованием рекомбинантной хромосомы, в которой донорский и реципиентный признаки нередко оказываются тесно сцепленными, а образовавшийся трансформант необратимым. Действительно, при экстрагировании ДНК из трансформированной клетки она оказывается составленной из реципиентных и донорского локусов.

Как же это происходит? Можно допустить три предположения: процесс останавливается на спаривании гомологичных участков обеих ДНК в реципиентной клетке; происходит копирование признака

донорской ДНК на ДНК реципиентной клетки; образуется разрыв и воссоединение обеих областей. В генетическом отношении последний процесс можно было бы трактовать, как истинную рекомбинацию или кроссинговер. Именно этот механизм и разделяется большинством ученых.

Интеграция донорской ДНК с ДНК реципиентной клетки происходит в пределах 10—30 минут. Однако в ряде случаев на это уходит несколько поколений, и интеграция осуществляется через несколько часов. После образования рекомбинантной хромосомы часть трансформирующей ДНК, не принявшая участия в этом процессе, исчезает из клетки, вероятно, вследствие разрушения ее ДНКазой. Рекомбинантная ДНК реплицируется, как единая структура. Обычно при трансформации в реципиентную клетку проникает малый фрагмент ДНК. Поэтому наиболее часто происходит трансформация одного какого-либо генетического признака, реже двух. Например, у пневмококков наблюдали передачу стрептомицинрезистентности и маннитпозитивности. Для сегрегации стабильного трансформанта требуется несколько делений бактериальной клетки. Лишь после этого наступит увеличение трансформантов в популяции.

Методом трансформации у пневмококков установлена сцепленность локусов стрептомицинустойчивости и сбраживания маннита; три локуса, определяющие различную устойчивость к сульфониамадам; локусы, контролирующие образование капсул у *Haemophilus*; тесно сцеплены локусы резистентности к стрептомицину и канамицину; у сенной палочки сцеплены гены, ответственные за синтез индола и сбраживание сахарозы, за синтез β -галактозидазы и сбраживание сахарозы, за все этапы синтеза триптофана. В последнем случае «триптофановые гены» сцеплены еще с локусом, контролирующим синтез гистидина.

Трансдукция — перенос небольшого фрагмента ДНК бактерио-донора фагочувствительной бактерио-реципиенту с помощью фага. Следствие ее — изменение генотипа реципиентной клетки за счет фрагмента генома донорской бактерии. В популяции вирулентных или умеренных фагов, образовавшихся в фагочувствительных или лизогенных бактериях вследствие индукции в последних профагов, трансдуцирующие фаги, способные перенести часть ДНК донорской бактерии реципиентной клетке, встречаются от $1 \cdot 10^4$ до $1 \cdot 10^8$ (от 1 : 10 000 до 1 : 100 000 000 фаговых частиц данной популяции).

Напомним, что вирулентные фаги вызывают в чувствительных бактериях продуктивную инфекцию — появление молодых фагов. Это означает, что фаговая ДНК (имеет кольцевую структуру, как и ДНК бактерии) реплицируется самостоятельно, отдельно от ДНК хромосомы бактерии и значительно быстрее ее. Более того, репликация ДНК бактерии подавляется специальными ферментами бактериальной клетки.

ДНК умеренного фага в инфицированной (лизогенизированной) фагочувствительной бактериальной клетке объединяется (интегрирует) с хромосомой бактерии и остается в ней в форме профага. Теперь

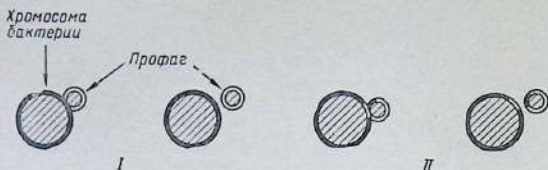


Рис. 27. Схема отделения ДНК профага:

I — обычное; II — неправильное (по Брауну, 1968).

ДНК умеренного фага реплицируется вместе с ДНК лизогенной бактерии. Полагают, что профаг образует репрессор, тормозящий созревание и размножение фага и создающий иммунитет против повторного инфицирования лизогенной клетки аналогичным умеренным фагом. Однако спонтанное созревание фага и вегетативное размножение последнего все же наблюдаются приблизительно в одной на 1 000 000 лизогенных бактерий. Происходит оно, вероятно, вследствие разрушения репрессора. Индукция лизогенных бактерий ультрафиолетом резко повышает число клеток с созревающим фагом.

При созревании фага могут присоединиться частицы хромосомной ДНК к геному фага (рис. 27). Фрагмент незначителен, не превышает $1/100$ ДНК бактериальной клетки. Такой участок, несущий один или несколько сцепленных детерминантов наследственности, и передается фагом чувствительной к нему бактерии. Больше чем $1/100$ частицу хромосомы бактерии фаг сальмонелл и шигелл захватить не может, так как его собственная ДНК в 100 раз меньше ДНК кишечных и сальмонеллезных микроорганизмов.

Впервые феномен трансдукции был понят и обстоятельно описан Циндером и Ледербергом (1952), хотя годом раньше Д. Ледерберг и Э. Ледерберг, Циндер и Лайвли при обработке культуры одного мутанта бесскелоточным фильтратом культуры другого мутанта наблюдали подобное явление и назвали его трансдукцией. Используя фаг Р-22 (Рет-22), они смогли передать свойства расщеплять арабинозу или рамнозу от бактерий мышинного тифа, обладающих соответствующими ферментами, бактериям того же вида, не наделенными ими. Было предположено, что фаги, формирующиеся в период литического цикла, случайно включают в свой геном фрагменты донорской хромосомы и передают их следующим реципиентным бактериям (рис. 27).

Вскоре было установлено трансдуцирование умеренными фагами ферментации различных углеводов, жгутиков или их антигенов, спорообразования, вирулентности, токсигенности, антибиотикорезистентности от бактерий, обладающих названными качествами, бактериям, не имеющим их. Трансдукция жгутиков наблюдалась у кишечных и сальмонеллезных бактерий; трансдукция различных признаков описана у шигелл, холерных вибрионов, стафилококков, пневмококков, *V. proteus*, *V. subtilis*, *V. megaterium* и других микроорганизмов. Было найдено, что фаг Р-22 прикрепляется к соматическому антигену 12 *S. typhimurium* и других *Salmonella*, имеющих этот антиген, трансдуцирует их. При этом многие реципиентные клетки не лизируются и не лизогенизируются. Лизогенные иммунные реципиентные бактерии способны трансдуцироваться не только умеренными, но и вирулентными мутантами умеренного фага, потерявшими способность лизогенизировать клетки.

Передача несцепленных признаков происходит независимо друг от друга, так как в донорской хромосоме они расположены отдельно, и так же отдельно «захваты-

ваются» фагом; трансдукция сцепленных функционально родственных и неродственных признаков, напротив, осуществляется вместе. Примером одноактной передачи кишечной бактерии неродственных сцепленных признаков являются: thr и Leu, Leu и azi, sh и mal, gal и профаги 82, λ или 434. Размер каждого из них не превышает 1/100 длины хромосома. Однако в отдельных случаях трансдуцирующий фаг может передать реципиенту и больший чем $1/100$ отрезок донорской хромосомы. Это указывает на то, что донорская хромосома, вероятно, не включается в геном фага, а последний прикрепляется к ней. Однако это только предположение.

Типы трансдукции. Различают неспецифическую (генерализованную, общую) и специфическую (ограниченную, специализированную) трансдукцию.

Неспецифическая трансдукция характеризуется тем, что один и тот же умеренный фаг может трансдуцировать чувствительным реципиентным клеткам различные признаки донорской бактерии. Данный тип трансдукции был изучен на системе *S. typhimurium* — фаг P-22. Названный фаг передавал реципиентным клеткам гены, контролирующие серологические свойства, вирулентность, образование жгутиков, ферментацию углеводов, резистентность к стрептомицину, синтетическую активность в отношении ряда аминокислот.

Фаг P-1 трансдуцировал детерминанты, ответственные за сбраживание лактозы (Lac^+) *E. coli* и *Sh. dysenteriae*. Он оказался дефектным, то есть утратившим часть своей (фаговой) ДНК в связи с заимствованием частицы ДНК бактериальной хромосомы, контролирующей образование Lac^+ признака, и включения ее в свой геном. Дефектность фага P-1 проявлялась в изменении морфологии бляшки иммунитета к суперинфекции тем же фагом. Фаг P-22, трансдуцирующий способность к синтезу триптофана и гистидина, также оказался дефектным. Внутривидовая трансдукция (от *E. coli Lac⁺* к *E. coli Lac⁻*) приводит к образованию стабильных Lac^+ трансдуктантов; напротив, межвидовая трансдукция (от *E. coli Lac⁺* к *Shigella Lac⁻*) нестабильная. Вероятно, в этом случае экзогенота (см. ниже), несущая Lac^+ признак не включается в эндогеноту реципиентной *Lac⁻* бактерии. Хейс так характеризует неспецифическую трансдукцию:

трансдуцироваться может любой бактериальный ген; включение гена может произойти как во время литической инфекции, так и после индукции лизогенных клеток, так что осуществляет ее, по-видимому, вегетативный фаг, а не профаг;

перенесенный фрагмент хромосомы донора обычно включается в хромосому реципиента, а не сохраняется в виде экзогеноты в гетеро-геноте*;

большинство трансдуктантов (по крайней мере в случае фага P-1) могут не обнаруживать никаких следов остаточного фага.

Специфическая трансдукция характеризуется передачей от донорской клетки клетке-реципиенту строго определенных генов. Морзе и супруги Ледерберг в 1956 г. первыми сообщили о подобном явлении. Они установили, что фаг λ , находящийся в состоянии профага в лизогенной gal^+ донорской кишечной бактерии (штамм K-12), индуциро-

* Из этого правила имеются исключения, указанные выше.

ванный к вегетативному размножению ультрафиолетом, закономерно переносил реципиентным gal^- кишечным бактериям галактозоразлагающий признак. Частота передачи составляла 10^{-6} λ -частиц. Аналогичными качествами обладал фаг Ф-80, трансдуцирующий кишечной бактерии свойство синтезировать триптофан.

Специфичность в обоих случаях обуславливается постоянной связью фага λ с геном gal^+ , а фага Ф-80 с геном try^+ , то есть с сегментом хромосомы донорской клетки, контролирующим в первом случае разложение галактозы, во втором — синтез триптофана. Процесс закономерно заканчивался лизогенизацией реципиентной кишечной бактерии, но фаг λ оказался неспособным к продуктивной инфекции, то есть к воссозданию своего потомства в реципиентной клетке ни спонтанно, ни после воздействия индуцирующими веществами. Вместе с тем реципиентные бактерии приобретали иммунитет к суперинфекции фагом λ . Выяснилось, что фаг λ , трансдуцирующий gal^+ признак, является дефектным, так как он потерял $1/3$ или $1/4$ своей ДНК взамен приобретенного локуса донорской клетки, контролирующего разложение галактозы. Утраченной оказалась часть ДНК, ведающая репродукцией фага λ . Такой фаг был обозначен, как λdg — лямбда галактозо-дефектный. Оказалось также, что у λdg разрыв хромосомы происходил между h и областью S , ответственной за иммунитет. Область S у λdg сохранилась, поэтому трансдуктанты оказывались иммунными к суперинфекции фагом λ .

Как образуются дефектные фаги? Одни ученые считают, что в основе образования дефектного фага лежит ошибка в копировании во время размножения фага в донорской бактерии; другие допускают процесс двойного кроссинговера; третьи захват фагом λdg части хромосомы донорской клетки и утраты части своей в процессе индуцирования лизогенной бактерии. Репликация частицы λdg становится возможной вследствие дополнительного заражения реципиентной клетки и нормальным фагом λ , «передающим» фагу λdg недостающую часть хромосомы (аналогичное наблюдается и с дефектным фагом Р-22). Репликация λdg наступает после облучения реципиентных клеток ультрафиолетом.

При заражении реципиентной кишечной бактерии gal^- структура λ — gal^+ синансирует с соответствующим участком хромосомы реципиентной бактерии, образуя gal^-/ex — gal^+ или, иначе, gal^-/λ — gal^+ , лизогенную гетерогеноту (рис. 28). Если ее индуцировать ультрафиолетом, то уже не одна клетка на миллион, а половина из них будет освобождать фаги с геномом λ — gal^+ . Эти фаги (фаголизаты), в отличие от исходного штамма донора, отличаются высокой частотой передачи gal^+ признака gal^- клеткам. Они получили название Hft — от англ. high frequency of transduction — высокая частота трансдукции. Что происходит в реципиентной трансдуцированной бактерии? Она превращается в гетерогеноту или так называемую мерозиготу — клетку частично диплоидную за счет донорского аллеля gal^+ . Образовавшаяся гетерогенота не стойка в отношении gal^+ признака и отщепляет (выщепляет) gal^- потомство с частотой 10^{-3} (1 : 1 000 клеток на одну генера-

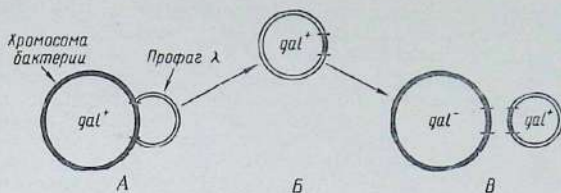


Рис. 28. Схема образования гетерогеноты при специфической трансдукции:

A — донорская *E. coli* K-12 gal⁺ (λ⁺); B — λ gal⁺ (λ dg); B' — реципиентная *E. coli* gal⁻ (реципиентота *E. coli* gal⁺/gal⁻).

цию). Большинство gal⁻ потомков утрачивает фаг и является устойчиво гаплоидным, то есть родительским (реципиентным). Образуются также стойкие рекомбинантные гаплоидные gal⁻-клетки.

Трансдукция включает в себя четыре стадии: 1) расщепление хромосомы донорской клетки в результате размножения в ней фага; 2) включение части хромосомы донорской бактерии в хромосому фага; 3) передача фагом реципиентной клетке фрагмента донорской хромосомы; 4) образование мерозигот и рекомбинантов из них.

Абортивная трансдукция обнаружена Озеки (1956) в опытах трансдукции бактерий мышинного тифа. Реципиентные ауксотрофные мутантные клетки, получившие часть хромосомы донорской прототрофной бактерии, высевали на минимальную питательную среду. Вырастали два типа колоний: крупные, состоящие из трансдуктантных прототрофных (рекомбинантных) бактерий и микроколонии из бактерий, в которых произошла абортивная трансдукция. Трансдуктантно-прототрофные клетки легко размножились на минимальной среде и образовали крупные колонии потому, что ауксотрофность реципиентных клеток была компенсирована соответствующими детерминантами донорских прототрофных клеток.

Микроколонии состояли из клеток, не содержащих фрагмента хромосомы донорской бактерии, и одной бактерии с донорским фрагментом хромосомы, лишенной фага (рис. 29). Фрагмент придает реципиентной бактерии биохимическую активность, за счет которой и вырастает данная клетка.

Фрагмент хромосомы донорской бактерии в реципиентных абортивно-трансдуцирующих клетках не входит в их хромосому и не реплицируется при их делении, а передается только одной из двух дочерних клеток. Остальные реципиентные бактерии микроколонии, не получив его, все же размножаются и растут на минимальной среде. Рост их стимулируется избытком фермента, образуемого реципиентной клеткой, получившей сегмент хромосомы донорской бактерии. При своем делении эта клетка передает избыток фермента дочерней клетке, не наследующей донорского гена. Дочерняя клетка, в свою очередь,

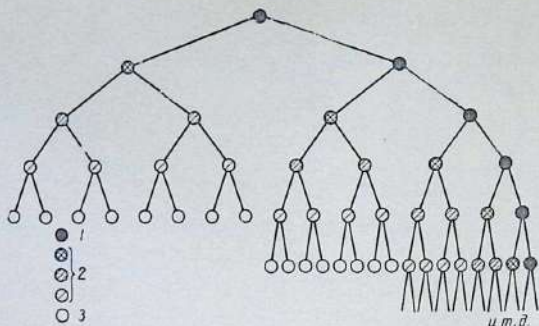


Рис. 29. Образование микроколонии в результате abortивной трансдукции (по Озеки, 1956).

1 — клетка, содержащая фрагмент хромосомы донора; 2 — клетки, сохраняющие способность к росту на селективной среде после потери фрагмента; 3 — клетки не способные к дальнейшим делениям на селективной среде

делится. Так продолжается до тех пор пока запас фермента не иссякнет. Микроколонии возникают и в том случае, если донорской клеткой будет ауксотрофный мутант, подобный реципиентной бактерии, но с мутацией в другом гене, чем в реципиентной клетке. В этом случае мутационный дефект реципиентной клетки будет компенсирован нуклеотидами нормального аллельного гена донорской бактерии. В результате вырастут прототрофные бактерии в форме крупных колоний, а наряду с ними и abortивно-трансдуктантные мелкие колонии. Следовательно, с помощью abortивной трансдукции, индикатором которой являются микроколонии, можно выявить комплементарность (дополняемость) мутаций, когда они находятся в разных участках хромосомы донора и реципиента или в разных генах (цистронах). При мутациях в одном и том же гене донора и реципиента прототрофные клетки не возникают или возникают крайне редко. Тем не менее получены новые данные, свидетельствующие о возможности не только межгенной, но и внутригенной комплементации.

Фаговая конверсия — изменение антигенных свойств бактерий под влиянием нормального фага у лизогенизированных и у чувствительных бактерий в процессе литической инфекции, обусловленной вирулентными мутантами фагов. Фаговая конверсия не связана с генотипом бактерий, из которых получен данный фаг. Следовательно, фаги, передавая новый антигенный признак реципиентным бактериям, не заимствуют его у донорской клетки, ибо этого признака у нее нет. Лизогенизация, или литическая инфекция, заканчивается передачей сальмонеллам группы E различных соматических антигенов, нетоксигенным дифтерийным бактериям — токсигенности; у *V. metaterium* лизогенизация обуславливает переход S-формы в R-форму

Фаговая конверсия отличается от трансдукции рядом принципиальных свойств. Во-первых, трансдуцирующий фаг является дефектным, вызывающий конверсию — нормальным. Во-вторых, трансдукция наблюдается с низкой частотой (10^5 — 10^7), конверсия — высокочастотна. При ней каждая клетка, инфицированная фагом, изменяется. В то же время ни одна функция фага при этом процессе не утрачивается. В-третьих, при трансдукции почти всегда отмечают объединение (рекомбинацию) донорского локуса бактериальной хромосомы с хромосомой реципиентной клетки, в то время как при конверсии этот процесс отсутствует. В-четвертых, объем (количество) информации при трансдукции не увеличивается, он лишь качественно изменяется (нарушается порядок нуклеотидов в ДНК); при конверсии информация добавляется к информации реципиентной клетки за счет хромосомной части генома фага, вызвавшего конверсию.

Откуда фаг взял бактериальные гены, передаваемые реципиентным клеткам, неясно. Полагают, что подобный фаг некогда получил от какой-то бактерии соответствующие гены, но не стал при этом дефектным. Допускают также, что фаг, обуславливающий конверсию, возник в процессе эволюции из одного предка, из которого произошли и фаговый и бактериальный геномы. С тех пор он носит «в себе» бактериальные гены, ставшие фаговыми.

Анализ тонкой структуры генов. Тонкая структура генов изучена с помощью рекомбинации мутантных аллелей (аллельных субединиц гена) и методом абортивной трансдукции. В основе обоих приемов лежит принцип взаимодополняемости, комплементарности. Рекомбинация мутантных аллельных частиц двух генов в гетерозиготе доказана для большинства генов кишечной бактерии и бактерии мышинного тифа. С помощью множества различных мутантов и рекомбинации аллелей их генов установлено, что гены, или цистроны, состоят из единиц рекомбинации — реконов и единиц мутации — мутонов. Реконы, как выяснено, составляют от одной до нескольких пар нуклеотидов, мутоны — одну пару, цистроны — 1000 или несколько тысяч пар нуклеотидов. Дифференциация цистронов производится на основе *цис-транс-теста*.

Сущность теста сводится к выяснению возможности взаимного дополнения (комплементации) функции хромосом в диплоидных клетках нарушенной мутацией. Рассуждают так: две мутации в диплоидных клетках могут быть либо в одной хромосоме (цис-конфигурация), либо в двух (транс-конфигурация) (рис. 30). Следует также помнить, что дикая аллель доминирует над мутантной аллелью.

Две мутации, находящиеся в разных цистронах — в цис- и транс-конфигурациях, дают дикий фенотип. В цис-конфигурации (I) это происходит в силу функциональной компенсации двух мутаций аллелями дикого типа с неповрежденными цистронами, в транс-конфигурации (II) — за счет взаимной дополняемости мутантных цистронов немутантными.

Дикий фенотип образуется также в случае, если две мутации в цис-конфигурации размещены в одном цистроне (III). Здесь также наблю-

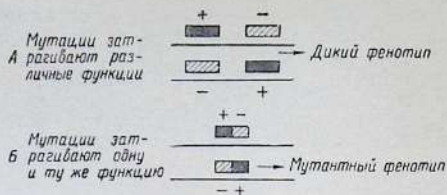


Рис. 30. Схема теста на комплементарность.

А. Два комплементарных мутантных генома введены в одну и ту же клетку. В клетке имеется по одной неповрежденной (функциональной) единице каждого типа; поэтому она синтезирует оба фермента и имеет дикий фенотип. Б. В клетку введены два мутантных генома, у которых мутации затрагивают одну и ту же функциональную единицу. Поскольку ни один из родительских геномов не способен индуцировать синтез фермента, клетка имеет мутантный фенотип.

дается компенсация функции двух мутационных дефектов цистрона аллелями цистрона дикого типа. Если они расположены в одном цистроне, но в транс-положении (IV), то взаимной дополняемости не происходит, так как мутация, независимо от места локализации внутри цистрона, парализует его функцию на всем протяжении. В этом случае дикий фенотип не образуется. Следовательно, цис-транс-тест устанавливает принадлежность мутации к разным цистронам или одному цистрону.

Пользуясь abortивной трансдукцией, как цис-транс-тестом, можно выявить функционально самостоятельные единицы и внутри цистронов. Демерец с сотрудниками (1959) в локусе *His S. typhimurium*, контролирующем синтез дегидрогеназы (звена в синтезе гистидина), обнаружили четыре группы комплементации, четыре функционально самостоятельные частицы; в гене, контролирующем образование щелочной фосфатазы у *E. coli* K-12, также найдены участки комплементации. Эти данные изменяют сложившиеся представления о цистроне (гене), как о неделимой функционально самостоятельной единице наследственности. Комплементарные частицы внутри некоторых цистронов, называемые до сих пор условно аллелями, именуют участками-сайтами — наименьшая структурная единица некоторых генов.

На основании метода abortивной трансдукции в хромосоме бактерий мышинного тифа обнаружили 60 локусов. Почти каждый из них имел сайты, и почти все они в пределах одного локуса, рекомбинировали. Биохимическая функция локусов оказалась дискретной. Полагают, что в бактериальной хромосоме возможно наличие 100 000 сайтов, в которых может произойти мутация.

Конъюгация — явление, сходное с половым процессом, при котором часть или, как исключение, вся ДНК мужской (F^+ — донорской) бактерии передается женской (F^- — реципиентной) клетке при контакте с ней. В результате чаще образуется мерозигота. Мужская клетка при этом не погибает, ибо перед конъюгацией ее хромосома реплици-

руется, и в зиготу уходит одна дочерняя хромосома. Фрагмент мужской хромосомы может затем подвергнуться рекомбинации с гомологичным участком женской хромосомы и будет реплицироваться вместе с ней, как одна структура. Реципиентная клетка из временно и частично диплоидного состояния перейдет в нормальное гаплоидное. В очень редких случаях мерозигота остается устойчивой. Кроме F-фактора конъюгацию обеспечивают также эписома RTF и I-фактор колициногенности. Разумеется, конъюгация образуется с бактериями, не имеющими указанных факторов.

Все три названных фактора состоят из ДНК, имеют, вероятно, кольцевую структуру, обладают свойством самостоятельной репликации, независимо от репликации бактериальной хромосомы, связаны с цитоплазматической мембраной, находятся лишь у мужских клеток (Браун, 1968). По предложению Жакоба и Вольмана в 1958 г. эти структуры названы эписомами (см. ниже).

Данный феномен был открыт Ледербергом и Татумом в 1946 г. у кишечных бактерий (штамм K-12). Ледерберг тщательно изучил конъюгацию у этих бактерий и представил первую генетическую карту их. В 1952 г. Хейс установил, что при скрещивании F^+ с F^- -клетками происходит гетероталлическая конъюгация, при которой наблюдается односторонний частичный перенос хромосомы от мужской клетки к женской. Последующая рекомбинация происходит между локусом донорской хромосомы и гомологичным участком хромосомы реципиентной клетки.

Выяснилось, что штамм кишечной бактерии K-12 имеет два типа плодovitых (фертильных) скрещиваний $F^+ \times F^-$, что всегда приводит к рекомбинации, хотя и с небольшой частотой (10^{-6}), и $F^+ \times F^+$, дающих рекомбинации в значительно меньшей степени; скрещивание $F^- \times F^-$ всегда бесплодито, стерильно. Было доказано, что донорское состояние обуславливается присутствием в F^+ -клетках F-фактора или фактора пола (фертильности). Он легко и быстро передается реципиентным F^- -клеткам и независимо от хромосомного генетического материала F^+ -клеток. Генетический хромосомный материал F^+ -клеток, в свою очередь, передается независимо от фактора пола, при этом с одинаковой вероятностью реципиентной клетке может быть передан любой сегмент хромосомы донорской F^+ -бактерии. Каков механизм этой передачи?

Допускают, что при конъюгации $F^+ \times F^-$ -клеток передача мужской хромосомы реципиентной клетке происходит потому, что в популяции F^+ -бактерий возникают Hfr-подобные клетки вследствие интеграции F-фактора с бактериальной хромосомой. Hfr-подобные бактерии, в отличие от истинных Hfr-клеток, образуют рекомбинанты F^+ . Мужскую хромосому женской клетке они передают в 1000 раз реже, чем истинные Hfr-бактерии. Частота такой передачи не превышает 10^{-6} . В то же время сам фактор пола, когда он свободен, от F^+ F^- -клеткам передается весьма часто и также часто из F^- -клеток образуются F^+ -клетки.

Полагают, что плодovитое скрещивание $F^+ \times F^+$ -клеток объясняется временным приобретением F^+ -клетками функций F^- -бактерий. Такое явление называется фенокопией. Возникает оно под влиянием факторов внешней среды. В частности, появление F-фенокопий в популяции F^+ -клеток происходит в стареющих культурах при их азарции, при обработке перйодатом.

В 1950 г. Ковалли и в 1953 г. Хейс из одного и того же штамма F^+ кишечных бактерий выделили два штамма мужских Hfr-клеток, которые в скрещивании с F^- -клетками давали примерно, в 1000 или 2000 раз больше рекомбинантов, чем их исходный штамм. Вместе с тем, реципиентные F^- -клетки в скрещивании с Hfr-бактериями не превращались в донорские F^+ -бактерии, так как они, как правило, F-фактора от Hfr не получали. С другой стороны, Hfr-штаммы иногда возвращались в исходную F^+ -форму, возможно, в результате обратных мутаций. Следовательно, они имели F-фактор. Создавалось впечатление, впоследствии подтвердившееся, что фактор пола у Hfr-штаммов включается в их хромосому. Район, прилегающий к половому фактору, поэтому передается последним. Сам половой фактор передается, как исключение.

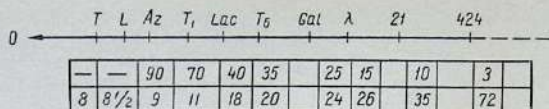


Рис. 31. Генетическая карта переднего конца хромосомы Hfr H (по Хейсу):

верхняя строка — вероятность проникновения маркера (в %), нижняя — время проникновения (в мин.).

В ряде случаев он может выходить из хромосомы в цитоплазму, превращая Hfr в F⁺-клетки. Образующиеся в скрещиваниях Hfr × F⁻ рекомбинанты наследуют разные сегменты донорской хромосомы: в одних случаях с одними, в других — с другими маркерами.

Все это нуждалось в объяснении, которое представили Вольман и Жакоб в 1955 и 1958 гг. Используя штамм Hfr H, выделенный Хейсом, они провели с ним опыты по прерыванию конъюгации в смеси Уоринга. Дело сводилось к прерыванию конъюгации путем встряхивания смешанной культуры Hfr с F⁻-клетками через каждые 1/2—1 минуту, к высеву проб на среды, селективные для рекомбинантов, и отбору из них тех, которые включали в свою хромосому донорский ген или гены. Передний конец хромосомы штамма Hfr H Хейса имел следующие маркеры: thr, Leu, Az, t₁, Lac, t₆, gal и т. д. (thr — треонин, Leu — лейцин, Az — азид, t₁ и t₆ — места прикрепления колифагов системы t, Lac — лактоза, gal — галактоза). thr реципиентной бактерии (F⁻) передавался через 8 минут, Leu — через 8,5 минуты, Az — через 9 минут, gal — через 24 минуты и т. д. Одновременно частота рекомбинантов падала. Если для Az она составляла 90%, то для gal — всего 25% (рис. 31). Вся хромосома Hfr H передается F⁻-клеткам за два часа. Значит, отрезок ее O — thr — gal, переданный за 24 минуты, составляет 1/4 длины хромосомы. Из этого опыта сделаны важные выводы: гены расположены на хромосоме донорской бактерии линейно, первым в реципиентную бактерию проникает определенный конец хромосомы, условно названный O (англ. origin — начало), за ним следуют всегда один и те же маркеры. Опыты Вольмана и Жакоба со штаммом, выделенным Ковалли, дали неожиданно иные результаты. Порядок передачи признаков оказался другим. Первым был маркер Lac, затем P, t₁ и т. д.

Вскоре все объяснилось. Было сделано заключение о том, что хромосома кишечной бактерии замкнута в виде кольца. Переход F⁺-клеток в клетки Hfr связан с включением в их хромосому фактора пола (F). При конъюгации Hfr × F⁻ кольцевая хромосома разрывается на месте включения полового фактора и превращается в линейную структуру с передним (O) и задним (F) концом. Включение фактора пола в штамм Hfr может происходить в любой или в большинстве точек кольцевой хромосомы. Соответственно этому изменяется и содержание переднего конца хромосомы.

Чем дольше длится конъюгация, тем больший сегмент донорской хромосомы поступает в реципиентную клетку, но тем меньше вероятность сохранения целостности донорской хромосомы от случайных разрывов и продолжения конъюгации. Именно поэтому, чем дальше расположены гены от точки O, тем они с меньшей вероятностью передаются реципиентной клетке и тем меньше соответствующих рекомбинантов. Итак, место разрыва хромосомы Hfr-клеток, обусловливаемое присоединением к ней F-фактора, случайно, возможность передачи маркеров, расположенных на дистальном конце хромосомы, редкая, сам половой фактор, заканчивающий его, передается как исключение (Хейс, 1965). Теперь ясно, почему скрещивание Hfr × F⁻ почти никогда не заканчивается превращением F⁻-клетки в F⁺.

С помощью изотопной методики установлено, что в процессе конъюгации от Hfr-бактерии F⁻-клеткам передается только ДНК. За полтора часа успевает перейти всего 9% ее. Ни белок, ни РНК донорской бактерии в этом процессе не участвуют.

В 1960 г. Тейлор и Адельберг сообщили о выделении ими трех новых штаммов Hfr (V, P, J), дающих высокую частоту рекомбинации и переносящих все известные генетические маркеры кишечной бактерии.

Фактор пола и его свойства. Он состоит из ДНК, содержащей, вероятно, $2,5 \cdot 10^6$ пар азотистых оснований (Хейс, 1965), то есть несколько больше, чем их имеет флаг. В F^+ -клетках фактор пола ведет себя как генетический детерминант — располагается в цитоплазме бактерии автономно от ее хромосомы; реплицируется значительно чаще последней и независимо от нее; превращает реципиентные бактерии в донорские подобно «эпидемии», при этом быстрее, чем происходит размножение бактерий; репликация полового фактора подавляется акридиновыми красителями или F -фактор элиминируется, что превращает донорские F^+ -клетки в реципиентные F^- . Однако все другие признаки донорской бактерии сохраняются.

Какова функция полового фактора при конъюгации? Фактор пола, как в F^+ , так и в Hf -клетках, обуславливает их донорскую функцию, ибо утрата его в обоих случаях равнозначна превращению донорских бактерий в реципиентные. Донорство, в свою очередь, свидетельствует о возможности мужских клеток спариваться с женскими. Результатом этого процесса является образование контакта, извлечение энергии для переноса генетического материала, организация последнего для целей передачи реципиентной клетке. Все эти функции, а также образование поверхностного антигена (доноры серологически отличны от реципиентных клеток) обеспечивает фактор пола. По Хейсу, нас это не должно удивлять, если принять во внимание, что фактор пола имеет ДНК, достаточную для сотни генов.

Типы доноров. В последнее время установлено, что фертильность является качеством не только *E. coli* K-12, но различных других ее вариантов и других видов бактерий. Донорские типы среди кишечных палочек встречаются почти в 50%. Доказана возможность скрещивания кишечной бактерии с возбудителями дизентерии Флекнера, с F -мутантами сальмонелл. Рекомбинация хромосомы кишечной палочки с хромосомой бактерии мышинного тифа получена в опытах *in vivo*. Выделены брюшнотифозные бактерии со свойствами Hf . Они обеспечивали фертильные скрещивания со многими видами сальмонелл, с кишечными и дизентерийными бактериями. Отдельные штаммы возбудителя брюшного тифа ty_2 , разлагающие лактозу, успешно скрещивались с *Ser. marcescens*, с холерными вибрионами и передавали им Lac^+ -признак. Описаны опыты по успешному переносу полового фактора от кишечной бактерии к возбудителю чумы. Следовательно, генетический обмен распространен среди бактерий шире, чем это казалось до последнего времени. Он возможен не только среди разновидностей серотипов и штаммов кишечной бактерии, но и среди бактерий разных видов одного рода или семейства и среди разных семейств (тифозная сальмонелла, холерный вибрион). Возможно, не так уж редко генетический обмен наблюдается в организме животного, например, в кишечнике.

Конъюгация, как уже говорилось, приводит к образованию зиготы. Осуществляется это путем пяти последовательных стадий:

- 1) столкновение. Оно случайно. Эффективны контакты среди донорских и реципиентных клеток. В густой популяции они наступают через несколько минут после смешивания бактерий;
- 2) соединение конъюгирующих пар обусловлено действием фактора пола донорских бактерий. Реципиентная клетка в этой стадии играет пассивную роль;
- 3) перенос хромосомы. Хромосома Hf -клеток передается реципиентам как линейная структура, и каждый ген, расположенный на ней, переносится через строго определенное время. Благодаря

этому расстояние между генами возможно выразить в единицах времени;

- 4) образование рекомбинантной хромосомы;
- 5) репликация ее.

Взаимоотношения между донорской и реципиентной хромосомами в мерозиготе протекают по типу кроссинговера. Однако точный механизм образования рекомбинантов все же неизвестен. Одно из наиболее распространенных допущений заключается в том, что происходит разрыв хромосомы F^- -клетки и включение в нее участка донорской хромосомы с последующим воссоединением концов. На эффект рекомбинации оказывают влияние густота смешиваемых культур, некоторые биохимические компоненты, рН среды, температура. Чем больше густота смешиваемых бактерий, тем легче и чаще возникает контакт между донорскими и реципиентными клетками. Добавление к отмыгтым культурам кишечных бактерий глюкозы и аспарагина повышало частоту рекомбинации. При 37° образовывалось максимальное количество рекомбинантов, чем при более высоких и низких температурах. При рН 6,2 частота рекомбинаций удваивалась по сравнению с частотой при рН 7,2.

Сексдукция, или F^- -дукция. Рассмотрение взаимоотношения донорских клеток можно представить как $Hfr \rightleftharpoons F^+$. Однако существуют промежуточные доноры (F^1). Они происходят из штаммов Hfr и отличаются от них и F^+ штаммов рядом особенностей.

1. F^1 -фактор в результате генетического обмена сцеплен с определенным локусом хромосомы Hfr -клеток (Lac^+ , gal^+ или pro^+), и представляет с ним единую структуру.

2. F^1 -фактор легко перемещается из хромосомы в цитоплазму и обратно. Находясь в хромосоме, обуславливает свойства Hfr -клеток, будучи в цитоплазме, передается F^- -клеткам с заимствованным бактериальным геном.

3. F^1 передает ДНК хромосомы F^- -клеткам с обычной последовательностью, но с частотой в 10 раз меньше, чем Hfr . Сам F^1 -фактор передается при конъюгации в 100%, как обычный F , но реципиентные клетки превращаются в промежуточные донорские штаммы, а не в штаммы F^+ .

4. Акридиновые красители элиминируют F^1 -фактор, превращая исходные промежуточные штаммы в реципиентные, а контакт последних с любым F^+ -штаммом восстанавливает качества промежуточной структуры.

Используя различные мутантные клетки, можно с помощью сексдукции осуществить тест комплементарности и выяснить доминирующие гены и рецессивные гены у бактерий.

Длину хромосомы и различные гены на ней, переданные реципиентной клетке при конъюгации, можно выразить, как указывалось выше, в единицах времени, а на основе унаследованных реципиентной клеткой признаков донорской бактерии составить карту генов, их взаимного расположения и протяженности.

Переносимые фрагменты донорской хромосомы можно выразить и в единицах структуры ДНК. Введение в ДНК Hg-клеток радиоактивного фосфора P-32 приводит к образованию рекомбинантных классов, в которые поступают сегменты ДНК, полученные в результате ее разрыва радиоактивным распадом P-32. Ученые вычислили, что за одну минуту в реципиентную бактерию от Hg-клетки поступает около 20 единиц рекомбинации или 10^5 пар нуклеотидов ДНК. Вся хромосома переходит за 100 минут. Длина карты равна 2000 единицам рекомбинации; рекомбинационная единица равна 5000 пар нуклеотидов. В этих опытах, как и в других, вероятность переноса маркеров падает пропорционально расстоянию от нулевой точки и пропорционально числу радиоактивных атомов фосфора. В заключение приведем схему форм передачи генетической информации (рис. 32).

Эписомы (Эпи — над, сома — тело) — генетические детерминанты, существующие в двух чередующихся формах: автономной — в цитоплазме и включенной в хромосому клетки. Однако некоторые детерминанты наблюдаются, как будто, только в свободном состоянии в цитоплазме бактерии и не включаются в ее хромосому. Ведущим критерием эписом генетики считают все генетические элементы, способные к независимой репликации и к передаче реципиентным клеткам, а также обнаруживающие какую-либо форму генетического взаимодействия с хромосомой бактерий. С этих позиций фактор *col I*, устойчиво существующий в хромосоме, и фактор пола *E. coli* K-12, который в клетках шигелл и *Serratia* никакого взаимодействия с хромосомой не обнаруживает, также отнесены к эписомам. Состоят эписомы из ДНК. Описано несколько различных видов эписом.

Умеренные фаги. У этих фагов мутации в локусе C_1 , блокирующие синтез репрессора, переводят вирус в вирулентное состояние, вследствие чего он выходит из хромосомы в цитоплазму и теперь уже не может лизогенизировать бактерии. Другие мутации, затрагивающие гены, ответственные за репродукцию профага, ведут к утрате фагом вирусных свойств; такой фаг может существовать только в бактериальной хромосоме, в устойчивой связи с определенным хромосомным локусом и обеспечивает иммунитет к специфической фаговой инфекции.

Фактор пола (F). Половые факторы, каково бы ни было их происхождение, мало отличаются от умеренных бактериофагов. Трансдуцирующие фаги ведут себя как половые факторы, так как участвуют в генетическом переносе и рекомбинации у бактерий.

Факторы колициногенности (Col^+). Ими наделены колициногенные бактерии, продуцирующие *колицины**, которые убивают без лизиса бактерий рода эшерихия, сальмонелла и шигелла. Колициногенные бактерии могут образовывать один или несколько колицинов; к действию собственных колицинов они иммунны. С учетом разной специфичности и различных антигенных свойств колицины

* Поскольку подобные колицинам антибиотики образуют не только *E. coli*, но и другие бактерии, то применяют более широкий термин «бактериоцины»

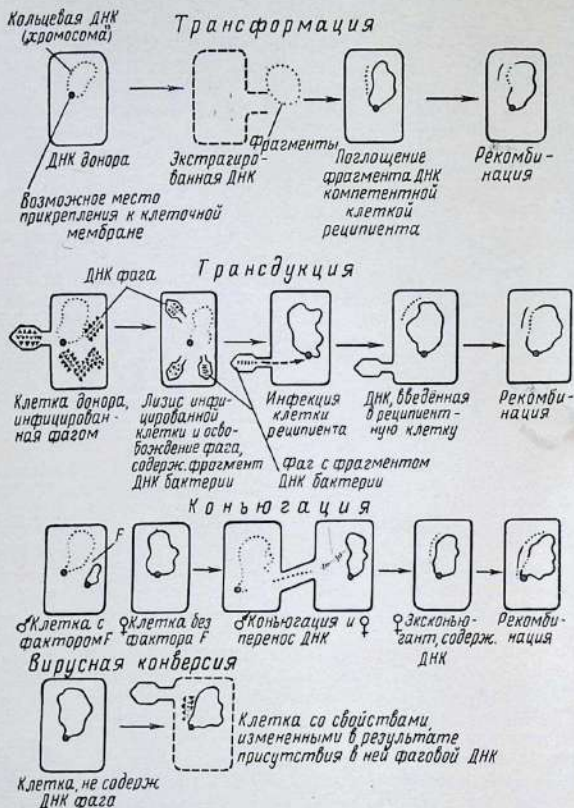


Рис. 32. Схематическое изображение четырех различных типов переноса генетической информации у бактерии по Брауну (1968).

принято обозначать заглавными буквами латинского алфавита: А, В, С, D, E₁, I, К и др. Колицины прикрепляются к специфическим рецепторам оболочки чувствительных бактерий. Довольно часто встречаются мутанты, устойчивые к колицинам. Явление колициногенности сходно с состоянием лизогении, но молекулы колицина не репродуцируются. Некоторые эписомы Col⁺ индуцируются ультрафиолетом; такие бактерии в процессе биосинтеза колицина погибают. Способность передавать отдельные детерминанты определенных колицинов зарегистрирована у кишечных бактерий, а также у представителей рода сальмонелла и шигелла. Передача осуществляется в течение двух минут от бактерии Col⁺ бактериям Col⁻.

Установлено, что детерминанты колицинов I и E₁ автономны, размещаются в цитоплазме колициногенных бактерий, детерминанта I, кроме того, наделена свойствами полового фактора, обеспечивающего конъюгацию донорских и реципиентных клеток. Оказалось также, что детерминанта колицина E₁ усиливает результативность процесса конъюгации у микробов мышиного тифа, обусловленного детерминантой I, при этом в реципиентные клетки Col⁻ проникают довольно значительные фрагменты донорской хромосомы. То же наблюдалось и при попадании Col I в F⁻ E. coli K-12.

Место локализации детерминант Col⁺-признака на хромосоме колициногенных бактерий не установлено. Детерминанты I, E₁, E₂ состоят из 10⁴—10⁵ пар нуклеотидов каждый и имеют структуру, сходную с F-фактором и профагом.

Фактор множественной резистентности. Японские ученые установили, что множественная резистентность бактерий к стрептомицину (S), хлорамфениколу (C), тетрациклину (T) и сульфаниламидам (Su) передается при участии своеобразного полового фактора *передачи устойчивости*, или *трансфер фактора* (RTF). Трансфер фактор весьма напоминает Col I и F⁺ E. coli K-12.

Помимо передачи устойчивости сразу ко всем четырем лекарственным препаратам: Su—S—C—T, встречается и ограниченная передача: Su—S—C, Su—S—T, C—T, Su—S, T, S и C. Следовательно, практически вместо одного детерминанта имеются четыре, ответственные за передачу резистентности к трем антибиотикам и сульфаниламиду.

Множественная резистентность обуславливается генетическими структурами, сцепленными с некой областью, обеспечивающей конъюгацию клеток. Эти структуры ответственны за образование ферментов, разрушающих антибиотики. Лучше всего множественная резистентность передается от E. coli F⁺ или Hfr, E. coli F⁻, а также шигеллам, хуже сальмонеллам. Описана передача множественной резистентности в порядке: шигеллы → сальмонеллы → эшерихии → клебсиеллы → Proteus. Однако передача устойчивости штамма к штамму E. coli происходит и без участия F⁺-фактора. Поэтому RTF сам может обеспечивать свой перенос в реципиентную клетку.

Подобно фактору пола у кишечных бактерий эписома RTF элиминируется акридином и акрифлавином, и RTF⁻-клетки становятся RTF⁻ или реципиентными клетками. Следовательно, названная эпи-

сома размещается в бактериях автономно, в цитоплазме (как и фактор пола) и реплицируется независимо от хромосомы бактерии. Установлено также, что конъюгация может идти не только за счет Hg и F⁺-клеток, но и за счет носителей RTF. Эта последняя не подавляет передачи Col I. Занимает ли RTF какое-либо место на бактериальной хромосоме не известно. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что подобная локализация их возможна. В одном случае RTF локализовалась в бактериальной хромосоме поблизости от полового фактора, то есть на конце хромосомы.

Факторы множественной резистентности широко распространены среди штаммов нормальной кишечной микрофлоры. Именно от них они и перешли к патогенным микроорганизмам.

В 1967—1969 гг. установлено, что образование α - и β -гемолизинов энтеробактерий также контролируется эписомами.

В 1969 г. дополнительные единицы наследственности, располагающиеся отдельно от хромосом, предложено называть экстрахромосомными элементами, или *плазмидами*. Эписомы относятся к тем плазмидам, которые интегрируются с хромосомой и могут быть в автономном состоянии. Различают трансмиссивные и нетрансмиссивные плазмиды. Пенициллиновые и тетрациклиновые плазмиды стафилококков сходны с эписомами грамотрицательных бактерий, но не передаются путем конъюгации, они нетрансмиссивны.

Часть вторая

ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ВИРУСОЛОГИИ

Вирусология зародилась в конце XIX столетия после опубликования работы (1892) Д. И. Ивановского о мозаичной болезни табака, где приводятся убедительные доказательства о том, что мозаичная болезнь табака вызывается мельчайшим микроорганизмом, невидимым в составные микроскопы и проходящим через бактериальные фильтры.

Вскоре Д. И. Ивановский доказал, что болезнь заразна и передается от пораженного ею растения к здоровым. В то время было уже известно, что заразные болезни человека, животных и растений вызываются бактериями и грибами. Однако Д. И. Ивановский их не обнаружил. Продолжая свои исследования, он совершенно по-новому подошел к установлению природы этой болезни. Он пропустил сок больных растений через фильтры, не пропускавшие мельчайших бактерий, и ввел профильтрованный сок здоровым растениям. На листьях табака появились поражения, типичные для заболевания табачной мозаикой. Д. И. Ивановский пришел к заключению, что в фильтрате содержится мельчайший микроб, размеры которого лежат за пределами видимости в световом микроскопе. Этот микроорганизм не удалось культивировать на искусственных питательных средах.

Открытие Д. И. Ивановского вскоре было подтверждено исследованиями, проведенными в других лабораториях. Его повторил и голландский ученый М. Бейеринк. Однако он полагал, что мозаичная болезнь табака вызывается не микроорганизмом, а веществом, «жидкой заразой». Терпеливо и методично Д. И. Ивановский доказывает, что возбудитель мозаичной болезни табака не фермент, а живое существо, проходящее через бактериальные фильтры и способное размножаться только в клетке. Он первый понял, что это особая группа возбудителей инфекционных болезней. В ходе исследований Ивановский делает новое открытие: в листьях, пораженных возбудителем табачной мозаики, обнаруживает мелкие кристаллы. Через сорок лет американский вирусолог У. Стенли изучил эти кристаллы и доказал, что они представляют собой скопления вируса табачной мозаики.

Между тем все новые и новые факты подтверждают, что Д. И. Ивановский открыл новый мир живых существ — вирусы. Ф. Леффлер и П. Фрош (1898—1899), применив методику ультрафильтрации Д. И. Ивановского, установили, что ящур также вызывается вирусом. В 1911 г. П. Раус доказывает, что саркома кур — вирусное заболевание. Туорт (1915) и Д'Эррель (1917) обнаруживают, что бактерии могут поражаться вирусами — бактериофагами. Последние, размножаясь в бактериях, лизируют и вызывают их гибель.

Величайшая заслуга Д. И. Ивановского заключается не только в том, что он открыл первый вирус и первым понял, что встретился с особой категорией возбудителей болезней, но также и в том, что он первым сформулировал основные признаки вирусов (мельчайшие размеры и проходимость через бактериальные фильтры, внутриклеточный паразитизм и неспособность размножаться на искусственных питательных средах), которые долгое время были основными критериями при определении вирусной природы возбудителей болезней.

Д. И. Ивановский не только открыл новую форму существования жизни — вирусы, но своими выдающимися исследованиями заложил основы ряду направлений, разработка которых сыграла огромное значение в формировании и развитии современной вирусологии. Им были заложены основы цитопатологии вирусных инфекций, ему принадлежит постановка проблемы природы вирусов и фильтрующихся форм микробов. Им впервые было установлено важное значение латентного вирусоносительства.

Д. И. Ивановский, естественно, не мог тогда видеть всех огромных последствий, вытекающих из сделанных им выдающихся наблюдений. Полное признание огромных

заслуг этого ученого, как основателя вирусологии, пришло после его смерти. Ныне приоритет его в открытии вирусов признан во всем мире.

За последние три десятилетия открыто несколько сотен новых вирусов, вызывающих инфекции у человека, животных, растений, насекомых и бактерий. Среди них большая группа арбовирусов (японского и клещевого энцефалитов, восточного и западного лошадиных энцефаломелитов, шотландского энцефалита овец, везикулярного стоматита и др.), миксовирусов (гриппа человека, свиней, лошадей, птиц, классической чумы птиц, болезни Ньюкасла, чумы крупного рогатого скота, чумы собак), парамиксовирусы, пикорнавирусы (полномелита, ЕСНО, коксаки, вирус болезни Тешена, диареи крупного скота), реовирусы, аденовирусы, нитавирусы (герпес вирусы), вирусы группы оспы (оспы человека, коров, кроликов, овец, лошадей, верблюдов, птиц), вирусы гепатита (собак, человека, утят, лисиц) и др.

В настоящее время известно свыше 500 болезней, вызываемых зоолатогенными вирусами. Многие из них являются возбудителями широко распространенных болезней. Обнаружен ряд онкогенных вирусов, вызывающих злокачественные опухоли у животных (лейкозы птиц, мышей, рак молочных желез у мышей). Большой прогресс достигнут в изучении бактериофагов и вирусов растений.

Вирусы наносят огромный ущерб человечеству. Вирусные болезни намного превышают ущерб, наносимый заболеваниями, вызываемыми бактериями, грибами и простейшими. К особо опасным вирусным болезням животных относят ящур, чуму рогатого скота, чуму свиней, птиц и др. Вирусология имеет не только большое практическое значение для здравоохранения и сельского хозяйства, но и представляет огромный теоретический интерес для биологии, генетики, биохимии и других отраслей естествознания.

За последние 20 лет исследования химиков, физиков, вирусологов и других специалистов привели к углублению знаний о химическом составе, структуре и механизме репродукции вирусов, к установлению определяющей роли нуклеиновых кислот в хранении и передаче генетической информации, а также к выяснению взаимосвязи между их молекулярной структурой и функцией. Эти успехи явились следствием применения новых методов исследования: электронных микроскопов, культуры клеток и синтетических питательных сред для их выращивания, сверхскоростных центрифуг, люминисцентной микроскопии, радиоактивных изотопов, а также других новых приборов и методов, необходимых для точных наблюдений за биосинтезом компонентов вируса и изменениями пораженных вирусами клеток. Многие данные, полученные при изучении структуры и функции вирусов, легли в основу молекулярной биологии.

Учение о вирусах сформировалось в самостоятельную науку, занимающуюся изучением природы, строением и функцией особого класса живых микроскопических существ — облигатных внутриклеточных паразитов, обладающих рядом кардинальных специфических свойств, отличающих их от всех других живых существ, обладающих клеточной структурой. Эти субклеточные формы жизни в силу фундаментальных отличий от других живых существ, о которых будет сказано в последующих главах, занимают особое место в мире живых существ, находясь на границе живого и неживого царства.

Глава 7. СТРОЕНИЕ И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРУСОВ

Морфология и структура вирусов. Морфология вирусов. По внешнему виду вирусы делят на сферические, или шарообразные, кубические, палочковидные, или нитевидные, и сперматоподобные (рис. 33).

При некоторых вирусных инфекциях (бешенство, оспа и др.) в цитоплазме или ядре пораженной вирусом клетке образуются особые, специфические для каждой инфекции внутриклеточные включения, значительно превосходящие по величине вирус и видимые в световой микроскоп. Это колонии вирусов. Обнаружение их в клетке имеет

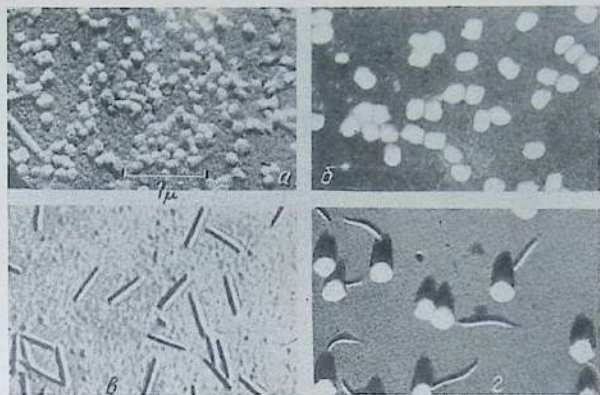


Рис. 33. Морфология вирусов:

а — вирус гриппа; б — вирус осповакцины; в — вирус табачной мозаики; г — бактериофаг.

большое значение при диагностике бешенства, оспы и других инфекций. Отдельные виды вирусов, преимущественно вирусы растений, образуют в клетках кристаллические образования (кристаллы Ивановского). Их можно растворить, и из раствора выделяется вирус в аморфном, не кристаллическом состоянии, обладающий инфекционными свойствами. В каждом кристалле содержится до 1 млн. вирионов. Из зоопатогенных вирусов в кристаллическом виде пока получен вирус полиомиелита.

Размеры вирусов колеблются в широких пределах. Мельчайшие из них (вирусы полиомиелита, ящюра, энцефалитов) имеют в диаметре около 20—30 мк (миллимикрон) и приближаются по величине к белковым молекулам, а крупные вирусы (вирусы оспы, герпеса, плевропневмонии) по размерам близки к мельчайшим бактериям (рис. 34). Размер вирусов определяют ультрафильтрацией, ультрацентрифугированием и электронноскопией. Каждым из этих методов получены более или менее сходные результаты, однако наиболее точным является электронноскопия высоко очищенного вируса.

Структура вирусов. По данным электронноскопических, рентгенологических и химических исследований центральная часть вируса (нуклеоид или нуклеокапсид) представляет собой нуклеиновую кислоту, упакованную в оболочку (капсиду), образованную из белковых спирализованных нитей или свернувшихся в клубок шаровидных субъединиц — капсомер (греч. *capsa* — коробка). Капсида состоит из определенного для данного семейства и вида вируса капсомеров, расположенных в ней в определенном порядке и видимых в электронном микроскопе.

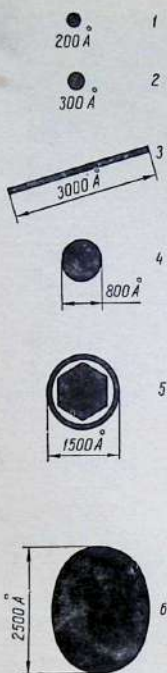


Рис. 34. Сравнительные размеры вирусов:

1 — колифаг; 2 — вирус полиомиелита; 3 — вирус табачной мозаики; 4 — вирус гриппа; 5 — вирус герпеса; 6 — вирус оспы.

В зависимости от укладки капсомеров в капсиде вирусы делят на три группы: 1) вирусы, обладающие спиральной симметрией; 2) вирусы, обладающие кубической симметрией; 3) вирусы, имеющие комбинированную симметрию. У первых капсомеры расположены в виде спирали, нуклеиновая кислота (преимущественно РНК) которых также скручена в виде пружинки, располагаясь между витками белковых молекул, например вирус табачной мозаики (рис. 35). Из животных вирусов спиральной симметрией обладают миксовирусы (гриппа, истинной чумы птиц, Ньюкаслской болезни, паротита), контагиозного пустулезного дерматита овец, вецикулярного стоматита крупного рогатого скота. У вирусов, обладающих кубической симметрией, капсомеры расположены в виде правильного многогранника со скрученной в клубок нитью ДНК или РНК (аденовирусы, вирусы герпеса, реовирусы, пикорнавирусы (рис. 36). Капсиды сферических вирусов относятся к икосаэдрическому типу симметрии (икосаэдр по греч. *eicosi* — двадцать), то есть они имеют форму двадцатигранника, каждая грань которого представлена треугольником. На каждой стороне треугольника могут располагаться 2, 3, 4, 5 и более капсомеров.

Число капсомеров у различных видов вирусов различно и колеблется от 12 (бактериофаг ФХ174) до нескольких сотен и более. Капсиды вирусов полиомы, ОВ-40, папилломы Шона состоят из 42 капсомеров, вируса полиомиелита — 60, реовируса — 92, герпеса и ветряной оспы, ларинготрахеита — 162, аденовируса — 252, а капсид вируса табачной мозаики содержит 2250 капсомеров (табл. 3). У вируса полиомиелита, например, все 60 капсомеров объединены в 12 групп (по 5 капсомеров в каждой), а у вируса табачной мозаики 2250 капсомеров расположены в виде 130 витков, вокруг стержня нуклеиновой кислоты.

Каждый капсомер у ВТМ представляет собой полипептидную цепочку, состоящую из 158 аминокислот, расположенных в строго определенном порядке. Строение, подобное вирусу полиомиелита и табачной мозаики, имеют и другие мелкие вирусы животных, человека и растений.

Капсид предохраняет нуклеиновую кислоту от неблагоприятных воздействий внешней среды, обеспечивает адсорбцию вируса на клетке благодаря средству рецепторов, расположенных на ее по-

Основные сведения о структуре вирусов

Группа	Нуклеиновая кислота		Тип симметрии	число капсомеров	Оболочка	Размер вириона (нм)	Важнейшие представители семейства
	тип	число витов					
Вирусы растений	РНК	Одна	Спиральная	2250	—	30	Вирусы табачной мозаики, мозаики картофеля, мозаики клевера
Миксовирусы	>	>	>	2000	+	80—150	Вирусы гриппа лошадей, свиней, птиц, человека, классической чумы птиц. Паратриппозные вирусы (1—4 типы), вирусы паротита, болезни Ньюкаста, чумы рога того скота, чумы собак, африканской чумы свиней, бешенства, лейкоза птиц, инфекционного бронхита птиц, кори.
Пикорнавирусы	>	>	Кублическая	60—92	—	20—30	Вирусы полиомиелита (три типа), коксаки А и В, ящура А, О, С, Азия I, риновирусы, ЭСНО (крупного рога того скота, свиней, человека, обезьян), энцефаломногокардита лошадей
Реовирусы	>	Две	>	92	—	70—80	Типы 1, 2, 3
Арбовирусы	>	Одна	Неизвестно	Неизвестно	+	20—100	Вирусы энцефаломиелитов лошадей (западный, восточный, венесуэльский); энцефалитов (клещевой, шотландский, японский, долины Морея); желтой лихорадки

Группа	Нуклеиновая кислота		Тип симметрии	Число классификационных классов	Оболочка	Размер парномера (нм)	Важнейшие представители семейства
	тип	число нитей					
Половоявирусы	ДНК	Две	Кубическая	42	—	30—50	Вирусы полиома, папилломы кроликов, миксомы кроликов, ОВ-40, вирус бородавок
Аденовирусы	>	>	>	252	+	80	Аденовирусы крупного рогатого скота, обезьян, человека
Герпеса	>	>	>	162	+	150—260	Вирусы герпеса простого, герпеса симплекса, ветряной оспы, обезьяньего герпеса (вирус В), герпеса свиней (болезнь Ауески), ларинготрахеита крупного рогатого скота, вирус цитомегалии, инфекционного ларинготрахеита птиц, псевдобешенства
Поксвирусы	>	>	Неизвестно	Неизвестно	+	200—300	Вирусы натуральной оспы, оспавакцины, оспы коров, лошадей, свиней и овец; вирус экстремелии
Фаги	>	Одна	Кубическая	12	—	240	Φ × 174
	>	>	Спиральная		—		fd
	>	Две	Комплексная		—		T2, T4, T6

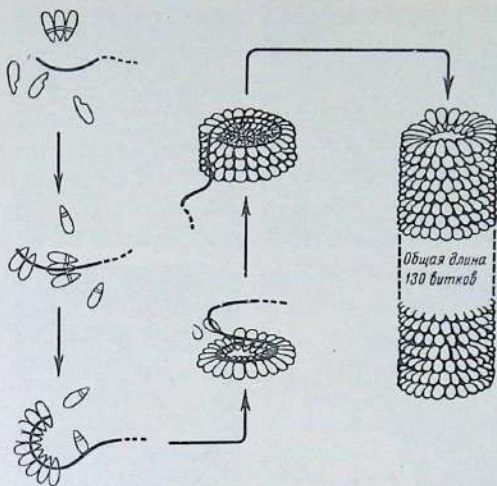


Рис. 35. Схема укладки капсомеров у вируса табачной мозаики вокруг нити РНК.

верхности. С капсидом связаны антигенные и иммуногенные свойства вируса.

Наиболее простую структуру имеют мелкие РНК-содержащие вирусы. Они состоят из двух компонентов — РНК и белков (полиомиелит, ящур и др.). Более сложная структура у вирусов средних и крупных размеров (миксовирусы, осповакцина, аденовирусы, герпес). У них, кроме капсиды, имеется внешняя оболочка (рис. 37, 38), в которой, помимо белков, содержатся углеводы, липиды, а у вируса гриппа и других миксовирусов обнаружены компоненты клеточного хозяина (белки, липиды, углеводы) и фермент нейраминидаза (рис. 39). В центральной части этих вирусов расположен нуклеопротеид (нуклеоид), в котором содержится РНК. Белок нуклеоида (S-антигена) серологически отличен от белка внешней оболочки (V-антигена). Размер нуклеоида, например, у вируса гриппа около 80 мк в диаметре, а внешней оболочки — 100—150 мк. Структурно нуклеоид представляет спирально уложенные вокруг РНК белковые субъединицы, свернутые в клубок. Однако вопрос о степени упорядоченности и симметричности укладки нуклеопротеида в вирионе миксовирусов еще окончательно не выяснен.

Вирусные белки, входящие в состав внешней оболочки, образуют комплексы с липидами (липопротеиды) и с углеводами (мукопротеиды).

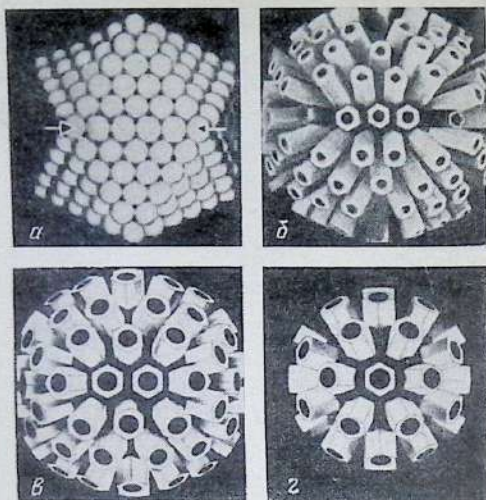


Рис. 36. Модели укладки капсомеров:

a — аденовирус; *b* — вирус герпеса; *в* — реовирус; *г* — вирус полиомы

Внешняя оболочка миксовируса содержит около 2000 белковых субъединиц, расположенных в виде цепи шипов, включающих гемагглютинин. Менее изучена структура арбовирусов. Известно, что они принадлежат к РНК-вирусам, нуклеиновая кислота которых свернута в виде клубка, как у миксовирусов. Оболочка, кроме белков, содержит липиды, количество которых у некоторых видов арбовирусов составляет около 50%.

Одним из наиболее крупных и сложно устроенных вирусов позвоночных является вирус осповакцины. Вирус имеет внешнюю оболочку, состоящую из трех слоев. Непосредственно под оболочкой расположены два белковых тела. В центре вириона находится нуклеоид, в состав которого входит внутренний белок и вирусная ДНК. В вирионе осповакцины обнаружено 17 белков. Еще более сложно устроены некоторые фаги



Рис. 37. Схема структуры вируса герпеса:

(T2, T4, T6). Головка у так называемых Т-четных фагов имеет двадцатигранную форму (рис. 40). Под белковой оболочкой головки находится нуклеиновая кислота (ДНК и редко РНК). Хвостовая его часть представляет собой цилиндр, дистальная часть которого состоит из тонких волокон. Все элементы отростка фага белковые. Бактериофаги другой формы (палочковидной, шаровидной) встречаются значительно реже.

Химический состав и биохимические свойства вирусов. Основные компоненты вирусов — белки и нуклеиновая кислота. Сложные по структуре вирусы содержат еще липиды и углеводы, а некоторые из них — ферменты. В зависимости от вида вируса содержание каждого компонента достигает больших различий. Так, количество белка колеблется от 50 до 90%, нуклеиновой кислоты — от 1 до 40%, углеводов — от 0 до 22%, липидов — от 0 до 50% (и более) (табл. 4). Липиды, углеводы и ферменты имеются далеко не у всех вирусов (вирусы животных и человека).

Белки вирусов. По элементарному и аминокислотному составу вирусные белки принципиально не отличаются от состава белков микроорганизмов, растений и животных. Они относятся к высокомолекулярным белкам — глобулинам. В них преобладают нейтральные и кислые дикарбоновые кислоты и все они представлены 1-изомерами. В их составе обнаружено 16—18 аминокислот. Изозлектрические точки вирусных белков расположены в кислой или слабокислой зоне рН (рН 3,5—6,0). Видовые, а иногда и штаммовые различия вирусов определяются аминокислотным составом белков, а также их вторичной, третичной и четвертичной структурой. Однако чаще различия обнаруживаются в количественном содержании той или иной аминокислоты, качественные же различия в аминокислотном составе отмечаются редко.

Вирусные белки по своим свойствам гетерогенные. В составе вирионов разных видов вирусов может находиться от нескольких до 20 и более различных белков (осповакцина). У вируса гриппа обнаружено пять белков, разделяемых электрофорезом (гемагглютинин, нейраминидаза, S-антиген и др.). Белки, входящие в состав оболочки вируса и S-антигена, отличаются по аминокислотному составу, иммунологическими и физико-химическими свойствами. Так, оболочечные белки миксовирусов вызывают агглютинацию эритроцитов и гемадсорбцию, а белок S-антигена этими свойствами не обладает. В составе оболочки

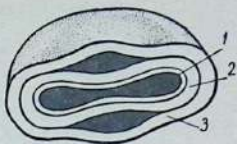


Рис. 38. Поперечный разрез вируса осповакцины:

1 — нуклеоид; 2 — капсид;
3 — внешняя оболочка.

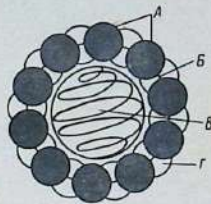


Рис. 39. Схема структуры миксовирусов:

A — гемагглютинин; B — липопротеид; B — нуклеиновая кислота; Г — фермент нейраминидаза.

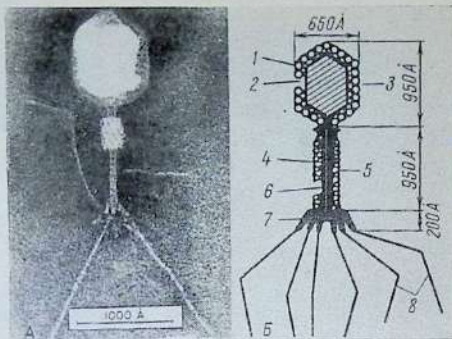


Рис. 40. Структура бактериофага T2:

А — электронноскопическое изображение; Б — схема структуры фага T2; 1 — белковая субъединица; 2 — ДНК; 3 — головка; 4 — футляр; 5 — отросток; 6 — стержень; 7 — пластинка с шестью зубцами; 8 — нити отростка.

миксовирусов обнаружены видоспецифические белки клеток, в которых они размножались. Эти белки не удается удалить из высокоочищенных препаратов вирусов, но они утрачиваются после одного пассажа вируса на другом виде организма или ткани.

Таблица 4

Химический состав вирусов (в %)

Вирус	Белок	Нуклеиновая кислота		Углеводы	Липиды
		РНК	ДНК		
Табачной мозаики	94,4	5,6	0	0	0
Гриппа А	60—70	0,8—1,0	0	12,5	23,4
Болезни Ньюкасла	61,8	4,0	0	7,0	27,0
Чумы птиц	63,2	1,8	0	17,0	23,5
Ящюра	—	40,0	0	0	0
Энцефаломелита лошадей	49,1	4,4	0	4,0	54,0
Полиомиелита	74	26,0	0	0	0
Саркомы Рауса	—	10,0	0	4,5—15,7	39—57,0
Осповакцины	89,0	0	5,0	2,0	4,0
Папилломы	90,0	0	6,8	6,5	1,5
Миксомы кроликов	58,7	0	1,1	—	30,0
Герпеса	70,0	0	6,5	22,0	0,6
Аденовирусы	—	0	30,0	0	0
Бактериофаги кишечной палочки	52,4	—	44—50	11,7	+

Условные обозначения: тире означает отсутствие данных; нуль — отсутствие компонента; плюс — компонент содержится, но в неизвестном количестве.

Белковая оболочка вирусов относительно устойчива к протеазам. Однако чувствительность к разным ферментам неодинакова. Так, вирус осповакцины устойчив к трипсину и химотрипсину, но сравнительно быстро переваривается папаином. Устойчивость вирионов к протеолитическим ферментам объясняется их структурными особенностями и имеет приспособительное значение, так как вирусы репродуцируются в клетках, содержащих большое число протеолитических ферментов.

Одна из существенных особенностей вирусных белков состоит в том, что их субъединицы активно взаимодействуют между собой и способны к самосборке (агрегации), в результате которой из вирусных РНК и белков вируса *in vitro* реконструируются полноценные вирионы.

В и р у с н ы е ф е р м е н т ы. Вирусы почти лишены ферментативной функции. Исключение составляют лишь некоторые наиболее сложно устроенные вирусы позвоночных (миксовирусы, вирусы герпеса и миелобластома) и Т-четные фаги, обладающие лизоцимной и АТФазной активностью.

Первые достоверные сведения о ферментативной активности вирусов позвоночных были получены Херстом (1942, 1950), установившим ферментную природу открытого им явления элюции (десорбции) вируса гриппа с агглютинированных им эритроцитов. При этом после элюции вируса с поверхности эритроцитов последние утрачивают способность повторно агглютинироваться этим же или близкородственным вирусом. В основе данного явления лежит ферментативный процесс, вызванный присутствующим в структуре вириона ферментом нейраминидазой. Аналогичного типа фермент, получивший название RDE (рецепторразрушающий энзим), был обнаружен в фильтрате бульонной культуры холерного вибриона (Бернет и Стоун, 1947), обработка которым эритроцитов лишала их способности агглютинироваться вирусом гриппа. Изучение этого вопроса привело к заключению, что причиной элюции вируса с поверхности эритроцита является разрушение мукопротеидных рецепторов клетки, на которых он адсорбируется. В состав этих рецепторов входит нейраминная кислота, соединенная посредством гликозидной связи с пептидной частью рецептора. Нейраминидаза разрывает эту связь и отщепляет нейраминную кислоту. После разрушения клеточных рецепторов клетка утрачивает способность адсорбировать вирус, а если он был адсорбирован на ее поверхности, то элюирует с нее.

Вирусная нейраминидаза — один из структурных компонентов миксовируса, входящий в состав оболочки вириона. Синтез ее происходит в инфицированной клетке под контролем генома вируса. Выделенная в чистом виде нейраминидаза представляет собой полипептид, содержание которого у разных штаммов миксовирусов существенно отличается. Нейраминидазная активность миксовирусов — один из характерных генетических признаков, функция которого в развитии вирусной инфекции еще недостаточно выяснена. Существует предположение, что вирусная нейраминидаза способствует проникновению вируса в клетку. Согласно другой гипотезе, функция ее сводится к ос-

вобождению вируса из клетки. При этом допускается, что вирус покидает ее через вызванные ферментом деструктивно измененные участки клеточной мембраны. В связи с тем, что многие детали процесса выхода вирусов позвоночных, так же как и проникновение их в клетку, еще предстоит выяснять, преждевременно поэтому отдавать предпочтение какой-либо точки зрения о роли нейраминидазы в развитии вирусной инфекции.

Природа ферментативной активности вирусов герпеса и миеобластоза (лейкоза птиц) еще менее выяснена, чем нейраминидазной активности миксовирусов. Является ли присутствующая в вирионе АТФаза (аденозинтрифосфатаза) составной частью вируса, синтез которого контролируется его геномом, или же она синтезируется нормальной клеткой и включается в структуру вириона во время сборки его, остается не ясным. Не выяснена также функция этого фермента в развитии вирусной инфекции.

Нуклеиновые кислоты вирусов. Общие сведения о структуре и функциях нуклеиновых кислот приведены в главе 5. В данном разделе содержатся данные о некоторых особенностях макромолекулярной структуры и инфекционных свойствах нуклеиновых кислот вирусов.

Каждый вирион имеет одну из двух нуклеиновых кислот — дезоксирибонуклеиновую (ДНК) или рибонуклеиновую (РНК). У вируса табачной мозаики, например, молекула РНК представляет собой нить одноцепочечного полинуклеотида, в форме спирали, образованную из 6000 нуклеотидов. Молекула ДНК фага состоит из 200 000 пар нуклеотидов, а у вируса осповакцины их в 2 раза больше. Содержание нуклеиновой кислоты в вирионе разных видов вирусов колеблется от 1 до 40% (табл. 5).

Вирусы, содержащие РНК, составляют наиболее многочисленную группу, в которую входят вирусы растений, большая часть вирусов животных и человека, а также некоторые бактериофаги. К вирусам, содержащим ДНК, относят большинство бактериофагов, ряд животных вирусов и большинство вирусов насекомых (см. табл. 3).

Вирусные нуклеиновые кислоты отличаются от клеточных нуклеиновых кислот не только в функциональном, но и в структурном отношении. Каковы же эти отличия? Как известно, материальная основа наследственности у клеточных форм жизни представлена двуцепочечной молекулой ДНК, а у некоторых видов вирусов, например бактериофагов ФХ174 и fd, обнаружена одноцепочечная ДНК. Носителем наследственных свойств у некоторых вирусов является двуцепочечная молекула РНК (реовирус и, возможно, вирусы саркомы Рауса и миеобластоза птиц).

Вирусные нуклеиновые кислоты могут отличаться от клеточных нуклеиновых кислот и по составу входящих в них азотистых оснований. Так, у бактериофагов Т-четной группы и некоторых видов дизентерийных фагов в составе ДНК обнаружен 5-оксиметилцитозин, полностью замещающий цитозин, у бактериофагов *Bac. subtilis* — азотистое основание — 5-оксиметилурацил, полностью замещающий тимин

в ДНК некоторых фагов. И, наконец, у трансдуцирующего бактериофага *Bac. subtilis* в составе ДНК обнаружен урацил, то есть основание, являющееся обязательным компонентом РНК.

Таблица 5

Содержание нуклеиновых кислот у вирусов

Группа	Вид вируса	ДНК		РНК	
		в %	молекулярный вес (10^6)	в %	молекулярный вес (10^6)
Бактериофаги	Колифаги T2, T4, T6	48—50,0	123—130,0	—	—
	$\Phi \times 174$	25,0	1,5	—	—
Вирусы позвоночных, содержащие ДНК	Осповакцины	6,0	150,0	—	—
	Аденовирусы	11,3—13,0	23,0	—	—
	Папилломы	12,0	5,3	—	—
	Шоупа Герпеса	—	60,0	—	—
Вирусы позвоночных, содержащие РНК	Поллиомелита	—	—	25,0	1,8
	Ящура	—	—	40,0	3,1
	Восточного энцефаломелита лошадей	—	—	4,4	2,2
	Ньюкаслской болезни	—	—	—	6,8
	Гриппа	—	—	1,0	2,3
Вирусы растений, содержащие РНК	Табачной мозаики	—	—	5,7	2,2
	Желтой мозаики турнепса	—	—	35,0	2,0

Структурные отличия нуклеиновых кислот вирусов отмечены и при изучении сахарного компонента ДНК некоторых вирусов. Известно, что в клеточной ДНК и ДНК большинства вирусов сахарный компонент представлен дезоксирибозой. При изучении Т-четных фагов в составе их ДНК вместо дезоксирибозы обнаружена глюкоза. Выяснилось, что глюкоза не входит в сахарофосфорный каркас молекулы, а представлена в форме моно- и диглюкозида оксиметилцитидиловой кислоты.

Одно из наиболее существенных отличий вирусных нуклеиновых кислот от клеточных то, что из ряда вирусов путем их депротеинизации выделены РНК и ДНК, обладающие инфекционными свойствами. Под инфекционными свойствами нуклеиновых кислот понимается их способность вызывать репродукцию полноценного вируса. Первые сведения об инфекционности РНК были получены при изучении РНК вируса табачной мозаики (ВТМ), выделенной из листьев табака при обработке насыщенным водным раствором фенола. Вначале предполагалось, что инфекционность ее связана с примесями целых или частично разрушенных вирионов, но сохранивших остаточную инфекционность. Электронноскопические, серологические, электрофоретические и химические исследования ответили эти сомнения. Неразрушенных вирионов в препаратах РНК не обнаружено. Одним из основных доказательств, что инфекционность связана с РНК, служат данные об

инактивирующем действии РНКазы на препараты, содержащие вирусную РНК. РНКаза не инактивирует вне организма инфекционную активность вируса, в то же время она инактивирует инфекционность вирусной РНК. Протеолитические ферменты не инактивируют ее инфекционность. Специфические гамма-глобулины нейтрализуют вирус и не лишают инфекционности вирусные нуклеиновые кислоты.

В настоящее время инфекционные нуклеиновые кислоты выделены из ряда вирусов животных и человека (табл. 6).

Таблица 6

Вирусы, из которых выделены инфекционные нуклеиновые кислоты

РНК-содержащие вирусы			ДНК-содержащие вирусы
Арбовирусы	Пикорнавирусы	Миксовирусы	Паповавирусы
Восточного лошадиного энцефаломиелиита Западного лошадиного энцефаломиелиита Венесуэльского лошадиного энцефаломиелиита Клебселевого энцефалита Японского энцефалита Энцефаломиокардита мышей Желтой лихорадки Лихорадки Денге Энцефалита Муррей Лесов Семлики Менго Западного Нила	Полиомиелита	Гриппа А	Полиома мышей
	Коксаки А (7, 9)	Саркомы Рауса	Обезьяний вирус SV 40
	Коксаки В (1, 4, 5)	Лейкоза мышей	Папилломы Шоупа
	ЕСНО (1,8) Ящура		Аденовирус (тип 3)

Инфекционность их наблюдалась при введении животным, куриным эмбрионам и в культуру клеток, восприимчивых и невосприимчивых животных. Вирусные нуклеиновые кислоты животных вирусов обладают относительно слабой инфекционностью. Их активность составляет 0,1—1% активности соответствующих вирусных суспензий, из которых они были получены. Наиболее активная РНК была выделена из вирусов полиомиелита, инфекционность которой была 8×10^8 пятнообразующих доз в 1 мл. Вирусная РНК способна проникать в нечувствительные к вирусу клетки и репродуцироваться в них. Однако вновь образованные вирионы, так же как и вирус исходного штамма, при пассировании не способны к репродукции в этих клетках.

Об инфекционности РНК миксовирусов, в частности вируса гриппа, до последнего времени были получены противоречивые данные. В некоторых работах сообщалось о не систематическом выделении инфекционной РНК из вируса гриппа, в исследованиях других авторов были получены отрицательные результаты.

Исследования последних лет показали, что при изменении методики выделения РНК, а также методики выявления инфекционности ее удается регулярно получать препараты РНК вируса гриппа, обладающие инфекционной активностью. РНК извлекали из высококонцентрированных и очищенных аллантоиновых культур вируса путем обработки дезоксихолатом натрия и водонасыщенным раствором фенола. Выделенную РНК осаждали на холоду этанолом и перерабатывали в фосфатном буфере с магнием и ДЭАЭ-декстраном. Для выявления инфекционности монослой куриных фибробластов предварительно отмывали 1 М. раствором NaCl и затем обрабатывали ДЭАЭ-декстраном.

Устойчивость вирусов к физическим факторам. Температура. Большинство видов вирусов инактивируется при 56—60° в течение 5—30 минут. Вирус гепатита (в сыворотке) выдерживает 30 минут нагревание до 80°. Температуру выше 65° переживают вирусы папилломы кроликов и фаги. Кишечные вирусы и реовирусы более устойчивы к нагреванию в присутствии MgCl₂, в то время как аденовирусы, вирусы герпеса, оспы-осповакцины разрушаются. Все вирусы хорошо сохраняются в пределах 70° и ниже. Как правило, чем ниже температура замораживания, тем меньше погибает вируса, как в процессе замораживания, так и при последующем хранении. Замораживание при температуре —20° и выше вызывает более значительную гибель вируса, чем замораживание при —30°, а тем более при —76° и ниже. Быстрое замораживание небольших количеств вируса при —190° практически не снижает инфекционности вирусов. Многие вирусы при —20° и ниже сохраняют жизнеспособность от нескольких месяцев до года. Инфекционные титры вирусов падают сразу после замораживания с последующим постепенным снижением при дальнейшем хранении. Гибель вирусов при замораживании можно предотвратить или значительно уменьшить добавлением в культуру вируса белка (куриного желтка или белка, сыворотки, пептона), сахарозы или глюкозы.

Высушивание. Наиболее длительное сохранение вирусов (в течение многих месяцев и лет) достигается их высушиванием под вакуумом из замороженного состояния. Длительность сохранения вирусов в таком виде зависит от его вида, режима сушки и условий хранения.

На стабильность высушенных вирусов при хранении большое влияние оказывают температура хранения, а также состав газовой среды и влажность. Наиболее длительно высушенные вирусы сохраняются в вакууме. Кислород неблагоприятно действует на них: достаточно присутствия небольшого количества кислорода (0,5%), чтобы вызвать значительную гибель вирусов. Длительно сохраняются высушенные вирусы при +4°, —20—40°. При комнатной температуре, а тем более при 37° вирусы быстро погибают.

Ультрафиолетовое излучение. По сравнению с бактериями вирусы более устойчивы к УФ-лучам. Для разных видов вирусов доза и время облучения различны. Наибольшей активностью обладают лучи с длиной волны 2250—2537 Å. Для инактивации неочи-

ценных вирусных суспензий требуется от 200 до 1000 эрг/мм^2 в течение нескольких секунд. Так, для полной инактивации вируса гриппа в аллантоисной жидкости требуется 200 эрг/мм^2 . У некоторых видов вирусов наблюдается фотореактивация: восстановления инфекционной активности у инактивированного УФ-лучами вируса при облучении зараженных клеток видимым светом. Возможность реактивации проявляется не сразу, а по истечении некоторого времени (15—30 минут). Фотореактивация вирусов вне клетки не происходит. Вирусы обладают высокой резистентностью к действию ионизирующей радиации. Достаточно надежная инактивация вирусов ультразвуком достигается при колебаниях выше 200 тыс. и более в секунду.

Устойчивость вирусов к химическим веществам. Устойчивость вирусов к кислотам и щелочам различна. Каждый вид вируса имеет характерную для него зону стабильности, в пределах которой вирионы его сохраняют жизнеспособность. Вирус полиомиелита устойчив к кислотам и щелочам, а другие, наоборот, очень чувствительны к изменениям реакции среды и сохраняют активность только в очень узких пределах концентрации водородных ионов.

Вирусы неодинаковы по устойчивости к химическим соединениям. Все окислители инактивируют вирусы в той или иной степени, а восстановители способствуют их сохранению. Очень хорошо противостоит химическим веществам вирус полиомиелита. Он сохраняется в 0,5%-ном растворе фенола и 50%-ном растворе сернистой кислоты. Эфир, ацетон и танин не инактивируют этот вирус. Однако окислители — перекись водорода, марганцовокислый калий (в 1%-ной концентрации) и концентрированные растворы мочевины его быстро инактивируют. Вирус осповакцины неустойчив и легко обезвреживается фенолом, сулемой, лизолом и другими антисептиками. Вирусы, содержащие липонды (миксовирусы, арбовирусы, осповакцины, герпеса), чувствительны к эфиру, хлороформу и дезоксихолату. Наиболее сильное действие на все вирусы оказывает 5%-ный раствор лизола, инактивирующий, как правило, все вирусы уже через 1—5 минут. Наилучший консервант для большинства вирусов — 50%-ный глицерин, в котором они при $+2^\circ$ сохраняют жизнеспособность месяцами.

Антибиотики на вирусы не действуют, за исключением «вирусов» лимфогранулемы, орнитоза и трахомы, которые поддаются действию пенициллина, биомицина и антибиотиков тетрациклинового ряда. Однако эта группа возбудителей занимает промежуточное положение между риккетсиями и вирусами и не относится к истинным вирусам.

Глава 8. РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

Репродукция вирусов пока еще изучена недостаточно. Однако в последние годы получен ряд принципиально новых данных, раскрывающих основные механизмы этого процесса. Согласно наиболее распространенному представлению цикл репродукции вирусов состоит из трех основных периодов: начального (подготовительного), среднего (латентного) и конечного (заключительного) периода (табл. 7).

Как видно из таблицы, каждый период состоит из нескольких этапов, являющихся обязательными для всех видов вирусов. Однако не у всех вирусов они протекают одинаково. В зависимости от структурных и функциональных особенностей той или иной группы вирусов они будут претерпевать некоторые изменения. Более существенные различия наблюдаются при внедрении в клетку фагов и вирусов позвоночных, в депротенизации и репликации вирусных нуклеиновых кислот.

Таблица 7

Основные этапы репродукции вирусов

Начальный (подготовительный) период	Средний (латентный) период	Конечный (заключительный) период
<ol style="list-style-type: none"> 1. Адсорбция вируса на клетке 2. Проникновение вируса в клетку 3. Депротенизация (освобождение) вирусной нуклеиновой кислоты 	<ol style="list-style-type: none"> 4. Синтез ранних белков: <ol style="list-style-type: none"> а) белков ингибиторов (репрессоров), подавляющих клеточный метаболизм б) белков (полимераз), обеспечивающих синтез вирусных нуклеиновых кислот 5. Синтез компонентов вирусов: <ol style="list-style-type: none"> а) репликация вирусных нуклеиновых кислот б) синтез вирусных структурных белков 	<ol style="list-style-type: none"> 6. Формирование зрелых (инфекционных) вирионов 7. Выход вируса из клетки

В настоящее время наиболее хорошо изучены механизмы репродукции у некоторых видов ДНК (Т-четных) и РНК-содержащих фагов (ФХ174, MS и др.), вируса полиомиелита, арбовирусов, миксовирусов и вируса осповакцины.

Адсорбция вирусов на клетке. В основе адсорбции вирусов на клетке лежат физико-химические процессы, определяющиеся силами адсорбционного (электростатического) взаимодействия, возникающими между разноименно заряженными вирусными и клеточными рецепторами. В связи с тем что вирусы несут отрицательный заряд, а суммарный заряд на поверхности клетки тоже отрицательный, то электростатические силы должны препятствовать столкновению вирусов и клеток. Адсорбция вируса на клетке происходит, по-видимому, благодаря возникновению противоположных зарядов между отдельными участками мембраны клетки и вируса. Эта фаза взаимодействия вируса с клеткой обратима, на ее исход оказывают влияние такие факторы, как рН и солевой состав среды. Так, сульфатированные полисахариды, несущие высокий отрицательный заряд, препятствуют адсорбции вируса на клетке. Чувствительность к ним разных видов вирусов различна.

Второй и главный механизм адсорбции вируса на восприимчивой клетке — взаимодействие рецепторов вируса с соответствующими (комплементарными) рецепторами клетки. Рецепторы вируса и клетки представляют собой специфические структуры, расположенные на

их поверхности. Рецепторами для животных вирусов служат мукопротеиды и липопротеиды. Специфичность взаимодействия рецепторов вируса и клетки видна из того факта, что одни вирусы способны адсорбироваться на мукопротеидных рецепторах (миксовирусы, аденовирусы), а другие — на липопротеидных (пикорнавирусы, арбовирусы и др.). Кроме того, определенные виды вирусов могут адсорбироваться на определенных типах клеток. Так, полиовирусы, как правило, адсорбируются на восприимчивых клетках приматов, но почти не адсорбируются на невосприимчивых клетках. Однако естественно резистентные клетки могут быть инфицированы рибонуклеиновой кислотой вируса полиомиелита. Аналогичные данные получены при введении вирусных нуклеиновых кислот других вирусов (арбовирусов и др.).

Механизм адсорбции животных вирусов наиболее подробно изучен на эритроцитах. Установлено, что их мукопротеидные рецепторы разрушаются ферментом нейраминидазой, входящим в состав оболочки вириона миксовирусов. Нейраминидаза вступает в химическую реакцию с мукопротеидами оболочки и отщепляет N-ацетилнейраминную кислоту от олигосахарида, содержащего галактозамин и галактозу. Предполагается, что в рецепторах этих клеток роль концевой группы играет не N-ацетилнейраминная кислота, а другое соединение из группы сиаловых кислот, более устойчивое к действию нейраминидазы. Не исключена возможность, что у различных видов клеток эту функцию выполняют разные сиаловые кислоты. Рецепторами для пикорнавирусов, арбовирусов и вируса герпеса служат липопротеиды, разрушающиеся трипсином и химотрипсином. Функцию концевой группы у этих рецепторов несет протеидная, а не липидная часть.

Помимо отмеченных выше данных, свидетельствующих об определенной специфичности клеточных рецепторов для адсорбции той или иной группы вирусов, имеются сведения, позволяющие считать, что существует более узкая специфичность клеточных рецепторов. Так, хемотрипсин и панкреатин лишают клетки *HeLa* способности адсорбировать вирусы коксаки, а трипсин разрушает рецепторы для вирусов полиомиелита. Из этого следует, что рецепторы для вирусов полиомиелита отличаются от рецепторов для вируса коксаки.

Величина адсорбции у вирусов разных видов на одних и тех же клетках различна и колеблется в широких пределах. Эффективность адсорбции вирусов выше на суспендированных клетках, чем на монослойной культуре. На величину и скорость адсорбции вирусов на клетках существенно влияет ряд физических и химических факторов (температура, присутствие в среде катионов и др.).

Известен ряд соединений, препятствующих адсорбции вирусов на клетках. К ним прежде всего относятся вещества, несущие высокий отрицательный заряд (сульфатированные полисахариды, гепарин и др.). Ингибирующее действие такого типа веществ может быть снято поликатионами (ДЭАЭ — декстран, экмоллин, протаминсульфат), нейтрализующих отрицательный заряд сульфатированных полисахаридов.

Адсорбции вирусов на клетках могут препятствовать также гомогенаты клеток, содержащие клеточные рецепторы и сходные с ним субстраты. Ингибция адсорбции вирусов на клетках вызывается не только специфическими противовирусными антителами, но и антителами к нормальным клеткам и вирусными ингибиторами. Механизм действия последних остается пока не выясненным. Эффективность адсорбции вируса на клетке зависит и от состояния структуры (конфигурации) оболочки вириона, а также сохранности входящих в ее структуру таких химических веществ, как углеводы. Больше того, вирусные рецепторы могут изменяться химическим путем и в результате мутации, приводящей к изменению структуры вирусных белков.

На раннем этапе адсорбции связь вируса с клеткой обратима. При повторном замораживании и оттаивании эта связь разрушается. Чтобы освободить прочно связанный вирус, клетки обрабатывают химическими веществами (версеном, хемотрипсином, дезоксихолатом и др.). При длительном контакте вируса с клеткой элюция (освобождение) его невозможна.

Проникновение вирусов в клетку. Вслед за адсорбцией вируса следует стадия проникновения его в клетку. Процесс внедрения в клетку у вирусов бактерий, животных и растений различен. Так, при инфицировании бактерий фагом в нее проникает лишь фаговая нуклеиновая кислота. Основная масса фаговых белков остается за пределами клетки. Эти данные показали не только особенности механизма проникновения фагов в клетку, но и впервые было установлено, что инфекционность вируса связана с нуклеиновой кислотой. Такой фундаментальный факт вскоре нашел подтверждение при инфицировании клеток высокоочищенными препаратами нуклеиновых кислот растительных и животных вирусов.

Электронноскопические наблюдения за процессом проникновения животных вирусов показали, что в месте соприкосновения вируса с мембраной клетки образуется вакуоль (выпячивание), которая затем втягивается внутрь клетки. Такой способ проникновения вируса в клетку получил название *виропексиса*. Содержащийся в вакуоли вирус подвергается в ней действию гидролитических ферментов (липаз, протеаз) — *депротенизации*. Этот процесс обычно продолжается около 20 минут. За это время нуклеокапсид вируса освобождается от внешней оболочки и перемещается из вакуоли в цитоплазму, где и завершается стадия полного освобождения нуклеиновой кислоты от белка («раздевание» вируса). Вслед за депротенизацией вирусной нуклеиновой кислоты наступает так называемый период эклипса, в течение которого не удается обнаружить в клетке зрелый инфекционный вирус.

Вирусы растений в естественных условиях передаются через сосущих насекомых, а в экспериментальных условиях — только после повреждения целостности поверхностных тканей растений. От клетки к клетке вирионы распространяются путем передвижения их по межклеточным протоплазматическим мембранам (мостикам) растения.

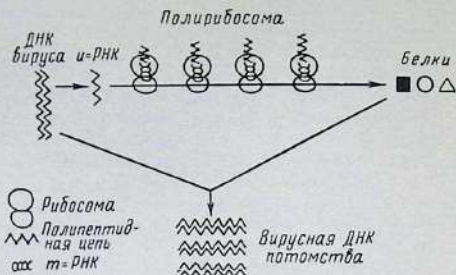


Рис. 41. Схема репликации двунической ДНК-вируса.

Синтез компонентов вирусов. Первые сведения о процессах синтеза структурных компонентов вирусов были получены при изучении репродукции фагов Т2 и ФХ174 и вскоре — вирусов позвоночных (полиомиелита, осповакцины, миксовирусов и арбовирусов). Успешному изучению этих вопросов способствовало применение изотопов и ингибиторов синтеза белков и нуклеиновых кислот, а также открытие инфекционных свойств вирусных нуклеиновых кислот.

Синтез структурных компонентов фагов. Вслед за проникновением фаговой нуклеиновой кислоты в клетку подавляется синтез клеточных белков и нуклеиновых кислот. Фаговая ДНК служит матрицей для синтеза дочерних ДНК и вирусных информационных РНК, несущих информацию для синтеза ферментов, необходимых как для репликации ДНК (ДНК-полимеразы), так и синтеза структурных фаговых белков (рис. 41). Закодированная в фаговой ДНК информация реализуется не сразу. Вначале на матрице одной из двух цепочек фаговой ДНК синтезируются молекулы и-РНК, кодирующие структуру ранних белков. Роль одних из них сводится к подавлению синтеза клеточной ДНК (репрессорные белки), а других — к синтезу фаговой ДНК-полимеразы. Позднее синтезируются и-РНК, кодирующие структурные вирусные белки. Матрицами для синтеза молекул и-РНК служат родительская и вновь синтезированная ДНК.

Синтез вирусных белков происходит на клеточных рибосомах и для построения их используется аминокислотный фонд клетки. Аминокислоты активируются ферментами и с помощью клеточных т-РНК переносятся в рибосомы (полисомы), где они располагаются в синтезируемой молекуле белка в определенном порядке в соответствии с информацией, полученной и-РНК от фаговой ДНК.

Механизм репликации нуклеиновой кислоты фагов, содержащих одноническую ДНК (бактериофаг ФХ174 и др.), отличается от описанного выше. При изучении репродукции бактериофага ФХ174 было обнаружено, что в отличие от внеклеточной формы, содержащей

однонитчатую молекулу ДНК, в инфицированных этим бактериофагом бактериях была обнаружена двунитчатая вирусная ДНК, получившая название репликативной формы (рис. 42). Репликативная форма ДНК содержит одну родительскую молекулу нуклеиновой кислоты («+» цепочку) и вновь синтезированную комплементарную по структуре первую («-» цепочку). Однако при изучении потомства бактериофага ФХ174 в вирионе обнаруживают только однонитчатую ДНК одного типа — «плюс» цепочку. Таким образом, синтезированные «плюс» цепочки включаются в состав зрелого вируса, а «минус» цепочки служат лишь матрицей для синтеза новых «плюс» цепочек. Такой тип синтеза получил название асимметричного.

Синтез компонентов РНК-вирусов позвоночных. Образование вирусных компонентов наиболее изучено у вируса полиомиелита, арбовирусов и миксовирусов. Сведения о механизме репродукции других РНК-вирусов менее полны. Описываемые ниже процессы синтеза вирусных нуклеиновых кислот и белков представлены схематично. В зависимости от структурных и функциональных особенностей той или иной группы вирусов они будут претерпевать некоторые изменения. Особенно это относится к репликации вирусных РНК, механизм которых вряд ли является универсальным для всех РНК-вирусов позвоночных. Наиболее существенные различия отмечены в синтезе компонентов мелких и крупных вирусов.

Процессы синтеза компонентов РНК-вирусов происходят в следующей последовательности: после депротенинизации, то есть освобождения из капсиды вирусной нуклеиновой кислоты образуются вирусные полисомы путем комплексования вирусной РНК с рибосомами (рис. 43). В последних синтезируются ранние белки: репрессоры клеточного метаболизма и РНК-полимеразы, транслируемые с родительской молекулы вирусной РНК. Вслед за этим в цитоплазме (мелкие вирусы) или в ядре (вирусы гриппа) образуется двунитчатая вирусная форма РНК, путем комплексования родительской «плюс» цепочки с вновь синтезированной и комплементарной ей «минус» цепочкой. Объединение этих нитей нуклеиновой кислоты и приводит

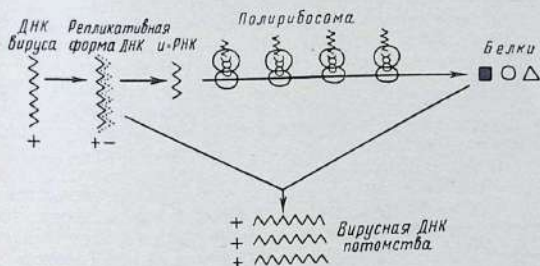


Рис. 42. Схема репликации однонитчатой ДНК-вируса.

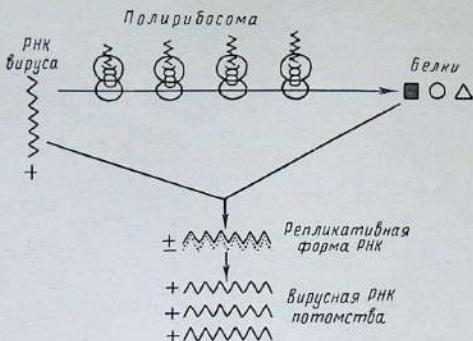


Рис. 43. Схема репликации РНК-вируса.

к образованию двунитчатой структуры РНК, получившей название репликативной формы (РФ). Эта форма РНК устойчива к РНКазе и является обязательной в процессе репродукции всех РНК-вирусов.

Синтез вирусной РНК осуществляется при участии фермента РНК-полимеразы в так называемом репликативном комплексе, состоящем из полисом, репликативной формы РНК, РНК-полимеразы и промежуточной репликативной формы. В настоящее время допускается существование двух типов РНК-полимераз: РНК-полимераза I катализирует образование репликативной формы на матрице «плюс» цепочки (такой фермент обнаружен у ряда вирусов); РНК-полимераза II участвует в синтезе вирусной однонитчатой РНК на матрице репликативной формы. Функцию РНК-полимеразы II выполняет, по-видимому, клеточная ДНК — зависимая РНК-полимераза.

Существование вирусных полимераз было установлено в ряде исследований. Так, при введении в культуру клеток вскоре после заражения ее вирусом ингибиторов синтеза белка (пуromицина, Р-фторфенилаланина) синтез вирусной РНК задерживается. Если ингибитор удалить отмыванием культуры клеток, то через два часа синтез вирусной РНК возобновляется. При введении тех же ингибиторов через 2 часа после заражения вирусная нуклеиновая кислота синтезируется. Эти наблюдения явились основанием считать, что для синтеза вирусной нуклеиновой кислоты требуется специфический фермент — РНК-полимераза и что этот фермент синтезируется на матрице вирусной РНК. Как выяснилось, синтез РНК-полимеразы происходит с помощью имеющихся в клетке ферментных систем, а индуцируется и программируется вирусной нуклеиновой кислотой.

По поводу хода событий после образования репликативной формы РНК существуют две основные гипотезы. Согласно одной из них репликативная форма нестабильна и в силу этого «плюс» цепочка

вытесняется вновь синтезированной «минус» цепочкой, и репликация вирусной РНК происходит на «минус» цепочке по асимметрическому полуконсервативному типу (рис. 44). Освободившиеся из репликативного комплекса вновь синтезированные «плюс» цепочки РНК либо выполняют функцию и-РНК для синтеза белков, либо одеваются капсидными белками и образуют зрелый вирус. Предполагают, что образование комплекса «плюс» цепочек с рибосомами и вирусными структурными белками носит конкурентный характер, а именно на ранних стадиях инфекции, когда структурного белка мало, преобладает соединение РНК с рибосомами, и, наоборот, с возрастанием количества вирусных структурных белков увеличивается вероятность их соединения с РНК вируса. Таким образом в вирусной РНК объединяются генетическая и информационная функции, то есть она осуществляет функцию и-РНК.

Как уже отмечалось выше, механизм репродукции у разных групп РНК-вирусов отличается. Различия сводятся к следующему. Синтез вирусных нуклеиновых кислот у мелких вирусов, как правило, происходит в цитоплазме, а у некоторых видов миксовирусов (вирус гриппа, истинной чумы птиц) — в ядре. У последних в ядре синтезируется не только РНК, но и внутренний белок. Часть синтезированной РНК вступает в комплекс с вирусным белком и образуется рибонуклеопротеид (РНП). Как показано на рисунке 45, РНК покидает ядро и в цитоплазме комплексируется с рибосомами, в которых и осуществляется синтез вирусных белков, а образующийся затем рибонуклеопротеид входит в состав вириона.

Механизм регуляции процесса репродукции РНК-содержащих вирусов позвоночных еще не изучен. Предполагается, что пусковым механизмом, обеспечивающим последовательность всех стадий репродукции этих вирусов, являются гипотетические вирусспецифические регуляторные белки. О происхождении других компонентов, входящих в состав вириона (мукопротеидов и липопротеидов), сведения

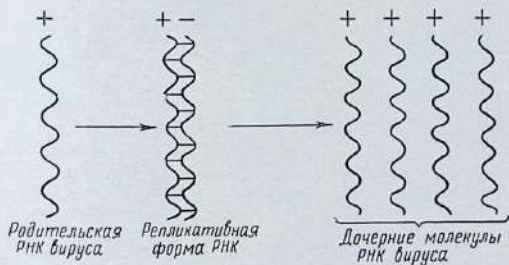


Рис. 44. Схема репликации вирусной РНК по асимметрическому типу.

пока ограничены. Нет основания считать, что в инфицированной вирусом клетке синтезируются специальные вирусные углеводы и липиды, входящие в состав муко- и липопротеидов. Можно полагать, что при окончательном формировании вириона происходит включение в его оболочку клеточных углеводов и липидов, образующих с белками мукопротеидные и липопротеидные комплексы.

Синтез компонентов ДНК-вирусов. Репликация нуклеиновой кислоты у ДНК-вирусов позвоночных во многом сходна с описанной выше у ДНК-фагов (стр. 122). Согласно принятому в настоящее время взгляду (см. рис. 41) на матрице ДНК-вируса в ядре происходит синтез и-РНК, несущей информацию для синтеза ранних белков, необходимых, с одной стороны, для подавления синтеза клеточной ДНК и с другой — репликации вирусной ДНК. Последняя реплицируется по полуконсервативному механизму на матрице родительской ДНК. Затем происходит синтез и-РНК, несущих от вирусной ДНК информацию для синтеза структурных (поздних) вирусных белков.

В репродукции вируса осповакцины имеются существенные отличия от описанных выше процессов. Депротеинизация ДНК вируса происходит в два этапа. На первом этапе разрушается наружная оболочка и освобождается нуклеоид с помощью ферментов клетки; на втором этапе для освобождения вирусной ДНК необходим синтез вирус-специфического «раздваивающего» фермента. Ранее предполагалось, что информация о синтезе этого фермента содержится в геноме клетки. Этот участок в незараженной клетке зарепрессирован, а при внедрении вируса в клетку происходит дерепрессия функции его с помощью гипотетического вирусного индуктора. Это представление

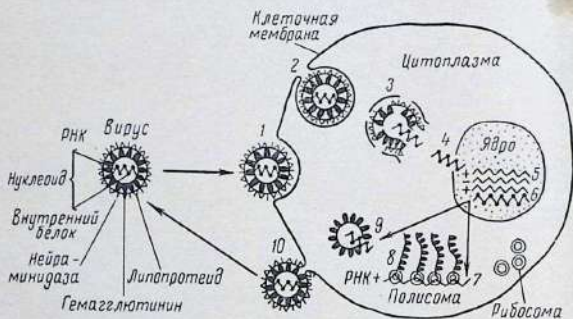


Рис. 45. Схема репродукции вируса гриппа:

1, 2 — внедрение вируса в клетку; 3 — депротеинизация вириона и освобождение рибонуклеопротеида вируса; 4 — проникновение РНП в ядро клетки; 5 — репликация вирусной РНК; 6 — РНП вируса; 7 — синтез вирусных белков в рибосомах; 8 — вновь синтезированные белки вируса; 9 — образование вириона; 10 — выход вируса из клетки.

о депротенизации ДНК-вирусов долгое время было общепринятым. Однако новые данные по этому вопросу вносят существенные коррективы. Было показано, что многие вирусные и-РНК способны образовываться в условиях, исключающих полную депротенизацию вирусной ДНК. Так, в присутствии ингибиторов белкового синтеза (стрептомицина А и др.) разрушается лишь наружная оболочка вириона, нуклеоид сохраняется в неизменном состоянии и ДНК не освобождается из капсида. Несмотря на это, происходит синтез и-РНК, с которых осуществляется трансляция вирусиндуцируемых белков.

Поскольку и-РНК в условиях неразрушенного нуклеоида синтезируется при полном блокировании образования новых белков, было сделано предположение, что синтез и-РНК осуществляется вирусным ферментом, получившим название ДНК-зависимой РНК-полимеразы, который входит в состав нуклеоида вируса осповакцины. В свете этих данных более вероятен взгляд, что информация о синтезе «разделяющего» фермента закодирована в ДНК вируса, а не в геноме клетки. Отличительная особенность в репродукции вируса осповакцины от ДНК-фагов состоит в том, что у последних все структурные белки поздние, а у вируса осповакцины часть из них (3—5 белков) ранние, но основная их часть — поздние.

Таким образом, на примере вируса осповакцины видно, что у крупных ДНК-вирусов позвоночных процессы синтеза их компонентов более сложны, чем у мелких РНК-вирусов.

Формирование вирионов у разных вирусов происходит с участием различных клеточных структур. Так, формирование вирусов полиомиелита, осповакцины и герпеса начинается и завершается в цитоплазме, а аденовирусов — в ядре. Процесс формирования у некоторых миксовирусов (гриппа, истинной чумы птиц) более сложен. Синтез вирусной РНК и образование нуклеокапсида (S-антигена) происходит в ядре, гемагглютинина (V-антигена) — в цитоплазме. Образовавшийся S-антиген постепенно проникает из ядра в цитоплазму, где и происходит формирование оболочки вируса. По мере продвижения S-антигена к цитоплазматической мембране формируется вирион: S-антиген покрывается вирусными белками (гемагглютинидами), по видимому, здесь же включается в вирион и нейраминидаза. Достигнув клеточной цитоплазматической мембраны, в оболочку вируса включаются липопротеиды и клеточные белки. На клеточной поверхности вирион образует сферическую выпуклость, отпачковывающуюся вскоре от клетки. На этом завершается процесс формирования потомства вируса гриппа. Однако вновь сформированный вирус не сразу покидает зараженную клетку: после «отщепления» от нее он адсорбируется на поверхности клетки, с которой постепенно (в течение нескольких часов) высвобождается (элюирует) в питательную среду.

У вирусов разных групп и видов процесс размножения во времени протекает различно. Так, латентный период (стадия между заражением клетки и началом образования зрелого вируса) колеблется от 2 до 3 часов у РНК-содержащих вирусов и от 6 до 14 часов — у ДНК-содержащих вирусов. Продолжительность периода увеличения числа

вновь образующихся вирионов также варьирует у вирусов разных групп и видов: от 2 до 6 часов у РНК-содержащих вирусов и от 6 до 24 часов у ДНК-содержащих вирусов. РНК-содержащие вирусы размножаются быстрее, чем ДНК-содержащие вирусы. Весь цикл размножения (период от заражения клетки до полного созревания всей популяции вируса) в среднем продолжается от 4 до 6—8 часов у РНК-содержащих вирусов и от 12 до 24 часов — у ДНК-содержащих вирусов.

Независимо от способа формирования вирусов процесс репродукции их завершается появлением большого числа дочерних инфекционных вирионов (1000, 10 000 и более на клетку). У вирусов ящура и полиомиелита их на одну клетку приходится от 10 000 до 100 000, а у вируса классической чумы птиц — 3000—10 000.

Все показатели активности репродукции вирусов получены в опытах при высокой множественности заражения, так как при заражении на клетку меньше единицы продолжительность латентного периода в разных клетках будет сильно варьировать. Наиболее достоверные сведения о динамике размножения вируса можно получить при изучении одиночного цикла размножения (рис. 46). При этом титр инфекционности устанавливают путем определения среднего числа бляшкообразующих единиц, приходящихся на одну клетку, при условии, что во всех клетках размножается вирус.

Дефектные формы вирусов. В клетках и культуральной среде наряду с инфекционным вирусом появляются неинфекционные формы (неполный или дефектный вирус). К таким формам чаще относят образования, сходные в морфологическом отношении с вирусом, но не тождественные ему. Некоторые дефектные формы не содержат нуклеиновую кислоту, а если она и есть, то функционально не активна, в результате инактивации внеклеточного вируса температурой, при ко-

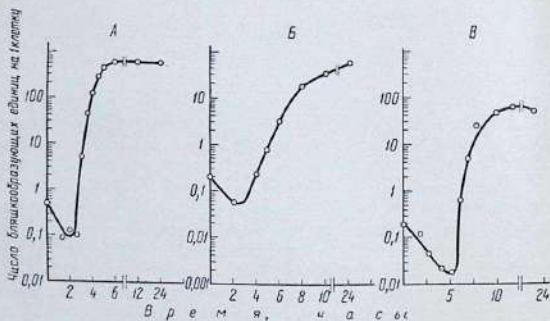


Рис. 46. Динамика одиночного цикла размножения вирусов:

А — вирус полиомиелита; Б — вирус болезни Ньюкасла; В — вирус осповакцины.

торой производилось культивирование. Так, неполноценность вируса гриппа может быть обусловлена тем, что вирион дефектного вируса содержит неполный геном (1—2 молекулы нуклеиновой кислоты). У других вирусов это связано, по-видимому, с отсутствием в их оболочке липопротеидного компонента. Условия и причины появления неполного вируса различные. К ним относят высокую множественность инфекции, действие интерферона на синтез вирусной нуклеиновой кислоты, что приводит к несоответствию между большим количеством синтезированного вирусного белка и нуклеиновой кислоты, а также разную степень восприимчивости клеток к вирусу и др. Эти нарушения могут происходить как при укладке капсомеров вокруг молекул нуклеиновой кислоты, так и на более поздней стадии — при образовании внешней оболочки.

Выход вирусов из клетки. Существуют два основных способа выхода вирусов из клеток. При первом (взрывном или литическом) способе все потомство вируса после полного созревания их внутри клетки покидает последнюю почти одновременно. Перед выходом вируса клетки округляются (как это наблюдали, например, у пикорнавирусов), в них появляются вакуоли, разрушается клеточная мембрана и высвобождается вирус. Данный способ выхода отмечают у безоболочечных (иксоадрических) вирусов — полиомиелита и некоторых мелких РНК-содержащих вирусов.

При втором способе вирионы из клетки выходят постепенно и относительно длительно (от 2 до 6 часов), по мере созревания их на цитоплазматической мембране. Этот способ наблюдают у оболочечных вирусов (миксовирусы, арбовирусы). Выходу из клетки миксовирусов, по-видимому, способствует нейраминидаза, нарушающая целостность клеточной оболочки. У этих вирусов от 75 до 90% потомства спонтанно высвобождается в культуральную среду. Причем клетки относительно долго сохраняют свою целостность и погибают не сразу.

При репродукции других вирусов клетки либо округляются (аденовирусы), либо сливаются с образованием синцития (вирус герпеса). Потомство вирусов длительное время остается в клетке (от 6 до 24 часов), и только 10—50% спонтанно высвобождается из нее. Для полного выделения вируса из клеток в таких случаях прибегают к разрушению клеток замораживанием и оттаиванием или другим способом.

Биосинтез компонентов вирусов в бесклеточной системе. В свете приведенных выше сведений о механизмах репродукции вирусов логичным является вопрос о возможности искусственного биосинтеза вирусных компонентов и вирусов вне клетки, то есть в бесклеточных системах, обеспечивающих репликацию вирусных нуклеиновых кислот и белков в пробирке на матрице вирусной нуклеиновой кислоты. Изучение этого вопроса до недавнего времени было мало успешным и только в последние годы получены убедительные доказательства принципиальной возможности биосинтеза инфекционных нуклеиновых кислот и рибонуклеопротеидов вне клетки. Получены также обнадеживающие результаты о внеклеточном биосинтезе простейших вирусов.

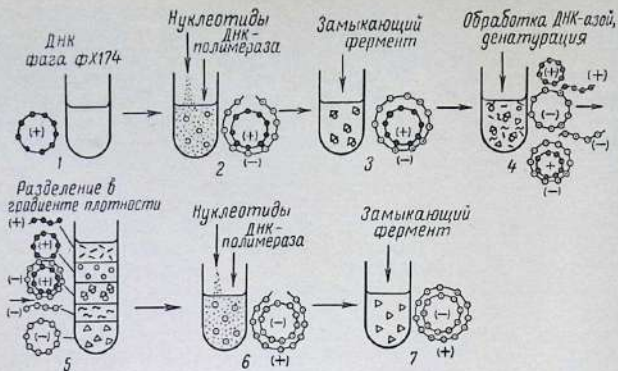


Рис. 46а. Биосинтез ДНК фага — ФХ174 в бесклеточной системе.

1 — циклическая одноцепочечная «+» нить ДНК фага; 2 — вновь синтезированная не замкнутая «—» нить ДНК; 3 — двуцепочечная инфекционная ДНК; 4 — дезинтеграция ДНК после обработки ДНКазой и тепловой денатурации; 5 — разделение структур ДНК центрифугированием с целью выделения вновь синтезированной инфекционной ДНК; 6 и 7 — биосинтез ДНК на искусственно синтезированной ДНК.

Достоверные доказательства бесклеточного биосинтеза инфекционной вирусной ДНК были получены в лаборатории Корнберга (1967—1968) на модели одноцепочечного ДНК-содержащего фага ФХ174. В качестве матрицы была использована циклическая одноцепочечная ДНК, выделенная из фага (рис. 46 а). К этой матрице («+» нити), меченной тритием, были добавлены активированные нуклеотиды, содержащие азотистые основания А, Г и Ц, а вместо Т был добавлен нуклеотид, содержащий 5-бромурацил (5-бромдезоксиурединтрифосфат (2)). Вместе с нуклеотидами в пробирку добавляли высокоочищенную ДНК-полимеразу *E. coli* (2). Синтезируемая в этих условиях ДНК по химическому составу в точности соответствовала вносимой в качестве матрицы фаговой ДНК, однако она была не инфекционна. Это объяснялось тем, что синтезированная нить была не замкнута в кольцо. Для соединения концов нити ДНК в пробирку добавляли «замыкающий» фермент — полинуклеотидлигазу, в результате чего образуется целостная (циклическая) двуспиральная репликативная форма (РФ) ДНК (3). Затем в инкубируемую смесь вводили ДНКазу с таким расчетом, чтобы приблизительно в половине образовавшихся циклических РФ молекул ДНК произошел один разрыв в одной из ее нитей (4). После тепловой денатурации образовалась смесь, состоящая из репликативной циклической формы, матричных и вновь синтезированных циклических и линейных ДНК (5). Так как вновь синтезированные «—» нити содержали 5-бромурацил, то они были тяжелее матричной «+» нити и могли быть отделены ультрацентро-

фугированием в градиенте плотности хлористого цезия (5). Для выделения инфекционных циклических вновь синтезированных «—» нитей проводили ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Как выяснилось вновь синтезированные «—» нити обладали такой же инфекционностью, как и родительская ДНК. В другой серии опытов, поставленных по вышеописанной схеме, была установлена матричная функция вновь синтезированной ДНК (6, 7).

Таким образом, на модели фага ФХ174 была впервые достоверно установлена возможность внеклеточного биосинтеза инфекционной вирусной нуклеиновой кислоты фага, как на матрице естественной ДНК, так и ДНК, синтезированной в бесклеточной системе. Эти основополагающие данные послужили предпосылкой для проведения экспериментов по внеклеточному биосинтезу рибонуклеиновых кислот и рибонуклеопротеидов фагов и вирусов позвоночных. Получены первые доказательства принципиальной возможности биосинтеза в бесклеточной системе инфекционной, РНК фагов и инфекционного рибонуклеопротеида мелких вирусов позвоночных на так называемых преформированных субклеточных структурах — на митохондриально-микросомной фракции, извлеченной из клеток, предварительно зараженных вирусом.

В настоящее время получены также убедительные данные о возможности биосинтеза в пробирке фаговых белков в системе, состоящей из бактериальных рибосом и вирусспецифической и-РНК и других необходимых для синтеза белка компонентов. Синтезированные белки обладали свойствами, характерными для белков, синтезируемых инфицированной фагом клеткой.

Эксперименты по бесклеточному биосинтезу белков РНК-содержащих вирусов позвоночных пока нельзя считать завершенными. В такой же мере это относится и к бесклеточному биосинтезу белков у ДНК-содержащих вирусов.

Ранее уже отмечалось, что вирусные нуклеиновые кислоты и вирусные белки могут агрегировать в пробирке, в результате чего формируются полноценные инфекционные формы вируса. Однако пока еще не удалось воспроизвести в бесклеточной системе весь цикл репродукции вирусов позвоночных, начиная от введения в систему вирусной РНК, синтеза всех компонентов, до формирования зрелой формы вируса. Полученные к настоящему времени данные по этому вопросу позволяют надеяться, что проблема биосинтеза вирусов в пробирке будет успешно разрешена в ближайшем будущем.

Цитопатогенное действие вирусов. Взаимодействие вируса с клеткой проявляется в виде многообразных функциональных, биохимических и структурных изменений, выявляемых биохимическими, цитологическими и генетическими методами.

Функциональные изменения в инфицированной клетке возникают вскоре после проникновения в нее вируса. Они выражаются в угнетении синтеза клеточных нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и белков, а на более поздних стадиях инфекционного процесса — в полном прекращении основных синтетических процессов.

В результате функциональных и биохимических нарушений в клетке развиваются различного рода морфологические изменения, обнаруживаемые с помощью обычной световой, люминесцентной и электронной микроскопии. Характер и степень выраженности цитопатических изменений зависит от вида вируса и типа клеток. Наряду с таким крайним проявлением цитопатогенного действия вирусов, как полная дегенерация клеток, сопровождающаяся многими видимыми морфологическими изменениями в ядре и в цитоплазме, развитие вирусной инфекции иногда может не приводить к каким-либо обнаруживаемым изменениям в пораженной клетке. Отчетливые цитопатические изменения вызывают арбовирусы (вирусы лошадиных энцефаломиелитов, венесуэльского энцефаломиелита лошадей, клещевого, шотландского и других энцефалитов), пикорнавирусы (вирусы ящура, коксаки, полиомиелита) и некоторые виды миксовирусов (истинной чумы птиц, болезни Ньюкасла). Изменения, вызываемые этими вирусами, выражаются в уплотнении ядра, вакуолизации цитоплазмы, округлении клетки, с последующей полной дегенерацией и гибелью ее. Этот тип цитопатических изменений характерен для вирусов, вызывающих цитолитическую реакцию, которая, как правило, завершается общей дегенерацией и гибелью клетки.

Наряду с описанными выше морфологическими изменениями ряд вирусов вызывает образование цитоплазматических и ядерных включений, представляющих собой центры накопления вируса. В зависимости от вида вируса (ДНК- или РНК-вирусы) они по-разному окрашиваются кислотными и основными красителями, а также флуоресцирующими веществами (акридиновым оранжевым и др.). Локализация вирусных включений, а также характер свечения их при окраске флуоресцирующими антителами, широко используется для ранней диагностики вирусных инфекций.

Некоторые виды вирусов (герпес, корь и др.) вызывают слияние клеток, в результате чего образуются многоядерные клетки. Это явление получило название полиокариоцитоза. При заражении клеток онкогенными вирусами они трансформируют их в опухолевые клетки. Наконец, репродукция некоторых вирусов (аденовирусы, латентные вирусы) сопровождается медленно развивающимися и слабо выраженными изменениями в структуре клетки.

Изучение изменений в зараженной вирусом клетке показало, что причиной ее гибели является один из белков, синтез которого программируется вирусной нуклеиновой кислотой. Цитопатическим действием у пикорнавирусов обладает белок, входящий в структуру капсиды. Цитопатический эффект в клетках, зараженных аденовирусами, вызывается вирусным белком, но уже не входящим в структуру вируса. Есть основания полагать, что причина гибели клетки связана с реакцией лизосом на вирусную инфекцию, в результате чего повышается проницаемость их мембран для лизосомальных ферментов. При нормальной проницаемости мембраны или незначительном ее повышении клетка не погибает.

Подавители репродукции вирусов и химиотерапия вирусных инфекций. Успехи в изучении репродукции вирусов в значительной мере связаны с применением ингибиторов, подавляющих репродукцию вирусов. Исследования в этом направлении в свою очередь заложили теоретические и научно-методические основы изыскания химиотерапевтических средств при вирусных инфекциях. Свидетельство этому — открытие ряда синтетических веществ, избирательно действующих на отдельные этапы репродукции вирусов. Одни из них подавляют синтез вирусных нуклеиновых кислот, а другие нарушают синтез вирусных структурных белков или препятствуют проникновению вируса в клетку.

Соединения, подавляющие синтез вирусных нуклеиновых кислот, включают две группы веществ.

Первая группа — это селективные (специфические) ингибиторы, они не имеют структурной аналогии с метаболитами и не включаются в состав синтезируемого продукта. Такие соединения не способны участвовать в процессе по принципу антиметаболизма. К ним относят производные бензимидазола, гуанидин, а также изатин — тиосемикарбазон и его производные.

Производные бензимидазола, в частности α -оксibenзилбензимидазол, эффективно подавляет в культуре клеток репродукцию вируса гриппа и некоторых пикорнавирусов (полиомелита, коксаки, ЕСНО), а гуанидин ингибирует репродукцию только последних. Оба эти соединения подавляют репродукцию вируса путем нарушения ранней стадии его размножения, а именно во второй половине латентного периода. Присутствие их на более поздних этапах репродукции вируса не оказывает действия на развитие инфекции. Механизм действия этих соединений хотя еще не в полной мере выяснен, однако по имеющимся данным они нарушают синтез вирусной РНК путем блокирования синтеза РНК зависимой РНК-полимеразы. В организме животного эти соединения противовирусным действием не обладают.

В отличие от этих веществ, изатин — тиосемикарбазон подавляюще действует на репродукцию вируса путем вмешательства в этот процесс на поздних, заключительных этапах — в период синтеза структурных вирусных белков и образования вириона. Механизм действия этого препарата связывают с угнетением синтеза поздних вирусных белков. Как само это вещество, так и особенно его метильные и этильные производные, известные под названием марборан, активны только в отношении вирусов группы оспа-осповакцина. По имеющимся данным, применение этого препарата является более эффективным, чем серопрофилактика.

Вторая группа веществ — а н т и м е т а б о л и т ы — соединения, действующие в основном на репродукцию ДНК-содержащих вирусов (герпеса, оспы) путем ингибирования синтеза вирусных нуклеиновых кислот по принципу антиметаболизма, с включением ингибитора в структуру вирусной ДНК. Сюда относятся аналоги тимина (5-бромдезоксинуридин и 5-йоддезоксинуридин), эффективные при конъюнктивитах, кератитах и кожных поражениях, вызванных виру-

сом герпеса. Известны также структурные аналоги аминокислот (пара-фторфенилаланин и др.), пуриновых (азагуанидин и др.) и пиримидиновых оснований (5-бромурацил, азаурацил и др.). Однако они не проявляют достаточно выраженного селективного действия на вирусы, ингибируя одновременно в такой же мере аналогичные биосинтетические процессы клетки. Такие антиметаболиты, как и антибиотические вещества типа актиномицина Д, пуромидина и др., из-за высокой токсичности не используют при вирусных заболеваниях.

Химиотерапевтическое действие некоторых соединений связано с тем, что они препятствуют проникновению вируса в клетку. Одним из наиболее изученных и эффективных среди них является адамантанамин (амантадин) и его производные, обладающие избирательным действием на инфекции, вызываемые вирусами гриппа А, А2, С и парагриппозным вирусом Сендай. Этот препарат не препятствует адсорбции вирусов на клетке, а блокирует или замедляет каким-то образом процесс проникновения их в клетку, а также, по-видимому, препятствует депротенизации РНКвируса.

Кроме того, исследован ряд веществ, подавляющих ферментную функцию у вирусов, а именно нейраמידазную активность у миксовирусов. Один из таких активных соединений представляет собой аналог нейраминовой кислоты, известный под названием СИМО. Обладая эффективным подавляющим действием на инфекционную и гемагглютинирующую активность вируса гриппа, он оказался высоко токсичным для животных и по этой причине не получил применения.

Следует отметить, что объектом химиотерапевтического воздействия может быть любой этап репродукции вируса — от проникновения его в клетку до формирования зрелой формы вируса. Но эффективный препарат должен обладать селективным действием в отношении подавления вирусспецифических процессов и не должен затрагивать существенным образом аналогичные процессы, протекающие в нормальных клетках. В этом состоит одна из основных трудностей на пути поисков химиотерапевтических препаратов. Другая объективная трудность состоит в том, что мир вирусов представлен большим разнообразием семейств и видов, обладающих своеобразными биофизическими, биохимическими, физиологическими и генетическими свойствами. Поэтому имеется очень малая вероятность найти вещества с широким спектром действия. В лучшем случае можно рассчитывать на обнаружение средств, эффективно подавляющих репродукцию вирусов близких видов или типов.

Среди вирусных ингибиторов особое место занимают такие биологически активные клеточные белки, как антитела, интерферон и вирусные сывороточные ингибиторы. Последние постоянно содержатся в сыворотке, выделениях слизистой носа и в органах и тканях нормального организма, а антитела и интерферон продуцируются клетками в процессе инфекции или же при иммунизации живыми и инактивированными вакцинами. Антитела относятся к специфическим факторам иммунитета, а ингибиторы и интерферон обладают широким,

практически универсальным противовирусным действием. Сведения о природе и механизме действия этой группы антивирусных веществ приведены в главе 13 (стр. 182).

Глава 9. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСОВ

Культивирование вирусов на культуре клеток. Культуры клеток применяют для выделения, идентификации и титрования вирусов, а также для изучения их биологических свойств. Их широко используют для приготовления вакцин и диагностических препаратов.

Животные вирусы культивируют на клеточных культурах, полученных из тканей человека и животных. Это в основном эмбрионы человека, кур, коровы, почки обезьян, амнион человека, культуры перевиваемых клеток (*HeLa*, *KB*, *Hep-2*, диплоидные клетки). Эпителиальные клетки более чувствительны к цитопатическому действию многих вирусов, чем фибробласты, и в них вирусы размножаются активнее, чем в последних.

Наиболее распространенные способы выращивания культур клеток: первичные культуры клеток, культуры перевиваемых клеток и культуры диплоидных клеток.

Первичные (трипсинизированные) культуры клеток. Для выращивания употребляют суспензию клеток, полученную в результате обработки тканей протеолитическими ферментами (трипсин, панкреатин и др.). Данным методом достигается отделение отдельных клеток путем переваривания трипсином межклеточного склеивающего белкового вещества. С этой целью измельченную ножницами ткань на кусочки величиной 2—3 мм многократно промывают фосфатно-буферным раствором и переносят в колбу. Ткань промывают подогретым до 32° 0,25%-ным раствором трипсина. Затем добавляют свежую порцию трипсина и включают мотор магнитной мешалки. Вращение магнита (при небольшой скорости) приводит к равномерному перемешиванию кусочков тканей. По истечении 10—15 минут мотор выключают, надосадочную жидкость отсасывают в центрифужные пробирки, помещенные в лед, а в колбу добавляют свежую порцию фермента. Трипсинизацию производят 5—6 раз, до полного распада кусочков ткани на отдельные клетки. Полученную суспензию клеток центрифугируют при 200 об/мин, надосадочную жидкость сливают, а осадок клеток разводят 1 : 5 подогретой до 37° питательной средой и переливают в бутылку через 3—4 слоя марли. После тщательного взбалтывания берут две пробы по 0,5 мл суспензии и в счетной камере определяют число клеток. Затем вычисляют, сколько клеток приходится на 1 мл и к суспензии добавляют такое количество питательной среды, чтобы в 1 мл содержалось необходимое число клеток (200 000—400 000 и более).

В каждую пробирку засевают 0,5—1 мл суспензии, а во флаконы емкостью 100 мл — 20 мл. Флаконы и пробирки плотно закрывают стерильными резиновыми пробками и помещают в металлические штативы. Пробирки кладут под углом 5° к горизонтальной плоскости

или помещают во вращающиеся барабаны. Клетки фиксируются на поверхности стекла без плазмы. Через 2—3 дня образуется монослой клеток — готовая культура.

Культуры перевиваемых клеток способны к длительному росту и размножению вне организма. Нередко используют линии клеток, выделенные из нормальных и раковых тканей человека. Среди последних широко применяют клетки *HeLa*, полученные из опухоли шейки матки, *Herp-2* — из карциномы гортани, *KB* — из рака полости рта. Из нормальной ткани животных часто употребляют линии клеток, полученные из почки обезьяны, кролика, эмбриона свиньи, почки телят.

Методы выделения клонов клеток описаны в соответствующих руководствах. Маточные штаммы поддерживают во флаконах или матрацах емкостью 100 мл. Для получения суспензии клеток берут 3—5-дневную культуру с хорошим монослоем. Из матраца удаляют питательную среду, а монослой заливают по 0,02%-ным раствором версена комнатной температуры и помещают на 10—15 минут в термостат. Затем версен сливают и в матрац добавляют питательную среду. После тщательного суспендирования подсчитывают клетки и готовят суспензию с необходимой их концентрацией. Для культивирования в пробирках в 1 мл среды вносят 200 000 клеток. На 2—4-й день культивирования культура пригодна для заражения вирусом.

Состав питательной среды зависит от типа культуры клеток. Чаще применяют среду 199, содержащую 10% бычьей сыворотки, среду Игла с 20% сыворотки, а также гидролизат лактальбумина (0,5%-ный) с 5% телячьей сыворотки.

Культура диплоидных клеток. Методика выделения штаммов диплоидных клеток описана в руководствах по культивированию клеток и тканей. Диплоидные клетки получают из тканей эмбриона человека и животных (легких, кожно-мышечной ткани, почек и др.). Независимо от ткани, из которой они получены, все диплоидные штаммы, начиная с пятого пассажа, дают рост культуры фибробластов. Обладая свойствами, характерными для нормальных клеточных культур, диплоидные клетки в то же время свободны от микоплазмы пневмонии и, по-видимому, латентных вирусов. Диплоидные клетки особенно пригодны для длительного культивирования вирусов в бессывороточных средах или если нежелательно менять питательную среду. Эти особенности диплоидных клеток, а также широкий спектр их чувствительности к вирусам — одно из преимуществ их перед другими клеточными культурами.

Условия культивирования клеточных культур представляют собой комплекс физико-химических факторов, роль и значение которых далеко не одинаковы. Важнейшие из них температура культивирования, осмотическое давление среды, концентрация водородных ионов, содержание неорганических соединений, основных метаболитов (углеводы, аминокислоты, белки, витамины), кислорода и углекислоты. Важное значение имеют коэнзимы и промежуточные метаболиты.

Оптимальная температура для культивирования большинства клеток млекопитающих и птиц — 36—37°. Солевые физиологические растворы создают необходимую буферность, изотоничность и играют существенную роль в обмене веществ клетки. Ионы бикарбоната нужны для осуществления биохимических процессов в клетках; кроме того, они выполняют одну из главных функций буфера в среде. Присутствие ионов кальция и магния необходимо также для прикрепления клеток на поверхности стекла. Оптимальный рост и развитие клеток обеспечиваются при рН 7,3—7,4, хотя большинство клеточных культур могут развиваться при более значительных колебаниях рН — от 8,0 до 6,6.

Для роста и развития клеток вне организма необходимо по меньшей мере 13 аминокислот, так как они не могут быть синтезированы клеточными культурами. Хотя пластическая роль белков, содержащихся в питательной среде, еще недостаточно ясна, однако стимулирующее действие сывороточных белков на рост клеток не вызывает сомнений. Биокаталитическое значение их, по-видимому, определяется такими биологическими активными веществами, как коэнзимы, витамины, гормоны, микроэлементы. Стимулирующее действие на рост клеток оказывают также ферментативные гидролизаты белков животного (пептон Дифко, гидролизат лактальбумина).

Один из существенных компонентов питательных сред — глюкоза. Потребность клеток в ней определяется прежде всего ее энергетической ролью в обмене веществ. Но клетки используют глюкозу и для пластической цели, а именно для синтеза некоторых заменимых аминокислот.

Витамины, особенно группы В, необходимы для роста клеток. Наиболее важными из них являются тиамин, пантотенат кальция, никотиновая кислота, биотин, холин, фолиевая кислота, пиридоксаль и рибофлавин. Клетки растут лучше, если витамины группы В добавляются в виде коэнзимов, например в виде аденозиндифосфорной кислоты (АДФ), аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и др. Значение гормонов для роста клеток еще мало изучено. Имеются данные, что они оказывают выраженное стимулирование на клеточную пролиферацию.

Основной компонент всех питательных сред — солевые физиологические растворы (Хенкса, Эрла). По характеру компонентов, входящих в питательные среды, различают: 1) среды из естественных (натуральных) компонентов (сыворотки, амниотическая жидкость и др.); 2) синтетические и полусинтетические среды, состоящие из аминокислот, витаминов, компонентов нуклеиновых кислот, глюкозы, физиологических солевых растворов. Для натуральных сред готовят смесь соответствующего солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки (животных и человека), гидролизата лактальбумина. Количество каждого ингредиента в разных прописях сред значительно варьирует.

Синтетические среды имеют постоянный состав ингредиентов, что является одним из основных условий для успешного культивирования клеток и вирусов. Эти среды делят на две основные группы:

1) среды, поддерживающие клетки в жизнеспособном состоянии (поддерживающие среды); 2) среды, обеспечивающие длительное выживание и рост клеток (ростовые среды). Среда первой группы в основном состоит из балансируемых физиологических растворов (Эрла или Хенкса). В таких средах клетки могут существовать в жизнеспособном состоянии непродолжительное время (2—3 дня). Для более длительного роста и развития культур тканей и клеток в солевые среды вводят субстраты, содержащиеся в сыворотке или в соответствующих синтетических смесях (аминокислоты, коэнзимы и витамины, нуклеотиды).

Выделение вирусов на культуре клеток. Перед заражением вирусом культуры клеток, инкубированные при 36° в течение 2—4 дней, микроскопируют. (Пробирки или флаконы с плохим ростом клеток не используют.) Затем удаляют питательную среду и в каждую пробирку вносят 0,1—0,2 мл исследуемого материала, обработанного соответствующим способом. Заражают культуры в 2—4 пробирках и в каждую прибавляют 1,5 мл питательной среды. При необходимости в среду вводят пенициллин и стрептомицин по 100—200 ЕД/мл. Добавлять сыворотки не рекомендуется ввиду возможного присутствия в них ингибиторов. Зараженные культуры клеток инкубируют при 36° в течение 1—2 часов, после чего сразу же удаляют и заменяют ее 1,5—2 мл свежей. Вызвано это тем, что исследуемые материалы могут обладать токсическими свойствами для клеток.

Опытные и контрольные культуры просматривают под микроскопом на наличие цитопатических изменений в течение 4—8 дней, начиная со второго дня после заражения. При появлении этих изменений культуральные жидкости из каждой пробирки объединяют и проводят идентификацию или дальнейшее пассирование выделенного вируса. Если исследуемый материал для клеток токсичен и специфичность цитопатических изменений определить невозможно, делают дополнительный пассаж.

Цитопатогенное действие вирусов на клетки проявляется различными морфологическими изменениями (рис. 47).

Идентификация выделенного вируса на культуре клеток. Существуют два основных метода идентификации: реакция нейтрализации (подавление цитопатического действия, ЦПД) и реакция торможения гемадсорбции. Выделенный цитопатический агент идентифицирует с помощью специфических сывороток или их смесей. Подавление цитопатического эффекта в присутствии иммунной сыворотки указывает на соответствующий тип вируса. Если подавление ЦПД в присутствии взятых в опыт сывороток отсутствует, то можно предположить — либо исследуемый вирус относится к другому виду, либо в культуральной жидкости вирус содержится в высоких концентрациях. В таком случае вирус титруют и повторяют реакцию нейтрализации с 100 ЦПД₅₀ вируса.

Титрование вируса. После микроскопии культур их отмывают раствором Хенкса. Затем приготовленными десятикратными

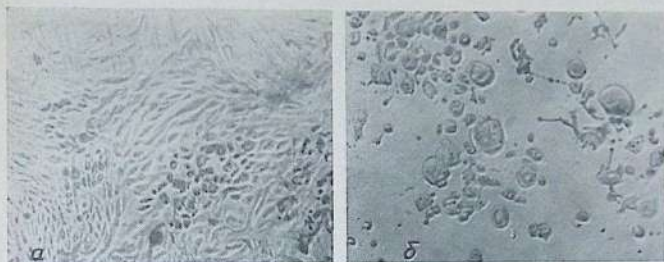


Рис. 47. Цитопатическое действие вируса оспы:

а — нормальная культура клеток; б — культура, зараженная вирусом.

разведениями вируса на растворе Хенкса проводят заражение, внося по 0,1 мл каждого разведения в четыре пробирочные культуры. После этого в пробирки добавляют питательную среду и оставляют их на 4—5 дней при 36° для инкубирования. Полученную культуру просматривают под микроскопом на наличие цитопатических изменений. Дегенерацию на два креста или больше считают доказательством проявления вирусной инфекционности и вычисляют титр вирусной суспензии. За титр вируса принимают то наибольшее разведение, которое вызывает цитопатическое действие в 50% зараженных культур. Титр вируса выражают количеством цитопатических доз (ЦПД₅₀) в 1 мл.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах — наиболее доступный и удобный метод как для первичного выделения вирусов, так и для последующего культивирования их в лаборатории. Его широко применяют для культивирования многих животных вирусов (осповакцины, чумы птиц, гриппа и др.).

Для культивирования вирусов употребляют оплодотворенные яйца, инкубированные в течение 7—11 дней при t° 38° и относительной влажности 63—65%. На размножение вирусов в куриных зародышах существенное значение оказывает температура инкубации яиц, возраст эмбрионов, метод заражения и количество введенного вируса. Многие вирусы (чумы птиц, гриппа, герпеса и др.) при температуре 32—37° активно размножаются. Некоторые специально селекционированные штаммы удовлетворяет более низкая температура (23—28°), но скорость репродукции при ней значительно ниже. При 39—40° вирус репродуцируется быстрее, а при 41—42° вирусы, как правило, не размножаются. Наиболее активно накапливается вирус при введении 1000—10 000 инфекционных доз.

Существует несколько способов заражения яиц (рис. 48). Независимо от способа введения материала скорлупу яиц предварительно протирают 70%-ным спиртом, обжигают на пламени и после этого обрабатывают 2%-ным спиртовым раствором йода.

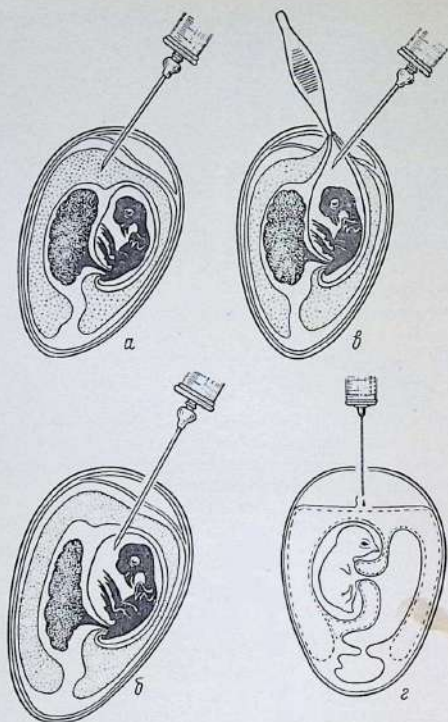


Рис. 48. Методы заражения куриных эмбрионов:

a — заражение в полость аллантаиса; *б* — заражение в амнион закрытым способом; *в* — заражение в амнион открытым способом; *г* — заражение на хорсиаллантаонскую оболочку.

Заражение в полость аллантаиса. Скорлупу над воздушной камерой прокалывают острием скальпеля или ножниц и туберкулиновым шприцем вводят 0,1—0,2 мл вируссодержащего материала на глубину 2—3 мм ниже границы воздушной камеры (рис. 48, *a*). Прокол в скорлупе заливают расплавленным стерильным парафином или смесью парафина с вазелином. Зараженные яйца помещают в штативы отверстием вверх и ставят в термостат для дальнейшего инкубирования.

Заражение в полость амниона предусматривает непосредственное инфицирование не только внутренней эктодермальной поверхности амниона, но и других тканей (трахеи, легкого). Для заражения обычно используют 7—10-дневных эмбрионов. Существует два способа введения материала в амнион: открытый и закрытый — через прокол в скорлупе. При *открытом способе* в скорлупе над воздушной камерой делают окошечко, через которое осторожно глазным пинцетом прокалывают хорионаллантоисную оболочку. Через образовавшееся отверстие пинцетом захватывают амниотическую оболочку и осторожно вытягивают часть ее наружу. В извлеченный амнион вводят туберкулиновым шприцем с иглой или пастеровской пипеткой 0,1—0,2 мл материала (рис. 48, а). После заражения амнион погружают в аллантоисную полость. Окно в скорлупе закрывают стеклянным колпачком, края которого заливают стерильным парафином. При *закрытом способе* заражение производят в затемненном боксе. Яйцо помещают на отверстие овоскопа тупым концом вверх. Появившуюся тень эмбриона обводят карандашом и через прокол в скорлупе в области тени эмбриона вводят иглу шприца в направлении к зародышу (рис. 48, б). Под легким давлением игла проникает в амниотическую полость, куда инъецируют 0,1—0,2 мл материала. Отверстие в яйце запечатывают расплавленным парафином.

Вскрывают зараженные яйца в сроки максимального накопления вируса (48 часов). Перед вскрытием яйца оставляют на ночь при 4° или на 2—3 часа при —10 —20°. После обработки яйца спиртом и обжигания на пламени скорлупу рассекают немного выше очерченной карандашом границы воздушного пространства. Скорлупу сбрасывают и пастеровской пипеткой с широким опаянным отверстием отсасывают аллантоисную жидкость.

Глава 10. СЕЛЕКЦИЯ ВИРУСОВ

Генетические признаки вирусов. Вирусы, как и другие организмы, обладают комплексом биофизических и биологических свойств. Передающиеся по наследству свойства относят к генетическим признакам. Совокупность генетической информации, или генетических признаков, присущих данному вирусу, принято определять как генотип вируса, а проявление их в конкретных условиях внешней среды — фенотипом. В фенотипе вируса никогда не реализуются все генетические возможности развития. Фенотип каждого штамма — это частный случай проявления функции генома в конкретных условиях внешней среды.

Возникающие в популяции штамма модифицированные вирионы могут быть результатом изменений двух видов. Они могут отличаться только фенотипически и иметь генотип, идентичный генотипу исходного штамма. Этот вид изменений не наследуется. С другой стороны, может измениться генотип и в этом случае фенотипически выявляемые различия передаются в поколениях.

Сведения о генетических признаках вирусов еще недостаточны и неточны, так как они были получены чаще при изучении генетически неоднородных штаммов, то есть культур вирусов, не подвергнутых селекции. Генетическая неоднородность популяций штаммов вирусов убедительно показана многими исследователями. Различия между клонами внутри популяции штамма нередко значительны и, в частности, по чувствительности их к сывороточным ингибиторам, по морфологии бляшек, по способности размножения при повышенных и пониженных температурах, вирулентности, цитопатическому действию на определенные типы культур клеток, термоустойчивости. Между тем объектом изучения в генетике вирусов являются не отдельные особи, а их популяции.

Понятно поэтому, что проведение исследований невозможно со штаммами, не подвергнутыми клонированию. Клон — это культура вируса, популяция которой происходит из одного вириона и представляет собой совокупность наследственно однородных вирионов. В силу естественно протекающих процессов изменчивости существование клона как совокупности генетических однородных вирионов ограничено во времени, так как в популяции клона могут возникнуть вирионы с наследственно измененными признаками. Поэтому клон в отношении определенного признака или признаков становится неоднородным. Отбор из такой популяции клона по определенному признаку позволяет получить штамм или культуру вируса, клонированную по данному признаку.

Однородность штамма может быть сохранена консервацией его методом лиофильного высушивания и в известной мере пассажами в условиях, обеспечивающих нормальное развитие данного признака. Сохранение соответствующего свойства в процессе пассажей свидетельствует о стабильности его и он может быть отнесен к наследственным.

Генетическим признаком может быть любое свойство вируса, которое передается по наследству и обладает соответствующей качественной и количественной характеристикой в определенных условиях внешней среды. У вирусов многих видов генетические признаки еще мало изучены. В настоящее время можно определить лишь некоторую совокупность признаков, характерных для вируса данного вида или штамма.

Все генетические признаки условно можно разбить на групповые, видовые, внутривидовые и штаммовые. К групповым и видовым признакам относят тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), размеры и морфологию вирусов, тип капсиды, количество капсомеров, антигенную специфичность, устойчивость к эфиру и дезоксихолату натрия, наличие фермента нейраминидазы, способность вызывать гемоглютинацию, патогенность для животного определенного вида, инфекционность для куриного эмбриона, характер цитопатического действия на соответствующей культуре клеток. Для проведения генетических исследований наибольшее значение имеют внутривидовые (внутриштабные) признаки, позволяющие дифференцировать вари-

анты (мутанты, рекомбинанты) между собой. В настоящее время более изучены генетические признаки у вирусов полиомиелита, ящура, вирусов оспы и осповакцины, гриппа, чумы птиц, болезни Ньюкасла, арбовирусов и некоторых других видов.

К числу наиболее существенных генетических признаков, позволяющих надежно дифференцировать один штамм вируса от другого, относится патогенность их для восприимчивого хозяина. Патогенность — это потенциальная способность вируса вызывать инфекционный процесс. Но степень выраженности этого свойства у разных штаммов соответствующего вида вирусов различна. Степень выраженности патогенности характеризует вирулентность вируса. Вирулентность относится к полигенным признакам и представляет собой функцию ряда генетических признаков вируса. Изменение вирулентности — результат не единичной, а ряда мутаций, совокупность проявления которых и определяет степень патогенности вируса для восприимчивого хозяина.

Вирулентность зависит от вида животного и пути введения вируса в организм. Так, среди вирусов комплекса клещевого энцефалита встречаются штаммы, отличающиеся по вирулентности для животных разных видов: обезьян, овец, хомяков, мышей. Для определения вирулентности штаммов используют внутримозговую, подкожный, внутрибрюшинный пути заражения мышей, причем считается, что при каждом из этих способов введения выявляется особый генетический признак вируса. У вирусов клещевого энцефалита известны штаммы высоковирулентные при внутримозговом заражении мышей и низковирулентные при периферическом введении вируса, а у вируса венецуэльского лошадиного энцефаломиелита получены варианты, сохранившие вирулентность для мышей при заражении в мозг, но авирулентные при внутрибрюшинном введении вируса.

Патогенные штаммы, как правило, способны вызывать обнаруживаемую вирусемию. По этому признаку могут отличаться аттенуированные штаммы от вирулентных у вирусов полиомиелита, ящура, клещевого энцефалита, венецуэльского лошадиного энцефаломиелита, японского энцефалита, кори.

Вирусы животных и человека различаются по способности репродукции в культуре клеток и характеру вызываемых цитопатических изменений. Арбовирусы, как правило, размножаются без цитопатических изменений. Однако получены варианты, обладающие цитопатическим действием. Известны, например, варианты вируса западного лошадиного энцефаломиелита, вызывающие в культуре клеток почки кролика выраженные и слабые цитопатические изменения, а также не вызывающие видимых изменений. Вирулентные и аттенуированные штаммы вируса ящура размножаются в культуре ткани почек телят и крупного рогатого скота с различной степенью активности.

Удобным для исследований генетическим признаком является морфология бляшек (размер, форма и т. п.). Этот признак используется при дифференциации штаммов вирусов полиомиелита, ящура, болезни Ньюкасла, оспы, кори, герпеса и др.

Наиболее существенный генетический признак — способность вируса к репродукции при определенной температуре (гсг-признак). Предложено несколько методов определения этого признака. Сущность одного из наименее трудоемких из них заключается в определении разности между титрами инфекционности при 37° и 40°: если разность титров равна или меньше 2 lg, изучаемый штамм характеризуется как гсг 40⁺, при разности титров больше 5 lg—гсг 40⁻, если разность 2,5—5lg, штамм относится к гсг 40[±]. По данным ряда авторов, репродукция аттенуированных штаммов вируса полиомиелита при повышенной температуре (39°, 40°, 41°) резко снижалась, вирулентные штаммы одинаково интенсивно размножались как при 37°, так и при повышенной температуре. Аналогичные данные были получены с вирусами ящура, венесуэльского лошадиного энцефаломиелита, японского энцефалита, клещевого энцефалита, болезни Ньюкасла, кори.

В основе проявления гсг-признака могут лежать разные механизмы. Считают, что неспособность гсг 40⁻-мутантов вируса полиомиелита размножаться при повышенной температуре обусловлена блокировкой синтеза ферментов, необходимых для репликации вирусной РНК. Однако для большинства вирусов механизм проявления этого признака, как и многих других генетических признаков, остается неизученным.

К числу генетических признаков, позволяющих, по-видимому, дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы, следует отнести активность их индуцировать образование интерферона и чувствительность к его действию. На вирусах полиомиелита и кори показано, что авирулентные варианты индуцируют значительно большее количество интерферона, чем соответствующие вирулентные штаммы. Вирус кори, выделенный от больного ребенка, индуцировал в 16 раз меньше интерферона, чем лабораторный штамм, а высоковирулентный штамм вируса клещевого энцефалита вызывал в восемь раз меньше накопление интерферона, чем вариант того же вируса, адаптированный к тканевой культуре и утративший вирулентность для мышей. Имеются данные о том, что вирулентные штаммы не только плохие продуценты интерферона, но они проявляют и меньшую чувствительность к его действию. Существует противоположное мнение, что некоторые высоковирулентные вирусы клещевого энцефалита являются активными продуцентами интерферона.

Проявление ряда генетических признаков у вирусов позвоночных связано с особенностями структуры оболочки вируса. К одному из таких признаков относится устойчивость вирусов к прогреванию (Т-признак).

Фенотипическое проявление генетических признаков у вирусов. В зависимости от внешних условий генетическая информация, содержащаяся в геноме вируса, может реализоваться тем или иным образом. Иными словами, изменение условий культивирования может привести к изменению проявления соответствующих генетических признаков без изменения генотипа вируса. Ненаследственные изменения

свойств вируса, отражающие влияние окружающей среды, относят к фенотипическим изменениям их.

Вполне понятно, что при соответствующих условиях репродукции (тип культуры клеток, повышенная или пониженная температура культивирования, наличие определенного компонента в питательной среде, например гуанидина, ДЭАЭ-декстрана и т. д.) один и тот же генетический признак может проявить себя фенотипически в виде нормального (типичного) свойства, измененного или же совсем не проявится.

Из этого следует, что условия культивирования вируса не всегда способствуют проявлению того или другого генетического признака. Многие генетические признаки были обнаружены благодаря применению различных условий культивирования вирусов. Так, фенотипическое выражение *gcl*-признака зависит от вида ткани, на которой проводится изучение признака, температуры инкубации инфицированных вирусом клеток, от состава питательной среды и других внешних факторов. Известны варианты вируса ящура, неспособные размножаться при 40° в культуре ткани почки теленка или овцы, но интенсивно размножающиеся при этой температуре в культуре клеток почки эмбриона свиньи. При использовании питательной среды, содержащей тяжелую воду, *gcl* 40-мутанты вируса полиомиелита приобретают способность размножаться при 40°.

Вирус ящура типа С, выделенный от свиньи, образовывал на культуре клеток почки свиньи крупные бляшки, а на культуре клеток почки крупного рогатого скота — очень мелкие бляшки. Вирус обычного герпеса (штамм Л12) и некоторые его мутанты размножались по-разному на культуре фибробластов куриного эмбриона и эмбриона человека с добавлением в агаровое покрытие ДЭАЭ-декстрана. Выяснилось, что это соединение при 37° не влияет на размер бляшек, образуемых на фибробластах куриного эмбриона, а на культуре фибробластов эмбриона человека это вещество оказывало влияние как на размер бляшек (они увеличивались с 1—2¹ до 3,5—4 мм), так и на их количество. Способность мутантов образовывать крупные бляшки при блокировании их действия добавлением к агару ДЭАЭ-декстрана обнаружена у мутантов вирусов полиомиелита, болезни Ньюкасла, ЕСНО 6, энцефаломиокардита. У вирусов полиомиелита на проявление признака размера бляшек влияет концентрация бикарбоната натрия в агаровом покрытии: снижение концентрации способствует лучшему проявлению различий между вирулентными и аттенуированными вариантами. Известно, что повышенная терморезистентность вируса полиомиелита зависит от присутствия в питательной среде цистина.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что при изучении генетических признаков вирусов необходимо учитывать влияние факторов внешней среды, недооценка которых может привести к неточной характеристике генотипа штамма.

Обозначения генетических признаков у вирусов. Генетические признаки принято обозначать начальными буквами латинского алфа-

вита по тому слову, которое характеризует признак, с добавлением значка «+» или «-», что означает проявляется или не проявляется этот признак в данных условиях. Отдельные признаки, например нейровирулентность (N), обозначаются двумя буквами, в зависимости от вида животного, на котором проверяется это свойство. В настоящее время еще трудно унифицировать номенклатуру генетических признаков и поэтому для каждой группы вирусов пока оправдана специфическая символика отдельных признаков. Однако ряд признаков уже теперь могут иметь общие обозначения для вирусов всех видов.

Некоторые генетические признаки, выявляемые *in vitro*:

- 1) антигенная специфичность (Ag) — один из наиболее стабильных признаков, четко дифференцирующий межвидовые и внутритиповые различия;
- 2) геммагглютинирующая активность (G);
- 3) активность элиции с эритроцитов: Э⁺ — быстро, Э⁻ — медленно элюирующие варианты;
- 4) терморезистентность (Tr) или термочувствительность (Ts);
- 5) отношение к ингибиторам: чувствительность (I⁺) или резистентность (I⁻);
- 6) характер бляшек на культуре клеток под агаром: а) размер бляшек (S) — мельчайшие, мелкие, средние, крупные; б) форма — круглая, неправильная; в) цвет — мутные (p'), крапчатые (pf), прозрачные (p^c), «красные» (p^r); г) образование бляшек при пониженной концентрации бикарбоната натрия (d);
- 7) репродукция вируса в присутствии гуанидина (Gu), цистина (cy), триптофана (Tru) — чувствительность, устойчивость, зависимость.

Некоторые генетические признаки, выявляемые *in vivo*:

- 1) патогенность (P);
- 2) нейровирулентность (N): для обезьян (Mop N), кроликов (RN), мышей (MN);
- 3) способность вызывать вирусемии (Vi);
- 4) инфекционность для куриных эмбрионов (ID₅₀);
- 5) патогенность для куриных эмбрионов (Pg), характер поражений на хориоаллантоисной оболочке (Pche);
- 6) способность размножаться при различных температурах (rct или ts).

Следует подчеркнуть, что качественная и количественная характеристика любого признака определяется не только генотипом вируса, но и условиями, в которых проводилось его выявление.

Взаимосвязь генетических признаков у вирусов относится к числу сложных и мало изученных вопросов генетики. Один из важных вопросов в проблеме взаимосвязи генетических признаков у вирусов — это взаимосвязь вирулентности с другими признаками, особенно с признаками, выявляемыми вне организма (rct-признак, S-признак и др.). Исследования в этом направлении сыграли существенную роль при отборе вакцинных штаммов вирусов полиомиелита. В последнее время делаются аналогичные попытки при получении вакцинных штаммов вирусов ящура, кори, клещевого энцефалита и др.

Взаимосвязь генетических признаков представляет большой теоретический интерес, так как в процессе изменчивости нередко наблюдается одновременное изменение не одного, а нескольких признаков. Можно предположить, что в основе коррелятивной изменчивости лежат различные причины: полигенность изучаемого признака, плей-

отропность действия гена, селекция двойных или множественных мутантов.

При изучении взаимосвязи вирулентности с другими генетическими признаками большое значение сыграло определение различий активности репродукции вирулентных и авирулентных штаммов вирусов полиомиелита при пониженных и повышенных температурах. Было показано, что вирулентные штаммы, как правило, активно размножаются при повышенных температурах (40—41°) и, наоборот, репродукция при пониженных температурах (23—28°) чаще присуща слабовирулентным штаммам. Аналогичные данные были получены при изучении этих признаков у вирусов ящура, гриппа и др. Селекционированные пассажирами при пониженной температуре, варианты вируса ящура более активно размножаются при 24° по сравнению с 37°. Они обладали сниженной патогенностью для белых мышей, не вызывали заболеваний у морских свинок и крупного рогатого скота. Сходные данные получены и для вирусов гриппа.

Высоковирулентные штаммы вирусов клещевого энцефалита, шотландского энцефаломиелита овец, омской геморрагической лихорадки с одинаковой интенсивностью размножались и продуцировали бляшки как при 37°, так и при 42°, в отличие от слабовирулентных вариантов, которые не размножались при 42°.

Однако взаимосвязь между вирулентностью и способностью к репродукции при определенной температуре не всегда имеется. Так, экспериментально полученный вариант вируса полиомиелита типа 2, высоковирулентный для мышей, но авирулентный для обезьян, размножался при 40° и 41° даже лучше, чем нейровирулентный для обезьян штамм Магонеи типа 1. Не всегда наблюдалась зависимость между активностью репродукции при повышенной температуре и патогенностью для животных у штаммов вирусов западного лошадиного энцефаломиелита, клещевого энцефалита, ящура и кори. Так, описаны варианты вируса ящура, высоковирулентные для свиней, но имеющие оптимум размножения при пониженных температурах, и варианты, авирулентные для свиней с оптимальной температурой репродукции при 37°. Последние не размножались при 22°.

Противоречивые данные получены при изучении взаимосвязи между размером бляшек и патогенностью для животных. В ряде случаев такая зависимость установлена. Причем вирулентные штаммы, как правило, образовывали на культуре ткани крупные бляшки, авирулентные — мелкие. Но есть и немало сведений об отсутствии взаимосвязи между размером бляшек и патогенностью для животных (вирусы комплекса клещевого энцефалита, болезни Ньюкасла и др.).

В разделе «Генетические признаки вирусов» (стр. 144) отмечалась связь между патогенностью и активностью репродукции интерферона. Однако имеется ряд исследований, в которых этой связи не наблюдалось (вирус клещевого энцефалита). Получены доказательства взаимосвязи вирулентности с комплексом генетических признаков, определяемых вне организма. Так, штаммы, обладающие высокой нейровирулентностью для обезьян, имели $rst\ 41^+$ -признак, были термостабиль-

ными к прогреванию при 50°, мало чувствительны к интерферону, размножались при ограниченном доступе кислорода и под агаровым покрытием со сниженной концентрацией NaHCO_3 .

Нередко отмечали связь вирулентности и способности вызывать обнаруживаемую вирусемию у вирулентных штаммов вируса полиомиелита при внутримышечном и алиментарном путях введения; вакцинные штаммы такой способностью не обладают. В опытах на лабораторных животных эта связь установлена у арбовирусов, вирусов кори, гриппа и болезни Ньюкасла.

Установлена односторонняя связь между вирулентностью вирусов гриппа для мышей и способностью их к репродукции при 28°: вирулентные штаммы менее активно размножались при этой температуре по сравнению с авирулентными. Вирулентные штаммы были резистентны к ингибиторам сывороток ряда животных, а среди авирулентных встречались как резистентные, так и чувствительные к ним штаммы. Далее, вирулентные штаммы обладали низкой нейраминидазной активностью, а авирулентные — характеризовались как высокой, так и низкой нейраминидазной активностью. Все высоковирулентные штаммы агглютинировали эритроциты мышей, а авирулентные по этому признаку делятся на две группы, одна из которых агглютинирует, а другая — не агглютинирует их. Не существует строго определенной связи между вирулентностью для мышей и активностью элюции их с эритроцитов.

Следует, однако, отметить, что ни у одного из известных в настоящее время генетических признаков не наблюдалось абсолютной связи с патогенностью. Можно предположить, что взаимосвязь генетических признаков у вирусов нередко отражает не только видовые его особенности, но и специфичность штамма. Связь между вирулентностью и другими признаками, как правило, является односторонней, то есть признаками вирулентных штаммов иногда могут обладать авирулентные штаммы.

Методы селекции вирусов. Изменчивость у вирусов наблюдается как в процессе циркуляции их в природе, так и особенно в экспериментальных условиях. Наследственные изменения возникают при культивировании их в организме животных, в куриных эмбрионах, в культуре клеток, при воздействии на них физическими и химическими мутагенами, а также путем гибридизации.

В результате изменчивости вирусная популяция становится генетически неоднородной. Поэтому прежде чем приступать к исследованиям, необходимо получить однородные клоны, чтобы быть уверенным в том, что наблюдающиеся изменения наследственных признаков не являются результатом отбора вариантов, присутствующих в исходной культуре. Для выделения клонов используют несколько методов селекции.

Селекция клонов из одиночных пустул на хорионаллантоисной оболочке куриного эмбриона. Данный метод используют для селекции вирусов группы оспы-осповакцины, обычного герпеса, миксомы кролика. На хорнон-

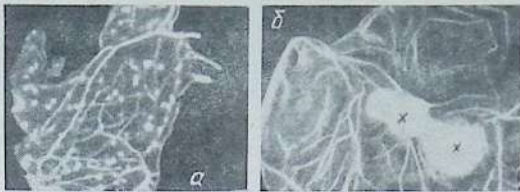


Рис. 49. Вирус осповакцины на хорниоллантаонисной оболочке куриного эмбриона:

a — мелкие оспины; *b* — крупные оспины.

аллантаоисе эти вирусы вызывают локальные поражения, формирующиеся, по-видимому, из единичных вирионов (рис. 49).

Селекцию клонов из бляшек на культуре клеток применяют для селекции пикорнавирусов, арбовирусов, аденовирусов, вирусов герпеса, оспы-осповакцины и миксовирусов. В основе метода лежит появление на монослое зараженных вирусом клеток под агаровым покрытием обесцвеченных участков или бляшек, образующихся на месте дегенерированных клеток. Бляшки представляют собой колонии вируса, образующиеся, как правило, из одного вириона.

Для получения бляшек используют однослойные культуры первично трипсинизированных или перевиваемых линий клеток, которые выращивают в матрацах, флаконах с ровной плоской поверхностью или в чашках Петри. Перед заражением среду сливают и культуру ткани дважды промывают фосфатным буфером или раствором Хенкса. Остатки жидкости тщательно удаляют пастеровской пипеткой. Затем на поверхность культуры в чашке Петри или 100 мл матраца наносят 0,3—0,5 мл соответствующего разведения вируса. Флаконы герметически закрывают стерильными резиновыми пробками и оставляют на 30—60 минут при комнатной температуре для адсорбции вируса клетками. Затем на поверхность монослоя клеток наносят 3—5 мл агарового покрытия. Через 10—15 минут после затвердения агарового покрытия флаконы, чашки Петри или матрацы переворачивают клеточным слоем кверху и помещают в термостат. При культивировании в чашках Петри в термостат непрерывно поступает смесь воздуха с 5—10% углекислоты.

За появлением бляшек наблюдают в течение нескольких дней. Матрацы просматривают на свет. На красном фоне бляшки будут иметь вид округлых участков прижизненно окрашенных нейтраль-ротом клеток (рис. 50). Время появления и морфология бляшек зависят от вида и штамма вируса, типа клеток и условий культивирования.

Агаровое покрытие по прописи Далбекко и Фогт состоит из 12 частей 2,7%-ного агара на дистиллированной воде, 12 частей раствора

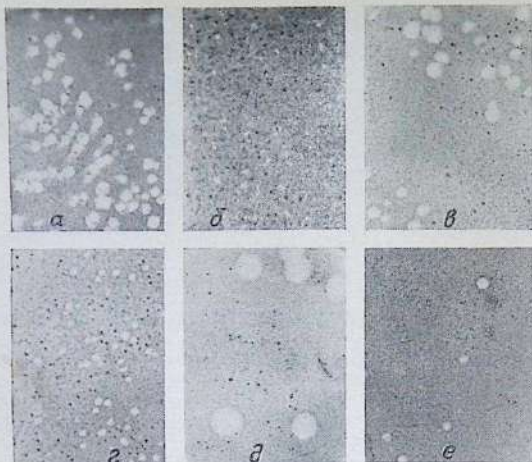


Рис. 50. Бляшки, образуемые вирусами на культуре фибробластов куриного эмбриона:

а — бляшки вируса гриппа А (штамм WSN); *б* — мелкобляшечный мутант вируса гриппа А (штамм WSN); *в* — бляшки вируса истинной чумы птиц; *г* — мелкобляшечный мутант вируса истинной чумы птиц; *д* — крупнобляшечный мутант вируса истинной чумы птиц; *е* — бляшки вируса обычного герпеса.

нейтральрота 1 : 10 000, 8 частей 4%-ного раствора Эрла (рН 7,4) и 5 частей куриного эмбрионального экстракта. Все ингредиенты добавляют к расплавленному и охлажденному до 42° агару. Перед внесением в матрицы покрытие охлаждают до 40°.

Существует ряд модификаций метода Далбекко и Фогт. В качестве агарового покрытия используют смесь из равных объемов (по 90 мл) 2,6—3%-ного агара на дистиллированной воде и питательной среды, состоящей из 18 мл 10%-ного раствора Эрла (без фенолового красного и соды), 60 мл стерильной дистиллированной воды, 3,6 мл сыворотки (телячьей или обезьяньей), 5,4 мл NaHCO_3 (7,5%), 3 мл нейтрального красного 1 : 10 000—1 : 20 000, пенициллина и стрептомицина (хлоркальциевого комплекса) по 18 тысяч ЕД.

Широкое применение получило также агаровое покрытие по прописи Портефильда и Аллисона (1960). В состав его входят смесь растворов Гея с равным количеством 2,6%-ного расплавленного агара.

На образование бляшек влияет ряд факторов: сыворотка, нейтральный красный, тип клеток, температура культивирования, концентрация NaHCO_3 , протаминсульфат, сульфатированные полисахариды

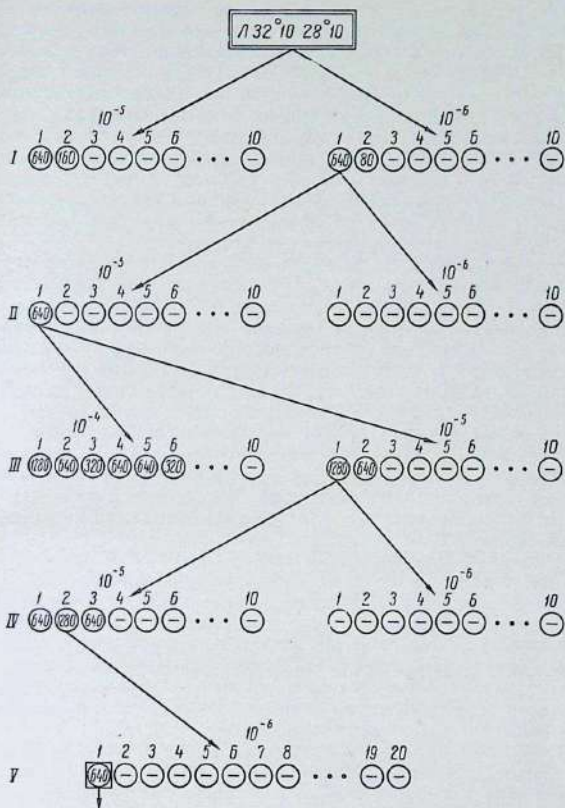


Рис. 51. Схема селекции вируса гриппа на куриных эмбрионах:

селекция варианта Л32°₁₀28°; I, II, III, IV, V — пассажи; 1, 2, 3... 10 — порядковый номер куриного эмбриона; цифра в кружочке — титр геммагглютинация; — — геммагглютинины не обнаружены; 10⁻⁵ — 10⁻⁶ — разведения культуры вируса,

агара, декстрансульфат и др. В связи с тем что нейтральный красный обладает фотодинамическим действием на клетки, что отражается на образовании колоний, первичное агаровое покрытие рекомендуют готовить без нейтрального красного, а монослой клеток красить им за сутки или несколько часов до подсчета бляшек (нейтральный красный 1 : 10 000 на фосфатном буфере или растворе Эрла наносят на поверхность агарового покрытия или поверх первого покрытия). Затем матрац помещают в термостат на сутки или на несколько часов, а при необходимости и на несколько дней.

Специальные подсчеты показали, что для образования одной бляшки достаточно одной инфекционной вирусной частицы. Однако это положение верно при определенных условиях и прежде всего при внесении в культуру сильных разведений культуры вируса, что исключает возможность множественного заражения клеток.

Популяция вируса, выделенная из одной бляшки, теоретически генетически однородна. Однако для большей уверенности необходимо проделать 3—5 последовательных пассажей отдельных бляшек. С этой целью поступают следующим образом: отобранную бляшку вместе с агаром извлекают пастеровской пипеткой и суспендируют в небольшом количестве (2—3 мл) питательной среды. Суспензию несколько раз замораживают и оттаивают, после чего заражают однослойную культуру клеток для получения второй генерации. Обычно делают не менее трех таких пассажей. При выделении клонов следует иметь в виду возможность слияния бляшек и диффузии вируса через агар. Поэтому для выделения клона следует брать флакон с небольшим количеством бляшек, при этом расстояние между ними должно быть не менее 10 мм, чтобы исключить возможность контаминации в результате диффузии вируса через агар.

Как показали наблюдения, не только разные виды вирусов, но и отдельные штаммы одного и того же вируса образуют бляшки, отличающиеся по размерам, морфологии и срокам появления. Эти свойства вирусов были использованы как дифференциальные признаки при селекции клонов. Следует, однако, отметить, что различия в размерах и сроках появления бляшек у различных штаммов одного и того же вируса могут зависеть от условий культивирования: от присутствия в агаре ингибиторов, подавляющих образование бляшек, от рН среды, концентрации NaHCO_3 и других факторов.

Селекция пассажами предельных разведений. Сущность метода заключается в том, чтобы вызвать инфекцию в курином эмбрионе или в культуре ткани единичным вирионом. Одновременно заражают предельными разведениями культуры 5—10 эмбрионов. От увеличения числа эмбрионов, а также от кратности пассажей вероятность выделения генетически однородного клона возрастает. Обычно ограничиваются 3—5 пассажами. Данный метод применяют для селекции вирусов, не образующие бляшек на культуре клеток. На рисунке 51 показана схема селекции одного из штаммов вируса гриппа.

Глава 11. ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСОВ

Краткие сведения о структуре и функции вирусного гена. Исходя из общих представлений о химических основах наследственности и структуре генетического аппарата, за ген, или цистрон у вируса, принимается участок молекулы нуклеиновой кислоты (ДНК, РНК), в котором содержится информация, определяющая последовательность аминокислот специфического полипептида. В данном случае ген представляется как система, кодирующая определенную функцию. Важнейшие свойства гена — способность его к репликации и изменчивости.

Структура генома у вирусов еще мало изучена. Однако не вызывает сомнений, что гены (цистроны) вирусов расположены в молекуле нуклеиновой кислоты в определенной линейной последовательности и основная их функция — программирование синтеза вирусспецифических (функциональных и структурных) белков. Известно также, что изменение в структуре гена приводит к соответствующему изменению первичной структуры белка и его функции. Эти данные явились экспериментальным обоснованием сформулированного ранее Бидлом и Татум положению «один ген — один фермент». Из этой формулы следует, что количество генов, контролирующих образование определенного соединения, соответствует числу ферментов, участвующих в его синтезе. Обоснование этой теории получило экспериментальное подтверждение в исследованиях по генетической регуляции метаболизма у бактерий (см. главу 5).

Таблица 8

Количество генов у некоторых видов зоопатогенных вирусов

Вирус	Тип нуклеиновой кислоты	Молекулярный вес ($\times 10^6$)	Количество генов
Полиома	ДНК	3,0	7
Папилломы кролика	ДНК	3,5	13
Оспы кролика	ДНК	160,0	400
Полиомиелита	РНК	2,0	10
Гриппа	РНК	2,0	10
Болезни Ньюкасла	РНК	7,5	37
Саркомы Рауса	РНК	10,0	50
Реовирус	РНК	10,0	25

Основную роль в раскрытии молекулярной структуры генома у вирусов сыграл рекомбинационный анализ, впервые примененный Бензером на бактериофаге Т4. Им была выяснена структура двух генов (цистронов А и В), расположенных в ч. II области этого фага. Составление генетической карты у вирусов предусматривает определенную линейную последовательность расположения генов, относительное расстояние между ними, выраженное в условных единицах, и величину или протяженность самих генов, также в условных едини-

цах. Наиболее полно в настоящее время изучена структура некоторых генов у Т-четных фагов. Ведутся исследования по расшифровке структуры генов у вирусов позвоночных (осповакцины, вирусов гриппа, полиомиелита и др.).

Число генов у различных видов вирусов варьирует в значительных пределах (табл. 8). Приведенные в таблице данные о количестве генов у некоторых видов вирусов получены путем теоретических расчетов, допуская, что для белка с молекулярным весом в 30 000 дальтон ген будет состоять из 1000 пар нуклеотидов и что для кодирования одной аминокислоты требуется три пары нуклеотидов. Сведения о количестве генов у вирусов позвоночных пока ограничены, и число экспериментально установленных вирусных генов у отдельных вирусов (полиомиелита, осповакцины, гриппа, арбовирусов) далеко не соответствует теоретическим расчетам. Это свидетельствует лишь о том, что многие гены у них еще не обнаружены.

Мутации у вирусов

В процессе репродукции вирусов в популяции могут появиться вирионы, отличающиеся по своим свойствам от исходного штамма. Эти изменения свойств и признаков могут наследоваться и не наследоваться в поколениях. Вирионов с наследственно измененными свойствами, возникших в результате естественного или индуцированного мутагенеза, относят к мутациям.

М у т а ц и и — это изменения в гене (или генах), приводящие к наследственному изменению признака и свойства. Различают мутации по происхождению (спонтанные и индуцированные), по направлению мутационного процесса (прямые и обратные) и по локализации их в геноме: мутации, вызванные выпадением участка молекулы нуклеиновой кислоты (одного или группы азотистых оснований) — делеции, мутации замещения одного или реже двух оснований и мутации, возникающие в результате вставок одного или группы оснований.

При **делеции** выпадение генетического материала захватывает частично или полностью ген, а иногда два или более соседних гена. К делециям относят не только выпадение крупных участков, но и одного-двух азотистых оснований, приводящие к нарушению порядка считывания информации во всех последующих кодонах и появлению «бессмысленных» триплетов. Следует отметить, что, если синтезируемый под контролем мутантного гена белок жизненно необходим и не может быть заменен продуктами действия других генов, мутантный ген оказывается летальным. При замене же в молекуле нуклеиновой кислоты одного или реже двух оснований другими основаниями структура большинства триплетов, составляющих ген, сохраняется. Синтез белка в таком случае не нарушается, но изменяется, и в результате такой мутации синтезируется видоизмененный белок. Таким образом, генные мутации выражаются либо полным прекращением функции гена, либо в большем или меньшем изменении конечного продукта (мутации замещения).

При прямых мутациях изменение признаков идет в направлении от дикого типа к мутантному, при обратных — наоборот. Генетические признаки диких и мутантных штаммов относительно постоянные, и в любой культуре мутантного штамма могут содержаться вирионы с признаками исходного штамма. Вполне естественно, что изменения признаков могут происходить как в прямом, так и в обратном направлении (реверсии). Восстановить мутантный признак можно при исправлении информации в том участке гена, который ранее был изменен в результате прямой мутации. Поскольку прямая мутация может возникнуть в любом участке гена, а для восстановления утраченной функции необходима обратная мутация в ранее измененном участке гена, то предполагают, что вероятность возникновения прямой мутации по одному признаку будет значительно превышать частоту обратных мутаций. Восстановление утраченной или измененной функции может произойти и путем так называемых супрессорных мутаций. Однако последние в отличие от истинных реверсий лишь частично исправляют генетическую информацию вируса. В силу этого их принято считать псевдореверсиями, которые представляют собой мутации, локализованные в смежном с первоначальной мутацией участке гена и являющиеся по отношению к ней супрессором.

К спонтанным (естественным) мутациям у вирусов относят такие наследственные изменения, которые возникают самопроизвольно, в нормальных (обычных) для данной популяции вируса условиях развития.

Спонтанные мутации — объективно случайные, но ход этого процесса зависит от действия внутренних и внешних факторов. Так как мутация может возникнуть в популяции в различное время ее развития, то и доля мутанта в популяции будет различной, в зависимости от числа репликаций после ее возникновения. В качестве показателя мутабельности определенного признака используют долю мутанта в популяции, исчисляемую как простое отношение абсолютного числа мутантов к общему количеству исследуемых по данному признаку вирионов. Спонтанные мутации формируются только в процессе развития вирусной популяции. В покоящемся состоянии под влиянием внешних причин у отдельных вирионов могут возникнуть предмутационные изменения, выявляющиеся в процессе репродукции вируса. Вполне понятно, что чем раньше возникнет мутация, тем больше будет представлен в популяции мутантный клон.

Частота мутаций зависит от свойств изучаемого штамма, типа культуры клеток, направления мутационного процесса (прямая или обратная мутация), его характера (точечная мутация или делеция) и от свойств изучаемого признака. В среднем частота мутаций у вирусов колеблется от 10^{-3} до 10^{-6} — 10^{-8} . Частота обратных мутаций, как правило, меньше прямых, однако иногда она достигает значительных величин.

Принято считать, что спонтанные мутации возникают вследствие таутомерного превращения оснований, входящих в состав нуклеиновой кислоты. Так, таутомерный сдвиг в положении атома водорода

у аденина приводит к тому, что аденин при репликации спаривается не с тиминном, а с гуанином. В результате при последующих репликациях пара оснований АТ заменяется на ГЦ.

Чаще спонтанные мутации относят к точечным, которые вызываются заменой одной пары оснований другой комплементарной парой и реже — делецией. Последняя приводит к утрате определенного признака, а не к нарушению функционирования соответствующего участка гена, как это происходит при вставке или выпадении нуклеотида.

Установлено, что в одних участках гена мутации возникают значительно чаще, чем в других. Участки гена с высокой частотой мутаций получили название «горячих точек». Существует несколько предположений о причинах различной мутабельности в тех или иных участках гена. В частности, это объясняется разными последствиями, которые вызываются изменениями в данном гене — приводят ли они к летальному эффекту или только к изменению функции, контролируемой этим геном.

Индукцированные мутации в отличие от спонтанных возникают при воздействии на вирусную популяцию определенными внешними факторами — мутагенами. К числу мутагенов относятся многообразные по структуре и свойствам химические соединения, различные виды радиации, температура и другие физические факторы.

Химический мутагенез. Мутагенное действие выявлено у многих химических соединений. В принципе любой химический агент, способный вызвать локализованный химический эффект, может быть мутагеном. Изучение химического мутагенеза у вирусов проводилось преимущественно на вирусах растений и фагах. Исследования по этой проблеме на вирусах позвоночных до сих пор ведутся в небольшом объеме из-за сложности проведения на них генетических экспериментов.

Способность химических агентов вызывать мутации явилась одной из основ для раскрытия механизмов мутационного процесса. Крупный вклад в эту проблему внес Э. Фриз. Сформулированный им ряд положений, раскрывающих молекулярные механизмы изменений информационных свойств нуклеиновых кислот, а именно путем различного типа замен пар азотистых оснований или выпадением их, получили экспериментальное подтверждение при изучении мутагенеза у вирусов.

Имеется ряд попыток классифицировать известные химические мутагены, в зависимости от способа их действия на генетические структуры. Наиболее рациональным является группировка по механизму действия их на нуклеиновые кислоты. В соответствии с этим принципом Э. Фриз (1964) разделил все мутагены на две группы:

1) мутагены, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами в процессе их репликации. Это в основном аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований и соединения, подавляющие нормальный синтез предшественников нуклеиновых кислот. В эту группу входят профлавин, азасерин, кофеин, а из аналогов азотистых оснований — 5-бромурацил, 2-аминоцуридин и др.;

2) мутагены, реагирующие с нуклеиновыми кислотами, находящиеся в покое в состоянии. В данном случае формирование мутаций происходит в процессе последующих репликаций нуклеиновой кислоты. К этим мутагенам относят гидроксилламин, алкилирующие соединения и азотистую кислоту.

В зависимости от механизма действия химические мутагены принято делить на три основных группы: 1) вещества, замещающие азотистые основания в молекуле нуклеиновой кислоты во время репликаций; 2) вещества, взаимодействующие с азотистыми основаниями в покоящейся молекуле нуклеиновой кислоты; 3) вещества, вызывающие делеции или вставки оснований.

Приводим краткие сведения о действии на вирусы позвоночных ряда химических мутагенов.

Мутагенное действие аналогов азотистых оснований. Из аналогов пуриновых и пиримидиновых оснований наиболее изучено мутагенное действие 5-бромурацила, 5-фторурацила, 5-бромдезоксиуредина и 2-аминопурина. Аналоги азотистых оснований отличаются от природных оснований большей тенденцией к неправильному спариванию. Механизм мутагенного действия их в конечном счете сводится к простой замене ими природных оснований нуклеиновой кислоты во время ее репликации. Так, 5-бромурацил замещает тимин, поэтому при следующей репликации в месте включения аналога вследствие неполного соответствия его природному основанию (тимину) возможна ошибка репликации, то есть пара оснований аденин — тимин (А — Т) заменяется на гуанин — цитозин (Г — Ц).

Данных о мутагенном действии аналогов оснований на вирусы позвоночных немного. При пассажах патогенного штамма вируса полиомиелита типа 3 в присутствии 5-бромурацила были выделены мутанты, утратившие вирулентность для мышей. Аналогичные данные получены при культивировании вируса клещевого энцефалита: по сравнению с исходным штаммом мутант обладал более низкой вирулентностью для мышей при периферическом пути введения вируса. При культивировании вируса оспы кроликов в присутствии 5-бромурацила или 2-аминопурина возникали температурочувствительные мутанты.

Мутации, индуцируемые алкилирующими соединениями. К наиболее изученным и активным мутагенам данной группы следует отнести иприт и его производные, этиленмин, N-нитрозоалкилмочевины, N-нитрозометилмочевины, N-нитрозоалкилуретаны, метилметансульфат, этилэтансульфонат, диэтил- и диметилсульфаты, алкилсульфаты, формальдегид и др. Механизм действия этих соединений в основном сводится к удалению из молекулы нуклеиновой кислоты того или иного основания, в результате чего в ней образуется «выпадение», приводящее к нарушению считывания генетической информации. Мутагенное действие наблюдали в опытах с фагами, вирусами растений и позвоночных. Мутанты возникали как при воздействии на внеклеточный вирус, так и при непосредственной обработке вирусной нуклеиновой кислоты. В опытах с фагами T2 и T4 наиболее выражены

ным мутагенным действием обладали этилметансульфонат, этилэтансульфонат и диэтилсульфат. При обработке РНК вируса табачной мозаики окисью этилена, йодацетатом, ипритом, диметилсульфатом мутации чаще возникали при воздействии последним.

При культивировании вируса западного лошадиного энцефаломиелита в присутствии N-нитрозометилмочевины появлялись мелкобляшечные мутанты, а также мутанты, апатогенные для мышей при периферическом заражении. Мутации возникали и при обработке внутриклеточного вируса формальдегидом в период латентной стадии размножения. У вируса полиомиелита, оспы кроликов и оспы коров мутаций не наблюдали как при воздействии на внеклеточный вирус, так и при культивировании в среде с формальдегидом. И только при непосредственном воздействии на вирусную РНК удавалось получить мелкобляшечных и температурочувствительных мутантов.

Мутагенное действие окислителей. В эту группу соединений входит азотистая кислота (HNO_2), которая путем дезаминирования превращает аминооснования в оксиоснования (аденин в гипоксантин, гуанин в ксантин, цитозин в урацил). В результате превращения аденина в гипоксантин последний будет спариваться не с тиминном, как аденин, а преимущественно с цитозином. Цитозин превращается в урацил, который подобно тимину будет спариваться преимущественно с аденином, а не с гуанином. Таким образом, при воздействии азотистой кислотой происходит замена пары Г — Ц на А — Т и А — Т на Г — Ц.

Азотистая кислота является одним из примеров специфичности действия мутагенов на молекулярном (нуклеотидном) уровне, так как она дезаминирует только те основания, которые содержат аминогруппу (аденин, гуанин, цитозин). На уровне гена действие ее неспецифично, так как одни и те же основания в большом количестве входят во все гены. Поэтому изменение определенного основания в каком-либо гене столь же вероятно, как и в другом гене. По этой причине нельзя отождествлять специфичность действия мутагена на соответствующее основание со спецификой действия его на ген.

Впервые мутагенное действие азотистой кислоты установлено на вирусе табачной мозаики, а вскоре и на фагах. Затем была показана возможность возникновения мутантов не только при воздействии этой кислоты на внеклеточный фаг, но и инфекционную ДНК фага ФХ174.

Азотистые мутанты, отличающиеся по морфологии бляшек, получены у вирусов болезни Ньюкасла, ящура, энцефаломиокардита, восточного лошадиного энцефаломиелита, полиомиелита, гриппа. Мутанты с ослабленной вирулентностью для мышей селекционированы при воздействии HNO_2 на вирусы восточного лошадиного энцефаломиелита, ЕСНО 9, гриппа. У вирусов полиомиелита и полиомы азотистая кислота индуцировала температурочувствительные мутанты, не размножающиеся при 40° .

Мутагенное действие гидроксилamina (NH_2OH) на вирусы впервые было показано в опытах с вирусом болезни Ньюкасла, обработанного этим агентом *in vitro* в присутствии высокой концентрации хлористого натрия. При этом наблюдали появление трех

типов бляшек: «красных», мелких и мельчайших размеров. При воздействии гидроксилamina на внеклеточный вирулентный вирус полиомиелита или его РНК формировались rst 40⁺, rst 25⁻-мутанты, причем частота возникновения была в 6—8 раз выше. В аналогичных опытах с аттенуированными штаммами вируса полиомиелита мутантов не наблюдали.

В опытах с этими вирусами отчетливо выявили, что частота мутаций зависит от рН среды, в которой обрабатывается вирус или вирусная нуклеиновая кислота. Мутанты вируса табачной мозаики наблюдали лишь в том случае, если РНК вируса обрабатывали гидроксилaminом при рН 6,1, а при рН 9,1 — отмечали только инактивацию вируса. При обработке РНК вируса полиомиелита наиболее высокая частота мутаций была при рН 9,1, а при рН 6,1 — мутантов по S-признаку не обнаруживали. При обработке гидроксилaminом вируса болезни Ньюкасла при рН 6,0 мутантов появлялось почти в 2 раза больше, чем при рН 7,5. При сильнощелочной реакции (рН 9,0) мутанты возникали крайне редко или их совсем не было.

Подобная зависимость от рН среды, по-видимому, объясняется различной скоростью реакции гидроксилamina с нуклеиновой кислотой вируса. При обработке РНК вируса табачной мозаики при рН 6,15 цитозин реагирует с гидроксилaminом в 30 раз быстрее, чем урацил, и, наоборот, при рН 9,15 последний взаимодействует в 8 раз быстрее цитозина. При этом выяснилось, что в слабощелочной среде с гидроксилaminом реагирует только цитозин. По мере снижения рН среды скорость взаимодействия цитозина ДНК с гидроксилaminом возрастала, а при повышении рН — снижалась. Предполагают, что мутанты у вируса табачной мозаики и Т-четных фагов появлялись в результате взаимодействия гидроксилamina с цитозином, с последующей заменой пары оснований гуанин — цитозин на аденин — тимин.

Мутагенное действие акридиновых красителей. Наиболее изученный представитель этой группы — профлавин. Как было показано на фагах, он индуцирует мутации, обусловленные выпадением или вставкой оснований. Предполагают, что это соединение включается между двумя пуриновыми основаниями в одной из нитей ДНК, в силу чего молекула ДНК удлиняется, а образовавшиеся комплексы мешают нормальной ее репликации. В результате во вновь синтезированной молекуле ДНК либо будет не хватать (делеции) или окажется лишней (вставки) одна или несколько пар оснований.

Впервые мутагенное действие акридиновых красителей на репродуцирующийся вирус было установлено в опытах с фагом Т2, а позднее с вирусами позвоночных. Так, при культивировании вируса полиомиелита в культуре клеток в присутствии профлавина возникали мутанты, различные по морфологии бляшек. При культивировании вируса клещевого энцефалита получены мутанты с ослабленной вирулентностью для мышей.

Мутагенное действие ионизирующих и ультрафиолетовых излучений. Ионизирующая и ультрафиолетовая радиация — постоянно действующие факторы внешней

среды, обладающие большой биологической активностью, приводящей при определенных условиях облучения к мутагенному или летальному эффекту.

Данные о мутагенном действии излучений впервые были получены на микроорганизмах (Г. А. Надсон и Г. С. Филипов, 1925), а вскоре и в экспериментах с дрозофилой (Меллер, 1927) и растениями (Геджер и Блэкли, 1927; Стадлер, 1928). Эти открытия явились исходным пунктом зарождения радиационной генетики. После этого радиацию (особенно рентгеновую и ультрафиолетовые лучи) стали широко использовать для индукции мутаций у грибов, бактерий, фагов и в значительно меньшей степени у вирусов растений и позвоночных.

Первые исследования по мутагенному действию излучений были проведены с вирусом табачной мозаики. Причем при облучении рентгеновскими и гамма-лучами внеклеточного вируса мутантов не получали. Мутации возникали лишь при облучении инфицированных листьев табака. Аналогичные результаты отмечены от ультрафиолетового облучения внутриклеточного вируса. Однако в последние годы доказано мутагенное действие ультрафиолетовых и гамма-лучей при облучении внеклеточного фага. В этом отношении наиболее изучен бактериофаг *CD. E. coli*. Селекционированные УФ-мутанты бактериофага четко отличались от исходного штамма морфологией негативных колоний (мелкие, без ореола), а частота возникновения их при оптимальных дозах облучения достигала 1—2% среди выживших фагов, то есть индуцированные УФ-лучами мутанты появлялись в 100 раз чаще по сравнению со спонтанными.

Большой интерес представляют результаты исследований по облучению внеклеточного бактериофага ФХ174 и выделенной из него инфекционной ДНК. Выяснилось, что фаг обладает несколько большей радиочувствительностью, чем ДНК. Кроме того, у фага отмечена большая частота возникновения термочувствительных мутантов. Селекционированные мутанты в обоих случаях были сходны по биологическим свойствам.

Мутагенное действие излучений на вирусы позвоночных стали изучать сравнительно недавно. При ультрафиолетовом облучении репродуцирующего в культуре клеток вируса чумы птиц выделены мутанты, обладающие способностью образовывать бляшки на культуре клеток штамма Дейтройт-6 и *Her*. Облучение в таких же условиях вируса клещевого энцефалита сопровождалось возникновением мутантов, оказывающих цитопатическое действие на куриные фибробласты. При обработке внутриклеточного вируса западного энцефаломиелиита лошадей, образующего крупные бляшки, возникали мутанты, образующие мелкие бляшки.

При облучении вирулентного и аттенуированного штаммов вируса полиомиелита в период репродукции в культуре клеток почки обезьяны появлялись мутанты, отличающиеся от исходных штаммов по морфологии бляшек и *het*-признаку.

О мутагенном действии излучений на внеклеточные вирусы позвоночных получены противоречивые данные.

Установлено, что основным компонентом, определяющим мутагенный эффект у вирусов при облучении, является нуклеиновая кислота. Подтверждают это следующие данные. Спектр мутагенного действия ультрафиолетовых лучей совпадает обычно со спектром поглощения нуклеиновых кислот. Чувствительность фагов к ультрафиолетовому излучению вне клетки равна чувствительности их в клетке. И, наконец, чувствительность ДНК фага к УФ-облучению совпадает с таковой у нативного фага.

Как выяснилось, прямое действие УФ-лучей сводится в основном к захвату фотона молекулой нуклеиновой кислоты, возбуждение которой становится исходной точкой для фотохимического процесса вплоть до изменения наследственных структур. Пуриновые основания более устойчивы к УФ-лучам, чем пиримидиновые. Мутагенный эффект, индуцируемый ультрафиолетовыми лучами, зависит от величины дозы облучения. Наибольшая частота мутаций наблюдается при длине волны 2650Å. Частота мутаций возрастает по мере увеличения дозы облучения, а затем уменьшается, что обусловлено несколькими попаданиями фотонов на одну мишень.

Основные процессы, приводящие к возникновению мутантов при ультрафиолетовом облучении, протекают в следующей последовательности: попадание фотонов в молекулы и переход их в возбужденное состояние; затем развиваются фотохимические процессы, гидратация оснований, димеризация оснований, дезаминирование оснований. Развитие этих процессов нарушает последовательность оснований в молекуле нуклеиновой кислоты, изменяет кодирование и синтез белков.

Мутагенный эффект УФ-лучей связан не только с непосредственным воздействием их на нуклеиновую кислоту. На него влияют также возникающие в клетке и среде свободные Н и ОН радикалы, перекиси и другие продукты, обладающие мутагенным действием. Известно, что УФ-лучи вызывают диссоциацию молекулы кислорода. Образующийся при этом атомарный кислород, будучи сильным окислителем, приводит к образованию ОН радикалов, вступающих в реакцию с нуклеиновыми кислотами, что и приводит к мутационным изменениям. Последние возникают в результате дезаминирования или дегидроксилирования оснований, частичного разрушения пиримидинового кольца, разрыва гликозидных цепей или цепи нуклеотидов с освобождением фосфата.

При облучении внеклеточного вируса мутации возникают в результате непосредственного поглощения квантов вирусной нуклеиновой кислотой. Когда же облучается внутриклеточный вирус, фотоны могут первично адсорбироваться не только молекулой нуклеиновой кислоты, но и свободными азотистыми основаниями, которые затем включаются при синтезе вирусной нуклеиновой кислоты.

На основании экспериментальных данных о действии радиационных излучений на нуклеиновые кислоты считают, что основную роль в возникновении мутаций у вирусов играют генные мутации. В частности, это находит подтверждение в исследованиях при непосредственном действии УФ-лучей на нуклеиновые кислоты, в которых было установлено, что, помимо разрыва углеводно-фосфатных связей, происходят также изменения азотистых оснований (превращение цитозина в урацил, образование димеров тимин — тимин или урацил — урацил). При облучении УФ-лучами фага Т4 нередко наблюдали замену пары цитозин — гуанин на пару аденин — тимин. Почти у половины изученных мутантов изменения генотипа были связаны с выпадением или вставкой азотистых оснований. Делеции, по-видимому, могут возникать в результате димеризации оснований (тимин — тимин), нарушающих нормальный процесс транскрипции генетической информации с измененной нуклеиновой кислотой вируса. Однако мутагенный эффект УФ-лучей на вирусы обусловлен главным образом

как заменой оснований (Ц на Т или пары Ц — Г на А — Т), так и выпадением или вставкой их, а возникающие наследственные изменения в геноме вируса являются следствием не только непосредственного действия излучений на нуклеиновую кислоту вируса, но и опосредованного, при участии возникающих в облученной клетке и в среде мутагенных веществ.

Проявление мутаций. Об изменчивости вируса судят по изменению фенотипических свойств, являющихся отражением или проявлением изменений генотипа. С этой целью используют различные признаки и свойства вируса, особенно изменения бляшкообразующей способности. Однако такого типа признаки по своей природе являются полигенными, и механизмы, вызывающие их, нередко различны. Так, неодинакового размера бляшки могут быть причиной нарушения структуры капсиды, приводящей к изменению адсорбционной способности вируса, различной чувствительности мутанта к высокополимерным поликатионам и полианионам, к температуре культивирования, разной скорости диффузии в агаровом геле, а также результатом нарушения в синтезе нуклеиновой кислоты и вирусных белков. Изменения бляшкообразующей способности у мутанта может быть обусловлено изменением чувствительности его к интерферону и другим метаболитам клетки, а также синтетическим подавителям репродукции вирусов.

Как при спонтанном, так и индуцированном мутационном процессе у вирусов меняются морфологические и функциональные признаки. Морфологические изменения выявляют электроноскопическими методами, а при изменении первичной структуры вирусных белков пользуются специальными биохимическими методами. В результате этих изменений нарушается процесс репродукции вируса. К числу биохимических мутантов у вирусов следует отнести так называемые температурочувствительные мутанты (*ts*-мутанты), способные репродуцироваться при нормальных температурных условиях, а при повышенной температуре репродукция их подавляется. Их относят к условно летальным мутантам, то есть они способны нормально репродуцироваться в одних условиях и не способны к репродукции в других, так называемых непереносимых (непереносимых) условиях.

Температурочувствительные мутации широко распространены у вирусов позвоночных. Этот тип мутаций, как и другие летальные мутации, могут изменять любую функцию вируса. Такого типа мутации получены у всех групп вирусов позвоночных. Температурочувствительные мутанты очень удобная модель для проведения генетических исследований: мутаций и рекомбинаций. Они нашли также широкое применение при изучении функции генов на молекулярном уровне.

Мутации у вирусов могут приводить к изменению биохимических функций. Например, утрата тимидинкиназной активности у мутантов вирусов осповакцины и герпеса, чувствительность или потребность в аминокислоте цистине или устойчивость к гуанидину — у мутантов вирусов ящура и полиомиелита.

Изменчивость вирусов при пассажах

Изменчивость вирусов при пассажах на животных. Основоположником этого метода изменения наследственности вирусов был Пастер (1882), впервые получивший живую антирабическую вакцину путем серийных пассажей через мозг кролика дикого (вирулентного) штамма вируса бешенства. Уже тогда было продемонстрировано, что изменчивость вирулентности вируса в процессе пассажей происходит не сразу, а поэтапно, путем последовательных наследственных изменений. Так, при внутримозговом заражении кролика культурой вируса десятого пассажа инкубационный период колебался от 10 до 14 дней, после 21-го пассажа он сократился до 7—8 дней, а штамм, выделенный после 90-го пассажа, обладал строго фиксированным инкубационным периодом (6—7 дней) для кролика и был авирулентным для человека. Селекционированный аттенуированный вариант был использован для иммунизации людей против бешенства.

Аттенуированный штамм при подкожном введении утратил патогенность для собак и кроликов, не проникал в слюнные железы, более активно размножался в мозгу кролика, вызывая при этом менее выраженные патоморфологические изменения в ЦНС; как исключение вызывал образование телец Бабеш — Негри и, наконец, быстро инактивировался глицерином. Этими исследованиями был открыт один из методов экспериментального получения живых вакцин против вирусных болезней.

Аттенуированные штаммы вируса бешенства получены также и в процессе длительных пассажей вируса на цыплятах и куринных эмбрионах. Однако, как выяснилось позднее, варианты с ослабленной вирулентностью могут быть получены значительно быстрее — после 7—8 внутримозговых пассажей на новорожденных цыплятах. Столь же быстрые изменения вирулентности вируса бешенства наблюдали и при внутримозговых пассажах на кроликах, если для последующих пассажей брали мозг в инкубационном периоде. Мутанты обладали пониженной вирулентностью при экстраневральном введении белым мышам и кроликам и обладали рядом свойств, характерных для фиксированного вируса бешенства.

В ряде исследований показана изменчивость ряда свойств у вируса осповакцины при пассажах на животных (кроликах, телятах и других животных). Успешные опыты были проведены с вирусом желтой лихорадки, показавшие возможность значительного усиления нейровирулентности для мышей при пассажах через мозг, с одновременной утратой вирулентности для обезьян при подкожном и внутрибрюшинном введении. В процессе чередующихся подкожных и внутрибрюшинных пассажей был селекционирован авирулентный вариант для мышей, сохранивший иммуногенные свойства. После 260 пассажей селекционированный мутант использовали для приготовления живой вакцины.

Изменчивость вирулентности и других признаков при пассажах на животных наблюдали у вирусов ящура, чумы свиней, истинной чумы птиц, болезни Ньюкасла, гриппа и др.

Изменчивость вирусов при пассажах на куриных эмбрионах. Метод пассажей на куриных эмбрионах получил широкое распространение при изучении изменчивости многих вирусов (осповакцины, ящура, бешенства, гриппа и др.). При пассажах вируса осповакцины отмечали усиление патогенности для куриного эмбриона и для кролика при подкожном введении. Был выделен мутант по ряду генетических признаков, сходный с вирусом натуральной оспы.

Вирус бешенства после 30 пассажей на куриных эмбрионах приобрел способность проникать во все ткани и органы зародыша, а после 75 пассажей — утратил вирулентность для кроликов при заражении в мозг.

При пассажах в куриных эмбрионах вируса ящура наблюдали снижение вирулентности для крупного рогатого скота, а после 120 пассажа вирус утратил не только патогенные, но и иммуногенные свойства. Пассажами в куриных эмбрионах был получен высокоиммуногенный штамм «Н» вируса ньюкаслской болезни, нашедший широкое применение для приготовления живой вакцины. При пассажах на утиных эмбрионах было выделено несколько вакцинных штаммов этого вируса.

Однако при длительных пассажах в куриных эмбрионах не всегда отмечали снижение вирулентности (вирусы ньюкаслской болезни, инфекционного аборта лошадей, лошадиного энцефаломиелимита, западно-нильского и венесуэльского энцефалитов, оспы птиц, классической чумы птиц и др.). Так, из 16 штаммов вируса чумы крупного рогатого скота только один штамм утратил вирулентность, сохранив иммуногенные свойства.

Изменчивость вирусов при пассажах в куриных эмбрионах зависит от ряда условий: свойства штамма вируса, возраста эмбрионов, способа их заражения, чередования пассажей на восприимчивом животном и эмбрионе и других факторов.

Изменчивость вирусов при пассажах на культуре клеток. Культура клеток — один из наиболее часто применяемых методов для изменения вирулентности и других свойств вирусов. Широкое использование этого способа дало возможность получать наследственно измененные варианты вирусов и селекционировать их из генетически неоднородной вирусной популяции. Кроме первично трипсинизированных тканей, с этой целью широко использовали перевиваемые линии клеток. Причем отдельные клеточные линии могут быть высокочувствительными к определенным вирусам, но тем не менее в них вирус не накапливается в высоких титрах. Другие же клеточные линии, обладая пониженной чувствительностью к вирусам, обеспечивают накопление их в высоких концентрациях.

Используя перевиваемую (штамм *HeLa*) или первичные культуры тканей, были выделены аттенуированные штаммы вируса классической чумы птиц. Вирулентность вируса японского энцефалита была ослаблена пассированием в культуре клеток почки хомяка с последующими пассажами на мышях-сосунках. Выделенный вариант вируса утратил вирулентность для мышей при внутримозговом заражении и не передавался комарами.

За последние годы появилось много обнадеживающих сообщений о получении стабильных авирулентных штаммов вируса ящура при пассажах на различных типах культуры ткани. После многократных пассажей в культуре ткани куриного эмбриона вируса желтой лихорадки наблюдали утрату нейротропных и висцеротропных свойств для обезьян с сохранением иммуногенности. Этот вариант (штамм 17Д) успешно используется для приготовления живой вакцины.

При пассажах вируса полиомиелита в культуре почечной ткани обезьян был выделен ряд мутантов, не вызывающих у обезьян параличей при введении в головной и спинной мозг. Авирулентные штаммы были получены при быстро следующих друг за другом пассажах, благодаря чему создаются благоприятные условия для отбора вариантов, обладающих наибольшей активностью размножения. Сочетая отбор с многократными пассажами, были выделены мутанты с наследственно ослабленной нейровирулентностью для обезьян. Для снижения вирулентности необходимо было проделать 20—40 пассажей.

Изменчивость вирусов, возникающая в процессе пассажей при пониженных и повышенных температурах. Убедительные данные об ослаблении вирулентности в процессе пассажей при пониженной температуре получены в опытах с вирусом ящура. Вирус пассировали на первичных культурах почки телят при 37°, 28° и 22°. Вирулентность проверяли на свиньях и мышах-сосунках. Как выяснилось, все авирулентные для свиней варианты не размножались в культуре клеток при 40°. В то же время вирулентные и авирулентные штаммы одинаково активно размножались при 28°, а при 22° активно репродуцировались только авирулентные варианты. Однако не у всех авирулентных для свиней штаммов оптимум температуры размножения был ниже 37°. Отдельные варианты более активно размножались при 37° и не размножались при 22°.

Таким образом, не во всех случаях ослабление вирулентности для свиней и мышей сопровождалось изменением активности репродукции при пониженных температурах, что не дает основания считать существование абсолютной взаимосвязи у вируса ящура между вирулентностью и активностью репродукции при пониженной и повышенной температурах.

В ряде наблюдений была также показана возможность получения авирулентных вариантов у других вирусов в процессе пассажей их при пониженных температурах (гриппа, чумы свиней, полиомиелита, кори, японского энцефалита и др.).

Так, при пассажах вируса гриппа на куриных эмбрионах при пониженных (32—25°) температурах были селекционированы мутанты, более активно размножающиеся при 28° и 32°, чем при 36°. У них закономерно наблюдалось ослабление или полная утрата вирулентности и токсических свойств. И, наоборот, мутанты, селекционированные в процессе пассажей при повышенных температурах, более активно размножались при 39° и 41°, чем исходные штаммы. Варианты утратили способность размножаться при 25—28°.

Сходные результаты были получены в опытах с другими видами вирусов. На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что пассажи вирусов при пониженных температурах, как правило, приводили к появлению вариантов с ослабленной вирулентностью. Снижение или полная утрата ее в ряде случаев коррелировала с утратой способности размножаться при повышенных температурах.

Причины изменчивости вирусов при пассажах еще мало выяснены. Поэтому всегда встает вопрос: появляются ли варианты при пассажах вследствие селекции их из генетически неоднородной исходной популяции вируса или же это результат спонтанных мутаций? К последним относят наследственные изменения, возникающие в «нормальных» условиях развития, то есть при естественном процессе наследственной изменчивости. Причины возникновения спонтанных мутаций в каждом конкретном случае остаются не выясненными, то есть их считают объективно случайными. Случайность возникновения этих мутаций нужно понимать лишь как случайно воспроизводимый процесс изменения наследственности, а не как беспричинно возникающее явление.

О причинах возникновения вариантов в процессе пассажей вируса имеется несколько точек зрения. Согласно селекционной теории культура вируса генетически неоднородна и в процессе пассажей на животных или культуре клеток происходит отбор и накопление варианта, для которого данные условия культивирования более благоприятны. Существует также взгляд, что варианты появляются в результате отбора спонтанно возникающих мутантов.

Обе точки зрения дополняют друг друга, однако они не учитывают возможность другой причины возникновения вариантов при пассажах — рекомбинации вирусов.

Одна из особенностей изменчивости вирусов при пассажах, которая ранее ошибочно трактовалась как адаптационная, состоит в том, что вызывающие изменчивость и отбор условия иногда могут быть одними и теми же и в таком случае возникающие варианты являются по существу приспособительными. Такого типа изменения отличаются от модификационной (ненаследственной) изменчивости, когда изменение фенотипических проявлений генетических признаков происходит у всей или почти у всей популяции одновременно, а наблюдающиеся изменения свойств не стабильны, восстанавливаются при культивировании вируса в прежних условиях среды. В отличие от модификационной изменчивости мутации (спонтанные и индуцированные) возникают редко. Спектр изменений признаков у них шире, чем у спонтанных мутантов, и реверсия их в исходное состояние наблюдается очень редко.

Изменчивость вирусов при пассажах принципиально не отличается от мутаций, возникающих при воздействии физическими и химическими мутагенами, так как в обоих случаях изменения признаков у вируса связаны с изменениями в его гено типе. Различия между ними не существенны и главным образом количественные. Одна из особенностей изменчивости при пассажах состоит в том, что для изме-

нения генетических признаков, особенно таких сложных полигенных признаков, как патогенность или репродуктивная активность, требуется ряд мутаций, возникающих в серии пассажей. Такого типа многоступенчатые мутации являются отражением процесса перехода количественных изменений в качественные. Следует при этом отметить, что изменения свойств у вирусов при пассажах возникают раньше, чем мы их обнаруживаем. С момента появления первых изменений до выявления их проходит какой-то период накопления количественных изменений, которые на каком-то этапе пассажей переходят в качественные, существенно изменяющие наследственные признаки вируса.

Генетические и негенетические взаимодействия вирусов

В изучении взаимодействия вирусов достигнуты значительные успехи, расширяющие наши представления о сущности явлений, наблюдаемых при смешанной инфекции вирусами. При этом были обнаружены не только явления, общие для всех живых существ, как, например, гибридизация и гетерозиготность, но и были открыты ранее неизвестные явления, которые присущи только вирусам. К ним следует отнести фенотипическое смешивание, генетическую и негенетическую реактивацию, транскриптацию.

Все известные в настоящее время типы взаимодействий между вирусами можно распределить на негенетические и генетические.

Негенетические взаимодействия включают явления фенотипического смешивания, негенетическую реактивацию, комплементацию, стимуляцию и интерференцию.

Фенотипическое смешивание. При одновременной репродукции в клетке двух генетически различных вирусов могут образовываться вирионы с генотипом одного из исходных штаммов, но обладающих антигенными свойствами обоих вирусов. Фенотипически смешанные формы нейтрализуются сыворотками против обоих исходных штаммов. Такие вирионы воспроизводят в первом поколении признаки того штамма, нуклеиновую кислоту которого они содержат. Из них, как правило, уже в первом пассаже выделяются исходные штаммы (рис. 52).

Явление фенотипического смешивания наблюдали у фагов, миксовирусов, ЕСНО, коксаки, полиомиелита, у арбовирусов группы А. Так, при смешанной инфекции вирусами гриппа типа А и В, А и А2 в популяции могут содержаться вирионы, обладающие антигенными свойствами обоих типов. При пассировании происходит их расщепление на исходные штаммы. Фенотипическое смешивание отмечали при культивировании далеких видов вирусов, например вирусов ЕСНО и полиомие-

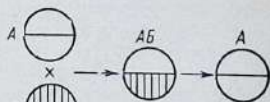


Рис. 52. Фенотипическое смешивание.

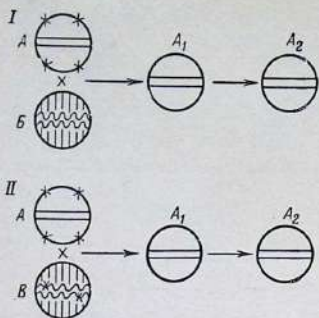


Рис. 53. Негенетическая реактивация:
 I — реактивация инактивированного вируса А живым вирусом В; II — реактивация инактивированного вируса А инактивированным вирусом В; A_1 и A_2 — живой вирус первого и второго поколения.

ного вируса (В) (рис. 53). Причем в качестве реактиватора может быть не только жизнеспособный вирус В, но и вирус В, ДНК которого повреждена и лишена репликативной функции. Ответственным за реактивацию является общий для них белок, входящий в состав S-антигена. Учитывая это, а также тот факт, что у реактивированного вируса все признаки сходны с исходным инактивированным вирусом, можно полагать, что в основе реактивации лежат механизмы физиологического, а не негенетического характера.

Комплементация. При мутации в геноме вируса могут возникнуть повреждения, лишаящие его способности к самостоятельной репродукции. Но если в клетку проникнут два дефектных штамма, у одного из которых повреждения локализованы в гене, ответственном за синтез, например, раннего белка (РНК-полимеразы), а у другого в гене, программирующем синтез структурного белка, то каждый из них может взаимно использовать фермент, синтез которого индуцируется другим штаммом. В результате такой компенсации или синергизма два дефектных вируса, неспособных репродуцироваться по одиночке, при двойной (смешанной) инфекции проходят полный цикл репродукции. При такой взаимной комплементации генотипы взаимодействующих вирусов не изменяются, заимствуется лишь фермент, синтез которого индуцируется другим вирусом (рис. 54).

Стимуляция. Сходное с описанным выше явлением взаимодействия вирусов наблюдается при смешанной инфекции двумя генетически различными вирусами, один из которых не способен вызвать индукцию какого-либо фермента, необходимого для синтеза нуклеиновой кислоты или оболочечного белка. Такой дефектный вирус может

Таим образом, у смешанных форм генотип и фенотип полностью не соответствуют друг другу. В оболочке полученных вирусов появляются структурные белки обоих родительских штаммов. Это и понятно, так как при фенотипическом смешивании объединяются только структурные белки вирусов, генетического же взаимодействия между их нуклеиновыми кислотами не происходит.

Негенетическая реактивация обнаружена пока у вирусов группы оспы. При данном явлении инактивированный вирус (А) в результате денатурации структурных белков приобретает способность размножаться благодаря активности белков другого родственного

использовать ферменты или другие компоненты, индуцированные только вторым вирусом-помощником. Например, вирус саркомы Рауса не может индуцировать синтез структурных белков, а для построения своей оболочки использует белки вируса лейкоза птиц. В присутствии последнего из трансформированных вирусом саркомы Рауса куриных фибробластов выделяется вирус Рауса.

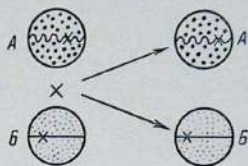


Рис. 54. Комплементация.

Вирусами-помощниками считают парагриппозный вирус типа 3 по отношению вируса болезни Ньюкасла в культуре почек обезьян, парагриппозный вирус типа 1 (Сендай) по отношению к полиовирусу в культуре куриных фибробластов и клеток эмбрионов хомячка. Вообще к вирусам-помощникам относят такие вирусы, чья репродукция обеспечивает полную репликацию других вирусов, у которых при отсутствии в клетке соответствующего вируса репродукция происходит неполно.

Интерференция — подавление репродукции одного вируса другим. Интерференция возможна на внеклеточной и внутриклеточной стадии существования вирусов. Вне клетки интерференция одного вируса другим совершается на стадии адсорбции их на клетке, причем если вирусы имеют общие рецепторы. В результате предварительной адсорбции одного вируса клеточные рецепторы насыщаются этим вирусом, благодаря чему адсорбция и проникновение в клетку другого вируса затрудняются или вообще становятся невозможными. На внутриклеточной стадии интерференция происходит при участии клеточного белка, индуцированного вирусом, в присутствии которого подавляется одна из стадий репродукции другого вируса. Это белковой природы вещество получило название интерферона (см. главу 13). Наряду с подавлением репродукции одного вируса другим возможна взаимная интерференция, механизм которой еще не известен. Интерференция наблюдается у фагов, вирусов растений и животных.

Генетические взаимодействия вирусов. При попадании в клетку генетически различных штаммов или разновидностей вирусов возможны различные формы генетического взаимодействия их: множественная реактивация, гибридизация, гетерозиготность и транскрипция.

Все эти явления приводят к изменению наследственности у вирусов, и их можно объединить одним понятием — рекомбинация.

Множественная реактивация. Впервые ее наблюдали при заражении бактериальной культуры массивной дозой инактивированного УФ-лучами фага T2, когда на одну клетку приходилось два и более инактивированных вирионов. Вероятность реактивации фага повышалась с увеличением числа инактивированных фаговых частиц на одну бактериальную клетку. Дело в том, что инактивация фага УФ-лучами вызывает повреждение отдельных участков фа-

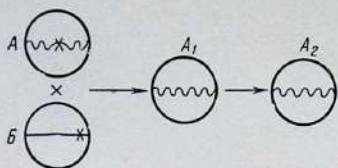


Рис. 55. Множественная реактивация.

говой нуклеиновой кислоты, а следовательно, и летальные мутации. Причем у двух или более фагов могут быть повреждены разные участки молекулы ДНК. Если такие фаги проникают в одну бактериальную клетку, то в ней может произойти обмен (рекомбинация) неповрежденными участками вирусной нуклеиновой кислоты, что

приведет к образованию способных к репродукции вирионов (рис. 55).

Множественную реактивацию вируса гриппа наблюдали при множественной инфекции куриного эмбриона вирусом, частично инактивированным УФ-лучами. Вирус был облучен в течение короткого периода времени, что, по-видимому, сопровождалось небольшим повреждением в молекуле РНК-вируса. При увеличении дозы УФ-облучения частота реактивации снижалась и наступал период, когда ее совсем не наблюдали.

Гибридизация у вирусов была получена сначала на бактериофагах, а вскоре и на вирусах гриппа (1949). К настоящему времени возможность гибридизации установлена у РНК-содержащих вирусов (ящура, гриппа, классической чумы птиц, полиомиелита, болезни Ньюкасла) и у ДНК-содержащих вирусов (вирусов оспы, осповакцины, герпеса, аденовирусов и др.).

Существует четыре способа экспериментальной гибридизации вирусов: 1) совместно культивируют двух жизнеспособных вирусов и вводят их в организм или культуру клеток одновременно или в разное время; 2) в организм или в культуру клеток вводят живой вирус и инактивированный (нагреванием или УФ-лучами); 3) совместно культивируют вирус и вирусную нуклеиновую кислоту; 4) в культуру клеток вводят различные вирусные нуклеиновые кислоты.

Первые данные по гибридизации животных вирусов были получены при совместном культивировании в мозгу мышей нейровирулентного (*NWS*) и пневмотропного (*MEL*) штаммов вируса гриппа А, которые отличались между собой, помимо нейровирулентности, антигенными и другими свойствами. Из популяции потомства скрещиваемых штаммов были селекционированы методом предельных разведений гибриды, антигенно сходные с пневмотропным штаммом, но обладавшие разной степенью нейровирулентности для мышей при заражении в мозг. В дальнейшем нейровирулентные гибриды получали при совместном культивировании этих же штаммов в курином эмбрионе.

Наиболее убедительно гибридизация у вирусов доказана при совместном культивировании инактивированного (УФ-лучами или прогреванием) и жизнеспособного вирусов гриппа. Гибриды обладали некоторыми признаками того и другого вируса. Они возникали не только при одновременном введении обоих вирусов, но и в случаях, если инактивированный был введен до живого. Так, при использовании

вируса, инактивированного УФ-лучами, рекомбинанты появлялись даже при введении инактивированного вируса за 2—3 дня до инфекционного.

При гибридизации инактивированного УФ-лучами вируса гриппа типа А, образующего бляшки на культуре куриных фибробластов, с инфекционным вирусом гриппа того же типа, не обладавшим такой способностью, были получены бляшкообразующие рекомбинанты.

Опыты гибридизации инактивированного вируса гриппа с инфекционным вирусом проводили путем совместного культивирования их в аллантоисной полости 9—10-дневных куриных эмбрионов, на кусочках хорионаллантоисной оболочки или культуре клеток куриных фибробластов. Введение инактивированного вируса, как правило, предшествовало заражению живым вирусом. Для контроля делали пассажи инфекционного вируса в отсутствие инактивированного. Через определенные интервалы времени (чаще через 18—20 часов инкубации при 36°) из эмбрионов извлекали аллантоисную жидкость, а из пробирок с аллантоисными оболочками или культурой куриных фибробластов — культуральную жидкость. У взятых отдельно из каждого эмбриона или культуры ткани проб вирусосодержащего материала (условно — популяция первого поколения) изучали антигенные свойства и ингибиторочувствительность (рис. 56, 57). Как видно из рисунков, в популяции «первого» поколения могут обнаруживаться

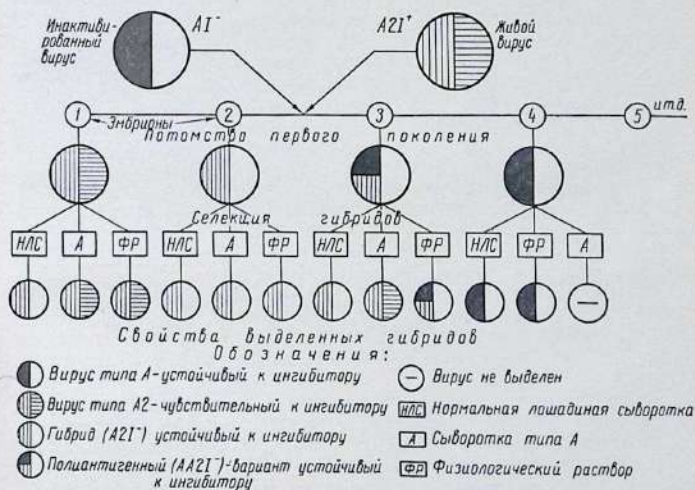


Рис. 56. Схема гибридизации вирусов на курином эмбрионе.

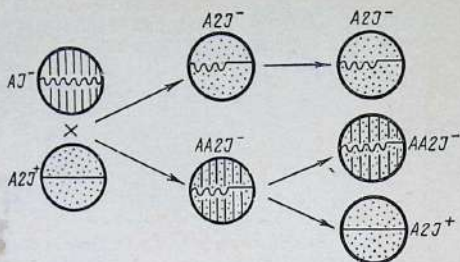


Рис. 57. Гибридизация вирусов гриппа А и А2.

исходные штаммы вируса гриппа А и А2, а также и гибриды с антигенными свойствами вируса гриппа А2 или полиантигенные варианты (АА2), резистентные к ингибиторам нормальной лошадиной сыворотки.

Для выделения вариантов, однородных по антигенным свойствам, проводили пассажи в присутствии антисыворотки того типа вируса, размножение которого необходимо было подавить. Селекцию гибридов, резистентных к сывороточным ингибиторам, осуществляли путем пассажей вируса с прогретой при 60° нормальной лошадиной сывороткой, содержащей термостабильные ингибиторы. Однородную популяцию получали многократным пассированием предельных разведений вируса. Проведенные исследования показали возможность передачи путем гибридизации ряда признаков, регулярность передачи которых была различна. Регулярно передавались ингибиторорезистентность, гемагглютинирующая, инфекционная и иммуногенная активность, а нерегулярно — терморезистентность, патогенность, элюирующая и нейраминидазная активность.

Установлена также возможность передачи ряда генетических признаков у вирусов гриппа человека как путем гибридизации вирусной РНК с инфекционным вирусом, так и путем гибридизации рибонуклеиновых кислот вирусов гриппа А и А2. Рекомбинация наблюдалась у вирусов ящура и реовирусов.

Исследования по гибридизации ДНК-вирусов впервые были проведены с вирусами оспы кролика и осповакцины. При рекомбинации мутантов кроличьей оспы, отличавшихся от родительского штамма по ряду генетических свойств, получены гибриды с признаками исходных штаммов.

Гибридизация воспроизведена с генетически различными штаммами вируса обычного герпеса. Из десяти изученных клонов шесть были сходны с одним из исходных штаммов по типу образуемых ими поражений на хорионаллантоисной оболочке и вирулентности для мышей. Один рекомбинант образовывал мелкие очаги поражений, а остальные три — крупные.

Как выяснилось, гибридизация лучше удается между близкими видами и разновидностями (например, со штаммами кроличьей оспы и дермальной осповакциной), чем между далекими видами (оспы и экстремелии), и совсем не удавалось получить гибриды при скрещивании оспенных вирусов с вирусами других групп — герпеса, гриппа, полиомиелита и др.

Гетерозиготность. При множественной инфекции клетки двумя разновидностями вируса наряду с гибридизацией может наблюдаться явление гетерозиготности, то есть нестойкое объединение в геноме одного вириона генетической информации обоих вирусов. Гетерозиготные вирионы способны давать потомство с признаками обоих вирусов, но в отличие от истинных (стабильных) гибридов они при дальнейшем пассировании (как правило, в первом пассаже) расщепляются на исходные штаммы (рис. 58). Впервые явление гетерозиготности отметили при заражении *E. coli* мутантными формами фага T2. При изучении негативных колоний появлялись фаги со свойствами двух родительских штаммов.

Явление гетерозиготности у зоопатогенных вирусов наблюдалось при одновременной инокуляции куриных эмбрионов двумя штаммами вируса гриппа типа А. Около 80% вирусных частиц обладали усложненной антигенной структурой, то есть нейтрализовались сыворотками против обоих штаммов. При дальнейшем пассировании полиантитенных культур среди потомства выделяли как исходные формы, так и культуры, нейтрализующиеся обеими сыворотками. Однако и они при последующих пассажах предельных разведений распадались на исходные штаммы. В ряде опытов частота появления гетерозиготных культур при совместном культивировании указанных штаммов достигала 50% инфицированных эмбрионов.

При смешанной инфекции различными штаммами вируса болезни Ньюкасла гетерозиготность наблюдали в 10% случаев. Данное явление отмечено также у вируса полиомиелита при совместном культивировании I и II типов. Комбинированные штаммы сохранялись на протяжении нескольких пассажей предельных разведений культуры вируса. Но наряду с ними около $\frac{1}{3}$ потомства каждого пассажа обладало свойствами, характерными для одного из исходных штаммов.

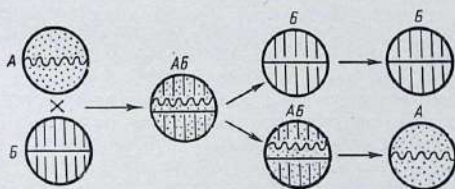


Рис. 58. Явление гетерозиготности у вирусов.

Механизм возникновения гетерозиготных штаммов подробно изучали на бактериофагах. Было показано, что нагревание ДНК при температуре, близкой к 100°, двойная ее спираль диссоциирует на две цепочки, которые при последующем медленном охлаждении могут вновь соединиться. Оказалось, что если в растворе присутствуют молекулы двух разных типов ДНК, может произойти взаимообмен цепочками нуклеиновых кислот и образование смешанных молекул ДНК со свойствами, характерными для каждого из исходных вирусов.

Имеются данные о том, что в популяции фагов около 2% потомства состоит из гетерозиготных форм, которые при дальнейшем размножении расщепляются на два генотипа. Существует предположение, что гетерозиготная область может представлять «место спайки», где одна одинарная цепочка нуклеиновой кислоты одного штамма спаривается с цепочкой другого штамма. Возможно, что механизм образования гетерозиготных форм у ДНК-содержащих вирусов аналогичен механизму образования гетерозиготных фагов. Возникновение гетерозиготных форм у вирусов, содержащих одноцепочечную РНК, пока остается не ясным.

Т р а н с к а п с и д а ц и я — стабильное объединение геномов двух вирусов, заключенных в капсид одного из них. Это явление пока наблюдалось при совместном культивировании аденовирусов и вируса обезьян ОВ-40. Неспособность аденовирусов человека самостоятельно размножаться в почках обезьян объясняется незавершенностью последней стадии их репродукции. Дело в том, что в клетках обезьян аденовирус вызывает синтез п-РНК, вирусспецифической ДНК и вирусспецифического опухолевого антигена, но не способен индуцировать синтез вирусных белков, из которых построен капсид аденовируса. В силу этого дефекта полноценный инфекционный аденовирус не формируется. При культивировании обоих вирусов, дефектных по репродукции в клетках обезьян, появляются вирионы с антигенными свойствами аденовируса и вызывающие образование опухолей, в которых обнаруживались как антигены аденовируса А7, так и ОВ-40. Пассажи таких гибридных культур в присутствии антисыворотки к вирусу ОВ-40 не устраняет это свойство вируса. Далее, если такие гибридные вирионы, как, например, аденовирус А7 — ОВ-40 (*PaRa-7*), культивировать с деновирусом типа 2, то в этом случае в клетках обезьян образуются гибриды с капсидом аденовируса типа 2 и с генетической информацией вируса ОВ-40. Такие гибриды представляют собой аденовирус, под капсидом которого содержится геном вируса ОВ-40, сцепленный с геном аденовируса (рис. 59), что свидетельствует о генетическом взаимодействии разных видов вирусов.

На основании этих данных можно допустить образование гибридов из двух генетических неродственных ДНК-содержащих вирусов. Такой тип межвидовой гибридизации имеет свои особенности, которые сближают ее с явлением гетерозиготности.

Механизмы рекомбинации вирусов еще мало выяснены. В настоящее время можно делать лишь предположения о механизме интеграции

генетического материала одного вируса в геном другого. Существует две гипотезы. Согласно одной из них определенные участки нуклеиновой кислоты одного штамма интегрируют в геном другого штамма сразу после высвобождения молекулы нуклеиновой кислоты из вириона. Процессу интеграции должны предшествовать разрывы в цепочках молекул нуклеиновой кислоты, возникающие, вероятно, под действием нуклеаз, содержание которых в клетке увеличивается при вирусной инфекции. В местах разрыва включаются фрагменты нуклеиновой кислоты другого штамма вируса и с помощью репарирующих

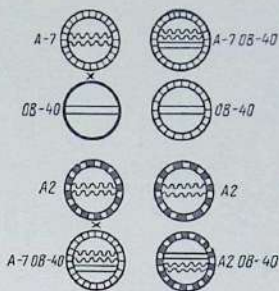


Рис. 59. Явление транскэпидации.

(восстанавливающие) ферментов происходит «сшивка», воссоединение новых фрагментов нуклеиновой кислоты. Таким образом, восстанавливается непрерывность полинуклеотидной цепи рекомбинированной молекулы нуклеиновой кислоты. Затем рекомбинированные молекулы реплицируются и на их основе формируются рекомбинанты. Кроме того, можно предположить, что включение соответствующих участков нуклеиновой кислоты одного штамма в молекулу нуклеиновой кислоты другого штамма происходит после или во время их репликации. При этом также необходимо участие ферментов, вызывающих разрывы и воссоединение молекул нуклеиновой кислоты.

Рекомбинация в обоих случаях будет происходить по типу кроссинговера между гомологичными участками молекул нуклеиновой кислоты рекомбинирующихся вирусов. Этот механизм наиболее приемлем для рекомбинации с низкой частотой, при обмене ограниченным числом маркеров, как это, например, наблюдалось у вирусов полиомиелита и др.

При рекомбинации с высокой частотой (у вируса гриппа) нуклеиновая кислота включается в геном рекомбинанта, по-видимому, несколько иным путем. Геном вируса гриппа состоит из нескольких (5—6) фрагментов или молекул нуклеиновой кислоты, которые в силу этого могут сравнительно легко взаимно обмениваться и включаться во вновь образующиеся вирионы. Однако происходит ли в данном случае обмен целыми молекулами нуклеиновой кислоты или же в молекулу нуклеиновой кислоты рекомбинанта включается только какой-то участок донорского штамма — остается не ясным.

Все три возможных способа включения генетического материала одного штамма в другой принципиально сходны и в их основе лежит механизм разрыва — воссоединения, в результате которого геном рекомбинанта состоит из фрагментов молекул обоих скрещиваемых штаммов.

Согласно другой гипотезе, рекомбинация осуществляется на основе механизма выборочного копирования. Передача информации от одного

штамма другому (рекомбинанту) происходит в процессе репликации их нуклеиновых кислот путем копирования информации с нуклеиновой кислоты, сначала одного штамма, а затем другого. После того как какая-то часть генетической информации одного родительского штамма будет скопирована на вновь синтезируемую молекулу нуклеиновой кислоты, процесс репликации ее переключается на родительскую молекулу другого штамма. В результате такого попеременного копирования генетической информации образуется рекомбинантный геном. Эта гипотеза была ранее наиболее принятой. Однако экспериментальные данные последних лет дают основания считать, что гипотеза разрыва — воссоединения является в настоящее время более обоснованной.

Методы получения живых противовирусных вакцин

Первые открытия в области живых вакцин были сделаны Дженнером и Пастером. Дженнер (1796) установил возможность создания искусственной невосприимчивости к натуральной оспе после прививки человеку живого вируса осповакцины, а Пастер создал живые вакцины против куриной холеры (1880), сибирской язвы (1883), рожи свиней (1883) и бешенства (1881—1886).

После ряда неудач по конструированию живых вакцин против холеры (Хавкин, 1890—1896) и чумы (Иерсен, 1897; Колле и Отто 1903) в 30—40-х годах текущего столетия вновь возрос интерес к получению живых вакцин против бактериальных (чума, сибирская язва, туберкулез, туляремия, бруцеллез) и вирусных (желтая лихорадка, полиомиелит) инфекций. Созданы высокоэффективные вакцины против желтой лихорадки, истинной чумы птиц, чумы рогатого скота, ящура, чумы свиней, гриппа, Ньюкаслской болезни, полиомиелита, кори и других вирусных инфекций.

В настоящее время ведутся исследования по получению живых вакцин против энцифалических энцефалитов, аденовирусных и парарипиозных инфекций.

Живые противовирусные вакцины по напряженности вызываемого ими иммунитета можно разделить на две группы: 1) вакцины, вызывающие напряженный и стойкий иммунитет (против оспы, ящура, чумы птиц, желтой лихорадки, полиомиелита, кори и паротита); 2) вакцины, вызывающие практически значимый, но относительно нестойкий иммунитет (против гриппа и мозочной лихорадки). Такие различия зависят прежде всего от свойств возбудителя болезни, патогенеза вызываемого им заболевания и от генетических свойств вакцинного штамма (длительности приживаемости вируса в организме; степени чужеродности вирусных белков, определяющих иммунизаторную активность вируса; реактогенности вакцины).

Способность вируса к внедрению, размножению и иммуногенному действию обеспечивается различными его свойствами и соответствующими этим свойствам структурными компонентами (белками, муко-липополисахаридами и нуклеиновыми кислотами). Ослабление вирулентности связано с изменением ряда генетических признаков вируса, определяющих эту функцию вируса. Поэтому одно из основных условий получения живых вакцин — это рациональный подбор факторов воздействия, вызывающих стабильное ослабление вирулентности, с сохранением иммуногенности.

Основной показатель иммуногенности вакцины — это длительность приживаемости вакцинного вируса в организме. Высокоэффективные вакцины, как правило, длительно приживаются в восприимчивом организме (в течение 2—4 и более недель). Вакцины, вызывающие недостаточно напряженный иммунитет, приживаются только на короткий срок (в течение 2—4 дней).

Решающий фактор в иммуногенности вакцин — их специфичность и чужеродность белков. Специфичность определяет направленность действия защитных механизмов, индуцируемых вирусом, а чужеродность — степень проявления иммунизаторного раздражения и прежде всего активность выработки специфических гамма-глобулинов. Чем меньше выражена чужеродность, тем слабее иммунитет, и наоборот.

Возможность повысить степень чужеродности вакцин в настоящее время значительно расширилась, особенно в связи с открытием трансформирующего действия нуклеиновых кислот.

Все известные в настоящее время методы получения живых вакцин делят на две группы. Вакцины первой группы получены из вирусов, генетически близких к возбудителю данного заболевания. Сюда относят осповакцину, представляющую собой малоизмененный возбудитель заболевания оспы коров, у которого имеется общий антиген с возбудителем заболевания оспы человека.

Вакцины второй группы созданы путем селекции и экспериментального изменения вирулентности вируса. Наиболее широкое применение получила селекция мутантов, возникающих в процессе пассажей вирулентного вируса на животных, куриных эмбрионах и культуре клеток. Этим методом получена большая часть вакцинных штаммов (против бешенства, желтой лихорадки, полиомиелита, гриппа, кори, паротита и др.).

К этому методу примыкает отбор авирулентных вариантов, возникающих в результате спонтанных мутаций в естественных условиях обитания возбудителя заболевания.

К перспективным методам следует отнести селекцию мутантов, индуцированных физическими и химическими мутагенами. Мутагенами воздействуют как на внутриклеточный, репродуцирующийся вирус, так и на внеклеточный, покоящийся вирус. Наиболее эффективной оказалась пониженная температура культивирования вируса на культуре клеток или курином эмбрионе. При этом способе сочетается индуцированный мутагенез с направленной селекцией. Перспективным является применение химических мутагенов с целью воздействия ими как на репродуцирующийся вирус, так и на его нуклеиновую кислоту. В ряде случаев используют комбинированные методы: воздействие мутагенным фактором (например, температурой или УФ-лучами) с последующими пассажами на культуре клеток или курином эмбрионе.

Широкое использование современных достижений молекулярной биологии открывает новые возможности изменения наследственности вирусов и, в частности, путем воздействия на вирус химическими и физическими факторами. Однако метод пассажей вируса в измененных условиях культивирования с селекцией стабильных клонов пока остается основным способом получения живых вакцин.

Глава 12. ПРИРОДА, ЭВОЛЮЦИЯ И КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ

Природа вирусов. Вопрос о природе вирусов возник сразу после открытия вируса табачной мозаики. Д. И. Ивановский первый вступил в дискуссию со сторонниками неживой природы вирусов, а также против гипотезы эндогенного их происхождения, то есть возникновения вирусов в цитоплазме клетки под влиянием неблагоприятных факторов, вызывающих изменение обмена веществ в растении. Он привел убедительные аргументы, отвергающие неживую природу вируса табачной мозаики. С тех пор прошло около 80 лет. Учение о вирусах за этот период далеко продвинулось вперед, о вирусах теперь известно неизмеримо больше, чем это было на заре зарождения вирусологии. Вирусы теперь видимы, их фракционируют на составные компоненты и воссоединяют заново. Больше того, найдены способы, позволяющие изменять структуру нуклеиновых кислот вирусов, синтезировать вирусные белки и нуклеиновые кислоты в бесклеточной системе; получена биосинтетическим путем в искусственной среде простейшая форма жизни — бактериофаг; показана возможность получения «живого» вирусного гена и т. д. И, несмотря на эти крупные достижения, проблема природы вирусов осталась еще не в полной мере разрешенной. Вопросы, которые стояли перед первыми исследователями вирусов — представляют ли они существа или биологически активные вещества с признаками существа; живые они или неживые, экзогенные или они эндогенные по происхождению — стоят и в настоящее время.

Какие же были получены новые данные после Д. И. Ивановского в пользу взгляда на вирусы как на вещества? Одним из существенных доводов является кристаллизуемость некоторых вирусов. Ряд вирусов получены в кристаллическом состоянии (ВТМ, полиомиелита и др.). Кристаллы вирусов обнаружены также и внутри инфицирован-

ных клеток. Однако вирусы кристаллизуются только в зрелом, покоящемся состоянии, то есть когда они прекратили активную деятельность в клетках. Вирусы, находящиеся в процессе активной репродукции, кристаллов не образуют. Поэтому кристаллизация не имеет решающего значения для отнесения вирусов к веществам.

В чем же причина затянувшейся дискуссии о природе вирусов? Быть может прав Гете, который писал: «Принято думать, что между крайними точками зрения лежит истина. Никким образом — между ними лежит проблема». Одним из путей к единству взглядов на природу вирусов лежит в расширении привычных представлений о живом, то есть признание, что существуют простейшие самовоспроизводящиеся (репродуцирующиеся) неклеточные формы жизни, лежащие на молекулярном уровне, тогда возражения против живой природы вирусов отпадут. Далее, если учесть, что самые мелкие вирусы значительно крупнее молекул нуклеопротеидов, а по структуре они гораздо сложнее, чем полимеры неживой природы, становится ясным, что вирусы по строению и функциям ближе стоят к существам, чем к химическим веществам.

Современные данные о структуре и функции вирусов больше согласуются с предположением, что вирусы это своеобразная и далеко неоднородная группа существ, обладающих рядом кардинальных свойств живого. К таким признакам относятся способность их к самовоспроизведению себе подобных (то есть к размножению), внутриклеточный паразитизм, инфекционность и трансмиссивность, изменчивость, приспособляемость к условиям существования. Вирусы — это простейшая неклеточная форма жизни, содержащая один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), обладающая уникальным (дизъюнктивным) способом размножения и своеобразным обменом веществ, отличным от обмена веществ клеток и организмов. Они занимают особое самостоятельное положение в биосфере, находясь на границе живой и неживой природы.

Происхождение и эволюция вирусов. О происхождении вирусов существуют разные гипотезы. Одни ученые считают вирусы потомками древних доклеточных форм жизни на земле, сохранившихся до нашего времени благодаря тому, что они перешли к паразитическому образу жизни. Иными словами, вирусы ведут свое начало от самовоспроизводящихся примитивных неклеточных форм жизни (рибонуклеопротеидов), появившихся на земле в незапамятные времена. По мере эволюции органического мира и усложнения организации живых существ эти последние, будучи более совершенными организмами, вытеснили в борьбе за существование более древние и примитивные формы жизни. Правда, некоторые из них приспособились к внутриклеточному паразитическому образу жизни. Они-то и могли оказаться предками вирусов. Постепенно их организация усложнилась, но она не обеспечивала самостоятельного существования. Многие жизненные функции, и прежде всего обмен веществ, находились в полной зависимости от организма-хозяина. По мере усиления связей между живыми существами возможности перехода вирусов из одного вида организма в другой возрастали и поэтому более интенсивным стал обмен вирусами, поражающими разные виды живых существ.

С появлением человека возникли новые дополнительные возможности эволюции вирусов. Прирученные человеком животные могли принести с собой в человеческое общество и паразитировавшие в них вирусы, которые могли в процессе изменчивости и отбора приспособиться к организму человека и стать, таким образом, возбудителями болезней. Вероятно, этим путем возникла оспа, ведущая свое происхождение от сходного заболевания — оспы коров. Контакт человека с больными коровами привел его к заражению коровьей оспой, которая в дальнейшем могла стать самостоятельной болезнью, распространяясь уже среди людей. Эта гипотеза подтверждается тем, что у человека и животных обнаружены сходные виды вирусов. Например, наряду с вирусом оспы человека имеется целая группа оспенных вирусов, поражающих млекопитающих и птиц.

Согласно другой гипотезе вирусы являются потомками свободно живущих клеток — бактерий, приспособившихся к паразитическому образу жизни и постепенно утратившими сложную организацию. Их предки утратили способность синтезировать ферменты, необходимые для роста и размножения вне клетки, и в процессе регрессивной эволюции превратились в облигатных внутриклеточных паразитов. В процессе эволюции один из них могли утратить ДНК или РНК, а также некоторые или все ферменты. Изменения химического строения неизбежно должны были повлечь изме-

нения в характере обмена веществ, в механизме их размножения, то есть к переходу от бинарного деления к раздельному или дизъюнктивному способу размножения. При этом способе синтез нуклеиновой кислоты и белков вируса разобщен. Происходит он в разных частях клетки (ядре и цитоплазме), а сборка компонентов вируса в зрелую (инфекционную) форму происходит в другом месте — на внутренней стороне цитоплазматической мембраны.

Эта гипотеза наиболее приемлема для происхождения таких крупных вирусов как оспа и герпес, но трудно допустить, чтобы такой регресс был общим для всех, особенно мелких, вирусов. Следует учитывать также, что паразитизм не означает регрессивное развитие от более высокоорганизованного класса живых существ к низшему. Паразитизм не выводит вид за пределы своего класса. По этим соображениям мало вероятно предположение об эволюции клеточных форм жизни (бактерий) в неклеточные формы — вирусы.

Существует гипотеза, что вирусы происходят из компонентов клеток, которые обособились и стали вести полусамостоятельное паразитическое существование. Эта гипотеза наиболее спорна. В доказательство приводятся данные по возникновению вирусов в организме под влиянием неблагоприятных факторов внешней среды. При этом ссылаются, например, на тот факт, что после вскармливания гусениц тутового шелкопряда пищей, к которой был добавлен гидроксиламины или азотистая кислота, из их организма выделяли вирус желтухи без занесения его извне. Возникновение вируса стимулируется, если гусениц предварительно подвергнуть охлаждению или перегреванию. Предполагается, что неблагоприятные факторы ведут к преобразованию нормальных клеточных нуклеопротеидов в вирусные нуклеопротеиды. Однако возникновение вируса в таких случаях можно объяснить активацией латентного вируса, передававшегося с гусеницей потомству. Наблюдений об активации латентной вирусной инфекции существует много. Поэтому с большей осторожностью нужно отнестись к сообщениям о «самозарождении» вирусов. Сторонники этой гипотезы полагают, что все вирусы имеют единое происхождение, то есть все они зарождаются заново из компонентов нормальной клетки и представляют собой трансмиссивные патогенные нуклеопротеиды.

Классификация вирусов. Потребность в систематике вирусов возникла сразу после открытия основных возбудителей вирусных болезней растений и позвоночных. Необходимость в этом диктовалась как задачами научных исследований, так и практикой специфической диагностики, лечения и профилактики вирусных заболеваний.

При разработке первых классификаций в основу их были положены различные принципы.

1. По виду поражаемых организмов вирусы были разделены на четыре группы — вирусы растений, животных, бактерий и насекомых. 2. По тропизму вирусов к определенным тканям они группировались на нейротропные, пневмотропные, дерматропные и пантотропные вирусы. 3. По механизму передачи инфекции их делили на пять основных групп: а) возбудители инфекций с кишечным механизмом передачи — кишечные вирусы; б) возбудители инфекций с воздушно-капельным механизмом передачи — респираторные вирусы; в) возбудители трансмиссивных инфекций — арбовирусы; г) возбудители инфекций наружных покровов — дерматропные вирусы; д) возбудители инфекций с различными механизмами передачи. Кроме того, существует еще клинико-этиологическая группировка вирусных заболеваний. В соответствии с этим принципом различают следующие вирусные заболевания: а) респираторные инфекции; б) энтеровирусные инфекции; в) заболевания, вызванные дермо- и нейротропными вирусами; г) заболевания, вызванные висцеротропными вирусами.

Несмотря на несовершенство перечисленных классификаций и схем систематики, они сыграли определенную положительную роль в изучении вирусов и вирусных болезней и до сих пор еще не утратили практического значения. Однако ценность их для естественной классификации невелика.

Крупные успехи в изучении морфологии, структуры, химического состава, механизма репродукции и молекулярных основ генетики вирусов явились основой для разработки современной естественной классификации вирусов.

В основу одной из первых современных классификаций (Львов с соавторами, 1962) положены следующие критерии: 1) тип нуклеиновой кислоты; 2) тип симметрии; 3) диаметр капсиды или число капсомеров; 4) наличие внешней оболочки. В соответствии с этими критериями вирусы по типу нуклеиновой кислоты распределили на две

группы: на ДНК-вирусы и РНК-вирусы, а по типу симметрии капсиды — на спиралеобразные (винтовые), кубические и комплексные (смешанные). По наличию или отсутствию внешней оболочки вирусы могут быть оболочечные и нуклеокапсидные (безоболочечные). Последние, имеющие кубическую симметрию, делят по числу капсомеров, а обладающие винтовой симметрией — по диаметру капсиды.

В настоящее время при классификации вирусов следует учитывать следующие структурно-химические свойства их: 1) тип нуклеиновой кислоты; 2) размер вируса; 3) диаметр капсиды или число капсомеров; 4) место репродукции вируса — в ядре или цитоплазме; 5) наличие внешней оболочки; 6) место формирования вириона — на поверхности клетки или в цитоплазме; 7) чувствительность к эфиру. На основе этих критериев на VIII Международном конгрессе микробиологов (1962) вирусы позвоночных было рекомендовано распределить на следующие восемь групп: Poxviruses, Herpesviruses, Adenoviruses, Mxoviruses, Arboviruses, Picornaviruses, Reoviruses, Papovaviruses.

Таблица 9

Классификация зоопатогенных вирусов

Вирусы	Нуклеиновая кислота	Величина вириона (в мкм)	Число капсомеров	Оболочка	Место репродукции вируса	Место созревания вируса	Чувствительность к эфиру
Поксвирусы	ДНК	200—300	?	+	Цитоплазма	Внутри клетки	— или +
Герпесвирусы	>	100—200	162	+	Ядро	То же	+
Аденовирусы	>	80	252	—	>	>	—
Паповавирусы	>	30—50	42	—	>	>	—
Миксовирусы	РНК	80—150	2000	+	Ядро и цитоплазма	На оболочке	+
Арбовирусы	>	20—100	?	+	То же	То же	+
Пикорнавирусы	>	20—30	60—92	—	Цитоплазма	Внутри клетки	—
Реовирусы	>	70—80	92	—	>	То же	—

Обозначения: + обладает этим свойством; — не обладает этим свойством.

В таблице 9 отражены главные свойства каждой группы вирусов, положенных в основу их классификации. Однако не все известные в настоящее время вирусы можно отнести к той или иной группе. Значительное число их (вирусы инфекционного гепатита, инфекционной анемии лошадей, африканской чумы лошадей, болезни синего языка, вирус скрепи) еще недостаточно изучены, а ряд вирусов (везикулярного стоматита, краснухи, лейкоза кур и др.) пока условно отнесены к миксовирусам. По мере накопления сведений об этих вирусах, а также углубления знаний о биологии и экологии вирусов позвоночных в классификацию их будут вноситься уточнения и изменения. Прогресс в области классификации вирусов в значительной мере зависит также от установления родственных связей между видами вирусов и, в частности, между вирусами животных и человека. Сравнительно недавно обнаружено близкое родство между вирусами кори и чумы собак и рогатого скота; между вирусом болезни Ньюкасла и вирусом паротита, вирусом обычного герпеса и вирусом псевдобешенства крупного рогатого скота, между вирусом ящура и вирусами коксаки.

В конце 1970 года международный Комитет по номенклатуре вирусов предложил все вирусы разбить на 42 группы (роды), из которых 18 родов составляют вирусы позвоночных (табл. 10).

Номенклатура вирусов позвоночных

№ пп.	Род	Типовой вид	Другие члены
		<i>Двунитчатые ДНК-вирусы</i>	
1	Poxvirus	Poxvirus b-1 (вирус вакцины)	Оспенные вирусы животных, вирусы миксоматоза
2	Herpesvirus —	Herpesvirus h-7 (вирус герпеса человека)	Вирусы герпеса человека, обезьян и других животных
3	Adenovirus	Adenovirus h-1	Аденовирусы человека и животных
4	Papillomavirus	Papilloma virus S (вирус кроличьей папилломы)	Вирусы папиллом человека и животных
5	Polyomavirus	Polyomavirus m (вирус полномы мышей)	Вирус SV ₄₀ , кроличий вакуолизирующий вирус и др.
6	Parvovirus	Однунитчатые ДНК-вирусы Parvovirus r-1 (вирус килхама)	Парвовирусы свиней, птиц, вирус пневмонии кошек и др.
		<i>Двунитчатые РНК-вирусы</i>	
7	Reovirus	Reovirus h-7 (реовирус человека первого типа)	Реовирусы млекопитающих, некоторые арбовирусы
		<i>Однунитчатые РНК-вирусы</i>	
8	Leukovirus	Leukovirus a-1 (вирус саркомы Рауса)	Вирусы птичьих сарком, лейкозов мышей, вирус молочных желез мышей.
9	Paramyxovirus	Paramyxovirus a-1 (вирус Ньюкаслской болезни)	Вирус парагриппа, паротита, возможно кори
10	Orthomyxovirus	Orthomyxovirus h-1 (вирус гриппа АО)	Вирусы гриппа человека, животных, птиц
11	Rhabdovirus	Rhabdovirus b-1 (вирус везикулярного стоматита)	Некоторые арбовирусы, вирус бешенства, вирус дрозофилы
12	Alfavirus	Alfavirus Sindbis	Не определены
13	Calicivirus	Calicivirus s-1	Арбовирусы группы А
14	Rhinovirus	Rhinovirus h-A1	Риновирусы человека, лошадей, коров
15	Enterovirus	Enterovirus h-polio 1 (вирус полиомиелита первого типа)	Полиовирусы, коксаки, ЕСНО, энцефаломиелита и энцефаломиокардита мышей и др.
16	Flavovirus	Flavovirus febricis (вирус желтой лихорадки)	Арбовирусы группы В
17	Coronavirus	Coronavirus a-1 (вирус инфекционного бронхита птиц)	Вирус герпеса мышей, респираторный вирус человека
18	Arinovirus	Arinovirus m-1 (вирус лимфоцитарного хориоменингита мышей)	Арбовирусы Такарибе

Противовирусный иммунитет определяется совокупностью видовых (наследственных) и приобретенных в процессе развития организма свойств, препятствующих проникновению и репродукции вирусов в клетках. Эти защитные специфические и неспецифические приспособления, или факторы иммунитета, разнообразны по своей природе и механизму действия. К специфическим факторам иммунитета относят антитела (гуморальные и клеточные), а к неспецифическим — видовую резистентность клеток, интерферон, неспецифические ингибиторы, температуру тела организма, гормоны и другие факторы физиологической активности организма. Роль каждого из этих факторов резистентности зависит от вида и биологических свойств вируса, патогенеза инфекции, взаимоотношений вируса с клеткой и с организмом в целом.

Специфические факторы иммунитета

Роль антител в иммунитете к вирусам установлена в экспериментах на пассивно и активно иммунизированных животных, где была показана прямая зависимость восприимчивости их от концентрации антител в крови. Формирование иммунитета совпадало по времени с появлением антител, а степень напряженности его возрастала по мере повышения уровня их.

Защитная роль антител при вирусных инфекциях видна также из эпидемиологических наблюдений, свидетельствующих о том, что лица с низким титром антител болеют чаще, чем с высокими. При большинстве инфекционных заболеваний уровень антител в крови служит одним из основных показателей невосприимчивости к инфекции.

Зависимость между титром антител и восприимчивостью к инфекции установлена и в наблюдениях за эффективностью вакцинации. Увеличение уровня антител после вакцинации — надежный критерий эффективности проведенных прививок.

Наблюдаемое иногда несоответствие между уровнем антител и невосприимчивостью не может служить основанием для отрицания их роли в иммунитете. Эти факты свидетельствуют лишь о том, что антитела проявляют свое действие в сложной внутренней среде организма не изолированно, а во взаимодействии с другими защитными факторами (клеточный иммунитет, интерферон, ингибиторы и др.).

О роли антител при нейровирусных инфекциях получены противоречивые данные. Зависит это от разных способов введения вируса при проверке резистентности, а также от того, что при нейровирусных инфекциях имеют значение антитела не только в сыворотке, но и в центральной нервной системе. Содержание антител в сыворотке, при отсутствии их в центральной нервной системе, не может предупредить развитие инфекции при заражении непосредственно в мозг нейротропным вирусом. Но эти же антитела будут играть защитную роль при подкожном введении вируса. Невосприимчивость к интра-

церебральному заражению кроликов вирусом энцефаломиелиита лошадей выявляется лишь в том случае, если антитела содержатся в спинномозговой жидкости. Причем там они появляются уже при высоких уровнях концентрации их в крови. Защитная роль антител проявляется при достаточной концентрации их в тканях, чувствительных к вирусу, а также если они находятся в воротах инфекции и на путях продвижения вируса к восприимчивым клеткам. О защитной роли антител нельзя говорить, если вирус будет введен непосредственно в чувствительную ткань, где антител нет или концентрация их недостаточна. Для висцеротропных вирусов, размножающихся во многих тканях, роль антител в невосприимчивости выражена более отчетливо по сравнению с нейротропными вирусами.

Вирусы вызывают образование вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител, антигемагглютининов и преципитинов. Антитела к вирусам содержатся в глобулинах сыворотки, с наибольшей концентрацией их в гамма-глобулинах. Противовирусные антитела образуются в тех же клетках, что и антитела к бактериям. Механизм образования их, по-видимому, один и тот же. Антитела к некоторым вирусам начинают образовываться очень рано (на 2—3-и сутки после заражения животного).

Механизм действия антител на вирусы. Н. Ф. Гамалея (1939) считал, что защитная роль антител состоит не в их нейтрализующем действии, а в том, что они блокируют чувствительную к вирусу клетку, из-за чего она становится недоступной для проникновения вируса. К такому же выводу в свое время пришел Sabin. Он показал, что в культуре клеток, среда которых содержит иммунную сыворотку, вирус фиксируется клетками почти в такой же степени, что и при использовании среды с нормальной сывороткой, но вирус при этом не размножается. Кроме того, он наблюдал фиксацию антител нормальными клетками прямыми опытами истощения антител после смешивания сыворотки с тканью. Был сделан вывод, что антитела соединяются не с вирусом, а с клетками.

В настоящее время установлено, что действие противовирусных антител направлено непосредственно на вирус или его отдельные компоненты (V- и S-антигены), а не на клетки. В основе взаимодействия антител с вирусом лежит физико-химический процесс, то есть процесс специфической адсорбции. Применение меченных флуоресцирующими красителями антител явилось одним из доказательств адсорбции антител на поверхности вируса. Очевидно, молекулы антител, соединяясь с рецепторами оболочки вируса, каким-то образом изменяют их физико-химические свойства, в силу чего вирус утрачивает способность соединяться с рецепторами оболочки клетки.

Установлено, что соединение вирусов с антителами не является непосредственной причиной их инактивации. Это доказывается реактивацией жизнеспособного вируса из нейтральной смеси с сывороткой путем разведения физиологическим раствором, электрофорезом или отмывания на суперцентрифуге. В свете этих данных яснее можно представить себе и механизм действия антител на вирусы в организме

пассивно или активно иммунизированных животных. Так, после введения умеренных доз вируса гриппа в организм иммунных мышей в их органах вирус не обнаруживается. Если предварительно удалить антитела промыванием организма раствором Рингера через большой круг кровообращения или отмыванием обследуемых органов и тканей на коллоидных (фильтрующих) пластинках, то вирус обнаруживается в большем количестве. Это говорит о том, что вирусы, которые не выявляются с помощью обычной методики, блокированы антителами. Возможность реактивации вируса из смеси с антисывороткой была показана в опытах и с другими вирусами — оспы, экстремелии, полиомиелита, герпеса.

Приведенные выше данные указывают лишь на действие антител вне клетки. О взаимодействии их с вирусом внутри клетки не существует единого мнения. До самого последнего времени считали, что антитела не влияют на репродукцию вируса в клетке. Однако существует взгляд, что введение зараженных вирусом клеток в иммунный организм предотвращает образование вирусных включений в клетках, которые, как теперь известно, являются скоплениями вируса. Этот вывод получил подтверждение и в опытах пассивной иммунизации.

Неспецифические факторы иммунитета

К неспецифическим факторам резистентности организма к вирусам относят видовую (естественную) резистентность клеток, интерферон, неспецифические ингибиторы, фагоцитоз, температуру тела и другие физиологические функции организма.

Видовая резистентность клеток. Жизнедеятельность вирусов находится в теснейшей зависимости от функции клетки. В процессе репродукции они используют ферментные и энергетические ресурсы клетки, необходимые для синтеза их компонентов. Резистентность клеток к вирусам отмечают в том случае, если исключена возможность проникновения вирусов в клетку или же осуществление одной из стадий в их репродукции. Чувствительность (восприимчивость) клеток к вирусам зависит от наличия на их оболочке специфических рецепторов, где адсорбируется вирус, а также от способности клеток депротенинировать вирус, то есть освобождать из вириона нуклеиновую кислоту, без участия которой не могут синтезироваться ранние белки (полимеразы), вирусная нуклеиновая кислота и структурные вирусные белки.

В условиях эксперимента естественную клеточную резистентность преодолевали введением в невосприимчивую клетку инфекционной вирусной нуклеиновой кислоты. Однако в этих искусственных условиях совершается лишь один цикл репродукции вируса и вновь сформировавшиеся вирионы неспособны к дальнейшей репродукции в невосприимчивых клетках.

Возрастная восприимчивость. Эмбрионы, новорожденные и молодые животные более восприимчивы к вирусам, чем взрослые. С созреванием организма восприимчивость его к вирусам падает. Например,

к вирусам коксаки А восприимчивы мышцы первых двух суток после рождения, 4—5-дневные мышцы к этим вирусам уже не восприимчивы. Куриные эмбрионы более восприимчивы ко многим вирусам, чем цыпята. Последние, например, совсем невосприимчивы к вирусу гриппа.

В основе различной восприимчивости молодых и взрослых животных лежит ряд причин, из которых наибольшее значение имеют особенности обмена веществ и прежде всего интенсивность образования веществ, подавляющих репродукцию вируса (интерферон), или, наоборот, стимулирующие их размножение (стимулон). Существенная роль в этом принадлежит гормонам: кастрация снижает резистентность, а введение гонадотропных гормонов повышает ее. Однако от кортизона и адренкортикотропного гормона резистентность животных к некоторым вирусам (полиомелит, грипп, арбовирусы) падает в результате снижения продукции антител.

Интерферон. О существовании иммунитета клеток к вирусам известно давно. Но только в последнее десятилетие были получены данные о материальном субстрате клеточного иммунитета, получившего название интерферона. Он был обнаружен при изучении явления интерференции вирусов (*interfere* — препятствовать, мешать), то есть при торможении или полном подавлении репродукции одного вируса другим. Интерферирующее действие вируса проявляется также в предотвращении цитопатического действия вируса на клетку и развития инфекционного процесса.

По поводу механизма интерферирующего действия вирусов существовало несколько гипотез. Предполагалось, например, что это явление вызывается конкуренцией вирусов за клеточные рецепторы, путем блокирования их конкурирующим вирусом или конкуренцией их за белки и другие компоненты клетки, истощение которых будет ограничивать возможности репродукции другого вируса. Однако, как выяснилось позднее, все ранние предположения оказались несостоятельными. В последние годы были выяснены механизмы образования и действия интерферона на вирусы.

Образование интерферона. Впервые (1957) интерферон обнаружили в экстрактах из хорионаллантоисных оболочек куриного эмбриона, зараженного вирусом гриппа. Затем было установлено, что он образуется в организме и в культуре клеток как при взаимодействии с живым вирусом, так и с вирусом, инактивированным нагреванием или УФ-лучами. Кроме того, интерферон продуцируется и при введении в организм или в культуру клеток чужеродной нуклеиновой кислоты, риккетсий, бактерий и их эндотоксинов, микоплазм, полисахаридов и липополисахаридов бактериального происхождения (статолон, протидиозан, пирогенала и др.).

Индукторы интерферона можно разделить на три группы: 1) вирусы живые и инактивированные; 2) синтетические полинуклеотиды; 3) бактерии, бактериальные эндотоксины и синтетические полианионы. Первые две группы веществ индуцируют образование интерферона как в культуре клеток, так и в организме. Третья группа активна главным образом в организме.

Наиболее изучена интерферогенная активность вирусов позвоночных. Продукцию интерферона вызывают все вирусы, однако активность стимуляции образования его разными видами вирусов различна. К наиболее активным индукторам интерферона следует отнести миксовирусы и арбовирусы. По данным одних исследователей, вирулентные штаммы являются более активными индукторами интерферона, чем авирулентные, а по данным других — такой зависимости нет. Живые вакцины вызывают более длительную выработку интерферона (7—14 дней), чем инактивированные.

В организме животных интерферон обнаруживают через 1—2 часа после введения вируса, максимального уровня он достигает спустя 4—8 часов. Интерферон содержится в крови, в моче, спинномозговой жидкости, в смывах носоглотки, в различных органах (почки, легкие и др.) и тканях животного. Интерферон продуцируется практически всеми клетками организма. Наиболее активно образуют интерферон клетки ретикулоэндотелиальной системы, особенно клетки селезенки и лейкоциты (макрофаги и лимфоциты).

Интенсивность образования интерферона зависит от вида животного и его возраста — взрослые животные продуцируют интерферон более активно. В иммунном организме интерферон синтезируется в меньших количествах. Подавление синтеза интерферона антителами специфично. Существенное влияние оказывает температура — при пониженных и повышенных температурах его образуется меньше, чем при оптимальной температуре (36°) культивирования клеток.

При внедрении вируса в клетку могут образоваться антагонисты интерферона. Одни из них подавляют образование интерферона (блокеры), а другие — стимулируют функцию его (стимулоны). Природа и механизм их действия не выяснены. В том и другом случае отмечают усиление активности репродукции одного вируса другим (феномен экзальтации). Такого рода взаимоотношения между вирусами наблюдают при смешанных вирусных инфекциях. Синергические взаимоотношения между разными видами вирусов усиливает тяжесть течения болезни.

С в о й с т в а и н т е р ф е р о н а. Независимо от условий образования (вида организма, типа клеток, температуры культивирования и т. п.), природы и свойств индуктора интерферона последний обладает рядом общих свойств. Интерферон относят к простым белкам с низким молекулярным весом (20.000—30.000), инактивируется при замораживании и оттаивании, при облучении ультрафиолетовым светом, разрушается трипсином и пепсином, не разрушается рибонуклеазой и дезоксирибонуклеазой, устойчив к прогреванию при 60—80° в течение часа. Его действие проявляется как в кислой (рН 2,0), так и в щелочной среде (рН 10,0).

Одно из характерных свойств интерферона — выраженная видовая специфичность, то есть интерферон, образованный клетками одного вида животного (например, мыши), более эффективно защищает животных только этого же вида, независимо от того, каким вирусом он был индуцирован. В отличие от антител интерферон обладает широ-

ким спектром противовирусного действия. Он не токсичен и имеет относительно слабую антигенную активность, что позволяет его вводить многократно и в больших дозах.

Механизм образования интерферона еще недостаточно изучен. Однако получен ряд данных, раскрывающих основные процессы его синтеза. При заражении культуры клеток или организма образование интерферона индуцирует вирусная нуклеиновая кислота. При этом двуспиральная вирусная РНК более активна, чем односпиральная. На основании других исследований последняя не активна. Ранее предполагалось, что двуспиральность — необходимый атрибут для индукции интерферона вирусного происхождения. Позднее было установлено, что синтетические односпиральные полинуклеотиды также активные стимуляторы интерферона. Сравнительное изучение гомополимеров РНК и ДНК показало, что наиболее активны комплексы РНК : РНК, менее активны смешанные комплексы РНК : ДНК и совсем не активны комплексы ДНК : ДНК.

Исследования по образованию интерферона в культуре клеток, с применением подавителей синтеза белков и нуклеиновых кислот, выяснили, что информация о его синтезе закодирована в клеточной ДНК. В незараженной клетке функции генов, ответственных за стимуляцию образования интерферона, подавлена. Проникший же в клетку вирус, точнее его нуклеиновая кислота, растормаживает (дерепрессирует) функцию соответствующих структурных генов, в результате чего в клетке синтезируется интерферон.

Некоторые исследователи находят сходство между механизмом образования интерферона и синтезом ферментов в незараженной вирусом клетке. Если это действительно так, то механизм образования интерферона можно объяснить гипотезой Жакоба и Моно.

Предполагается, что в геноме клетки имеется несколько структурных генов, несущих информацию о синтезе интерферона. Отсутствие интерферона в не зараженной вирусом клетке, объясняется тем, что в таких клетках синтезируется белок-репрессор, подавляющий функцию гена, ответственного за синтез интерферона. Этот гипотетический репрессор может осуществлять свою функцию двумя способами: 1) путем предотвращения трансляции и-РНК, содержащей информацию для интерферона (в этом случае и-РНК хотя и синтезируется, но она неспособна транслировать свою информацию в полипептидную цепь интерферона); 2) путем ингибирования транскрипции гена, кодирующего интерферон (здесь репрессор действует непосредственно на структурный ген или на ген-оператор, как это показано на схеме Жакоба и Моно) (рис. 60).

По этой схеме белок-репрессор взаимодействует или с геном-оператором (1), или непосредственно ингибирует транскрипцию (2), или же трансляцию (3) структурного гена интерферона, предотвращая этим его синтез. Индуктор синтеза интерферона (вирус, нуклеиновая кислота) может дерепрессировать интерферогенную систему прямо, нейтрализуя репрессор, или опосредованно, прекращая его действие. Природа репрессора пока не выяснена.

Интересно отметить, что синтез клеточных белков и РНК не является необходимым для индукции интерферона стимуляторами невирусной природы. К таким индукторам можно отнести бактериальные эндотоксины, двухспиральные РНК. Поэтому предполагают, что интерферон, появляющийся при индукции эндотоксином, находится в клетке в преформированном виде, а интерферон, индуцируемый вирусом, вновь синтезируется ею. Не исключена возможность, что клетки РЭС постоянно синтезируют небольшие количества неактивного интерферона, а эндотоксины высвобождают его из клеток, разрушая их или делая их мембраны более проницаемыми. Молекулярный вес преформированного интерферона больше (50.000—100.000), чем индуцированного вирусом. Высокий молекулярный вес может быть причиной того, что этот интерферон нельзя освободить из клетки без воздействия индуктором. Имеются также различия другого характера: максимального уровня содержания в крови преформированный интерферон достигает раньше индуцированного вирусом.

Механизм действия интерферона на репродукцию вирусов, помимо теоретического интереса (для понимания сущности клеточного иммунитета, а также для разработки научно обоснованных методов химиотерапии вирусных инфекций), имеет также большое практическое значение — прежде всего для профилактики широко распространенных вирусных инфекций. Разные виды вирусов неодинаково чувствительны к интерферону: одни из них подавляются относительно небольшими концентрациями (вирусы везикулярного стоматита, восточного и западного энцефаломиелитов лошадей, вирус Синдбис), другие более устойчивы к нему (вирусы гриппа, герпес, аденовирусы, энтеровирусы, вирус Ньюкаслской болезни). Как правило, вирулентные штаммы менее чувствительны к интерферону, чем авирулентные.

Уже в ранних исследованиях было показано, что противовирусное действие интерферона проявляется после проникновения вируса в клетку. Причем интерферон не препятствует адсорбции вируса на



Рис. 60. Схема образования интерферона (объяснения в тексте).

клетке, а для проявления его действия необходимо сохранение целостности клеточных рецепторов.

До последнего времени отмечали, что в результате действия интерферона подавляется лишь одна стадия репродукции вируса — синтез вирусных РНК. Этим и объяснялось действие интерферона на РНК- и ДНК-содержащие вирусы: у первых блокируется синтез инфекционной РНК, у вторых — синтез вирусной и-РНК. При этом синтез разных видов вирусных РНК неодинаково ингибируется интерфероном. Так, из трех видов РНК вируса Синдбис наиболее чувствительной к интерферону оказалась инфекционная РНК, менее чувствительны — репликативная форма и промежуточная репликативная форма. Действие интерферона проявлялось не только в снижении общего синтеза вирусных РНК в клетке, но также в изменении их относительных количеств. По данным отдельных исследователей синтез репликативных форм вирусных РНК более чувствителен к действию интерферона, чем синтез инфекционной РНК.

Интерферон подавляет и синтез вирусных ДНК. Методом ауторадиографии было найдено, что число ДНК-синтезируемых мест в зараженных клетках, обработанных интерфероном, было значительно снижено по сравнению с контролем (незараженными клетками).

О действии интерферона на синтез и-РНК вируса оспы получены противоречивые результаты. По данным одних исследователей, вирусная и-РНК ингибируется интерфероном, а других — наблюдается усиление скорости ее синтеза.

Как известно, сразу после проникновения вируса в клетку начинается синтез ранних вирусных белков, необходимых для репликации вирусных нуклеиновых кислот. Установлено, что интерферон ингибирует синтез полимераз. Можно предположить, что интерферон действует не на одну, а на несколько стадий репродукции вируса. В опытах с ингибиторами клеточного метаболизма показано, что для проявления действия интерферона необходим синтез клеточных РНК и белков. Интерферон не может предотвратить репродукцию вируса, если предварительно подавлен их синтез. Поэтому можно предположить, что интерферон действует не непосредственно на репродукцию вируса, а что он является дерепрессором синтеза другого клеточного белка, который обладает антивирусной активностью. Следовательно, активной ингибиторной молекулой является не сам интерферон или по крайней мере не один интерферон. Иначе трудно объяснить, почему после обработки клеток интерфероном необходимо некоторое время (1—4 часа) для развития клеточной резистентности к вирусу. Кроме того, интерферон проникает в клетку в очень малых количествах и поэтому должен действовать как индуктор синтеза другого белка, обладающего антивирусной активностью. Исследования *in vitro* показали, что в клетках, обработанных интерфероном, вирусные полисомы не обнаруживаются. Из этого можно заключить, что местом действия интерферона являются вирусная и-РНК или клеточные рибосомы. Это подтвердили опыты в бесклеточной системе. Рибосомы, выделенные из клеток, обработанных интерфероном, образовывали

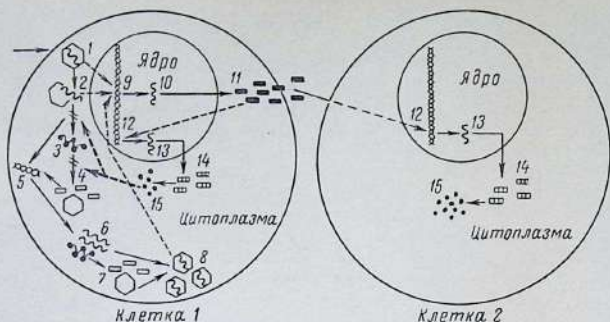


Рис. 61. Схема механизмов образования и действия интерферона:

1 — вирус; 2 — депротенинизация вириона и освобождение вирусной РНК из капсулы; 3 — вирусная полисома; 4 — ранние и капсидные белки; 5 — двуспиральная репликативная вирусная РНК; 6 — вновь синтезированные молекулы вирусной РНК и вирусная полисома; 7 — вновь синтезированные вирусные белки; 8 — вирусное потомство; 9 — участок клеточной ДНК, в котором закодирована информация для синтеза интерферона; 10 — и-РНК для интерферона; 11 — интерферон; 12 — участок клеточной ДНК, в котором закодирована информация для и-РНК (13), необходимая для синтеза белка, ингибирующего трансляцию (14); 15 — рибосомы.

с вирусной РНК нефункциональные полисомы, в то время как клеточная и-РНК связывалась с ними нормально. Исследователи предположили, что инкубация клеток с интерфероном дерепрессирует синтез клеточного белка, ингибирующего трансляцию. Этот белок связывается с рибосомами и изменяет их структуру так, что они становятся неспособными к трансляции вирусной информационной РНК.

Наиболее общепринятый взгляд на механизм образования и действия интерферона схематически представлен на рисунке 61, где показаны последовательность событий, следующие за проникновением РНК-содержащего вируса в восприимчивую клетку (1). Вирусная РНК после освобождения (депротенинизации) из белковой капсулы (2) комбинируется с клеточными рибосомами, образуя вирусные полирибосомы (3). В последних синтезируются вирус-специфические белки (4), включая один или несколько энзимов (РНК-полимеразы), необходимых для репликации вирусных РНК. За формированием репликативных двуспиральных форм (5) следует синтез вирусной РНК (6). Эти вновь синтезированные молекулы будут связываться с рибосомами, в которых синтезируются другие вирусспецифические белки, включая структурные белки капсулы (7). Последние комплексируют с вновь образованными вирусными РНК в новые вирионы (8). Вирус, проникший в клетку, или, возможно, вновь синтезированные вирионы или промежуточные продукты их синтеза (на схеме отмечено тонкими пунктирными линиями) активируют участок в клеточной ДНК (9), несущей информацию для синтеза интерферона. В ядре синтезируются и-РНК для интерферона (10) и интерферон (11). Основная часть по-

следнего будет освобождаться из клетки, но часть будет активировать другой локус клеточной ДНК (12), на котором реплицируется и-РНК (13), необходимая для образования белка (14), ингибирующего трансляцию. Считают, что этот белок реагирует с рибосомами (15), в результате чего они или совсем не могут образовывать полисомы с вирусной РНК, или образуют нефункционирующие вирусные полисомы, которые, однако, хорошо комплексируют с клеточными и-РНК. Толстые пунктирные линии на рисунке показывают две стадии вирусной репродукции, которые подавляются белком, ингибирующим трансляцию (14). В силу этих событий клетка 1 приобретает резистентность к суперинфекции другим вирусом. Интерферон (11), освобожденный из этой клетки, может проникнуть в другую клетку (2) и будет индуцировать в ней (12) синтез белка (14), ингибирующего трансляцию. Эта клетка 2 также будет резистентна к вирусной инфекции.

В последнее время появились работы по обнаружению и характеристике антивирусного белка (АВВ), индуцируемого интерфероном в клетках. С помощью антибиотиков и антиметаболитов, избирательно подавляющих синтез клеточных белков и нуклеиновых кислот, получены данные о динамике синтеза и-РНК для АВВ, о скорости появления и нарастания АВВ и длительности его функциональной жизни. Однако выделить антивирусный белок пока не удалось.

Имеющиеся данные позволяют считать, что механизм действия интерферона на РНК- и ДНК-содержащие вирусы является общим и сводится к нарушению трансляции генетической информации вируса. Однако до сих пор остается не выясненным вопрос об избирательном ингибировании трансляции вирусной и-РНК на рибосомах, выделенных из клеток, обработанных интерфероном.

Возможны три предположения о причинах, вызывающих это явление: 1) изменение структуры рибосом или рибосомальных субъединиц; 2) изменения, возникающие в вирусной и-РНК; 3) изменения, появившиеся в процессе взаимодействия вирусной и-РНК с рибосомами. Наиболее вероятно, что интерферон препятствует соединению вирусных РНК с рибосомами, что приводит к невозможности осуществления последующих этапов в репродукции вируса. Эти изменения, по-видимому, вызываются особым (гипотетическим) белком, образующимся в клетках, обработанных интерфероном, получившим название антивирусного белка (АВВ), или белка, подавляющего трансляцию (БПТ). Таким образом, антивирусное действие интерферона сводится в конечном счете к превращению инфицированной клетки в систему, в которой репродукция вируса либо невозможна, либо подавлена.

П р и м е н е н и е и н т е р ф е р о н а. Современные данные о механизмах образования и действия интерферона свидетельствуют о возможностях использования его для профилактики и лечения вирусных болезней путем введения в организм экзогенного (готового) интерферона или стимуляторов образования его — интерфероногенов. В качестве последних применяют живые вакцины или инактивированные вирусы, а также синтетические интерфероногены. Профилактическая

и лечебная эффективность интерферона показана экспериментально при оспе кроликов, гриппе, арбовирусных и других инфекциях. Его вводили, как правило, в тот же орган, в который затем вводили вирус. При введении интерферона и вируса в разные места эффекта часто не наблюдалось.

Профилактика вирусных инфекций интерфероногенами имеет некоторые преимущества перед плановой иммунизацией вакцинами. Резистентность организма возникает вскоре после введения интерфероногенов. При этом подавляется активность всех или большинства вирусов. Отсюда применение интерфероногенов особенно перспективно при инфекциях, вызываемых вирусами, имеющих большое число серотипов (риновирусы, энтеровирусы, аденовирусы), а также возбудители которых периодически изменяются (вирус гриппа). Однако, вызывая быструю резистентность организма к инфекции, интерферон довольно скоро выделяется из организма. Чтобы поддерживать концентрацию интерферона на нужном уровне, необходимо его вводить регулярно (через 7—10 дней). Будучи средствами экстренной профилактики, интерферон и интерфероногены не могут заменить активную иммунизацию, создающую длительный иммунитет. Но при инфекциях, против которых еще не имеется высокоиммуногенных вакцин (например, грипп), обоснованным является сочетанное использование активной иммунизации и интерфероногенов.

Вирусные ингибиторы. Ингибиторы — это мукопротеидной и липопротеидной природы вещества, содержащиеся в сыворотке, слюне, а также тканях человека и животных, способных подавлять гемагглютинирующие и инфекционные свойства вирусов.

По устойчивости к нагреванию их делят на термолабильные (β -ингибиторы), разрушающиеся при 62—65°, и термостабильные. Среди последних различаются: ингибиторы умеренной термостабильности — α -ингибиторы, разрушающиеся при 75°, и ингибиторы высокой термостабильности, выдерживающие нагревание при 100° в течение 10 минут. Активность термолабильных ингибиторов связана с β -липопротеидами, а термостабильных — мукопротеидами, содержащимися в γ -глобулиновой фракции сыворотки человека и животных. Наиболее высокой вируснейтрализующей активностью обладают термостабильные γ -ингибиторы. В отличие от α - и β -ингибиторов они устойчивы к трипсину, зимозану, CO_2 , фильтрату бульонной культуры холерного вибриона (RDE), но они разрушаются периодатом калия или натрия, ацетоном и риванолом.

После взаимодействия с вирусом ингибиторы утрачивают способность повторно вступать в реакцию с ним. Данное явление было установлено в опытах *in vivo* (легкие хорьков и мышей после контакта с вирусом гриппа последний повторно не адсорбировали). В связи с этим возник вопрос, нельзя ли защитить восприимчивых к гриппу животных от инфекции с помощью неспецифических ингибиторов? В опытах на куриных зародышках и мышках было показано, что предварительное введение ингибиторов препятствует адсорбции вируса на клетках и развитию инфекции.

Механизм действия вирусных ингибиторов сходен с действием на них антител. Вступая в связь с вирусом, ингибиторы лишают их гемагглютинирующей и вируснейтрализующей активности. Вируснейтрализующая активность сывороточных ингибиторов в отношении некоторых вирусов не уступает активности иммунных сывороток, нейтрализуя (в опытах на куриных эмбрионах и мышях) тысячи инфекционных доз вируса. Активность их более высока в отношении авирулентных штаммов, чем вирулентных.

Наблюдается определенная зависимость между чувствительностью вируса к ингибитору и скоростью исчезновения его из организма: ингибиторочувствительные штаммы исчезают из организма, в сыворотке которого содержатся большие количества ингибиторов, через несколько часов, а ингибиторорезистентные штаммы сохраняются в крови в течение 3—4 суток.

Обнаружение вируснейтрализующих ингибиторов в носовом секрете, мокроте, отделяемом верхних дыхательных путей и слюне, явилось основанием, чтобы считать их факторами противовирусного иммунитета.

Роль других факторов естественного иммунитета в противовирусном иммунитете. Роль фагоцитоза. По сообщениям многих исследователей, вирусы адсорбируются на лейкоцитах и поглощаются ими, однако последующего разрушения их в клетке не отмечалось. Попытки в экспериментальных условиях перевести незавершенный фагоцитоз в законченный не привели к успеху. В связи с этими наблюдениями до последнего времени общепринятым считалось, что фагоцитоз не играет защитной роли в иммунитете к вирусам. Однако более совершенные методы исследования показали, что в очищении организма от вирусов существенная роль принадлежит макрофагам, в цитоплазме которых и разрушается вирус. При этом в организме иммунных или естественно резистентных животных процессы фагоцитоза и разрушения вирусов, а также и очищения организма от них происходили более активно, чем в восприимчивом. Более того, в макрофагах последнего отмечалась репродукция поглощенного вируса, а макрофаги разрушались. Фагоцитозу и разрушению вирусов макрофагами способствовали специфические антитела, оказывающие опсонизирующее и агглютинирующее действие на вирусы.

В свете новых данных можно считать, что в иммунитете к вирусам фагоцитозу принадлежит существенная роль. Фагоциты являются не только продуцентами антител, но и интерферона. Поглощая и переваривая вирусы, макрофаги осуществляют важную барьерную функцию в лимфатических узлах, активно участвуют в освобождении организма от циркулирующих в крови вирусов. Активность макрофагов в отношении вирусов возрастает при воздействии содержащихся в крови антител.

Защитная функция температуры тела. Влияние температуры тела на резистентность к вирусам впервые было установлено в опытах на естественно невосприимчивых и иммунных животных. Повышенная температура тела вызывает инактивацию внеклеточного вируса и

подавляет его репродукцию, охлаждение, наоборот, снижает резистентность организма к инфекции.

Влияние температуры тела на репродукцию вируса является не только следствием прямого инактивирующего действия ее на вирус, но и, по-видимому, опосредованного через изменение обмена веществ клетки и организма в целом. Повышение температуры интенсифицирует обменные процессы в клетках и в организме, что сопровождается снижением рН внеклеточной и внутриклеточной среде, а, как известно, кислая среда в пределах рН 5,5—6,5 более губительно действует на многие вирусы, чем на клетки. Ингибирующее действие низких рН сред на вирусы связывают с непосредственным влиянием кислых продуктов обмена на вирус или благоприятным влиянием ее на ингибирующее действие ингибиторов, содержащихся в тканях и жидкостях организма. Таким образом, повышенная температура инактивирует внеклеточный вирус, ингибирует репродукцию его в клетке, повышает образование интерферона, активирует обменные процессы в клетке, приводит к снижению рН среды и кислородному голоданию ткани.

К факторам естественного иммунитета следует отнести выделение вирусов с помощью мерцательного эпителия дыхательных путей, благодаря чему из организма удаляются посторонние вещества живой и неживой природы. Защитным фактором является также процесс выделения вирусов пораженными клетками. Выделение в трахею и бронхи включений вирусов гриппа эпителиальными клетками дыхательных путей протекает значительно интенсивнее при бессимптомной инфекции и резко ослаблен при тяжелом течении экспериментального гриппа у мышей.

Часть третья
ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ИММУНОЛОГИИ

Глава 14. АНТИГЕНЫ

Антигенами считают вещества и клетки, которые, будучи введены в организм парентерально, вызывают пролиферацию и дифференцировку клеток мезенхимального происхождения, образование антител и формирование иммунологической памяти. Такие вещества получили название полных, или истинных, антигенов. Антигенными свойствами обладают чужеродные ткани. Помимо образования антител, они вызывают реакцию отторжения (режекции) гомо- и гетеротрансплантата. Н. Н. Жуков-Вережников (1964 г.) дает более расширенное представление антигенным веществам: они обуславливают размножение плазматических клеток, вырабатывающих антитела, вступают с последними в связь и вследствие этого способны обусловить ряд вторичных иммунологических явлений, относящихся к клеточной защите организма.

Антитела могут образовываться и при введении антигенов в организм через рот (алиментарно) и аэрогенно. Однако в кишечнике часто наступает расщепление молекулы антигена и его функция утрачивается. Для данного вида животного антиген должен быть чужеродным, хотя при определенных условиях и свои белки могут стать аутоантигенами и привести к образованию аутоантител.

Химические вещества, не вызывающие образование антител при парентеральном введении, но вступающие в реакцию с имеющимися антителами *in vivo* и *in vitro*, называют неполными антигенами, или гаптенами. Ими являются многие углеводы, антиген Форсмана и значительное количество простых химических веществ, таких, как йод, бром, атоксил, антипирин и др. Термин «гаптен» введен в 1936 г. Ландштейнером, который в значительной мере изучил природу специфичности антигенов, роль в этом явлении гаптенов и разработал известную реакцию задержки.

Вещества с антигенными свойствами. Хорошими антигенами являются многие природные белки, содержащиеся в тканях животных, растений, паразитов, бактерий и вирусов, а также экзотоксины возбудителей дифтерии, столбняка, анаэробной инфекции, ботулизма, шиговской дизентерии и приготовленные из них анатоксины. Поскольку ферменты тоже относят к белкам, они наделены некоторыми антигенными свойствами.

Сильнейшими антигенными качествами обладают яды многих змей (150 видов), пчел, растительные яды (абрин, кротин, рицин, курцин, робин). К рицину весьма чувствительны лошади, человек. Им отрав-

ляются при употреблении в пищу касторовых бобов. Желудочный сок и протеолитические ферменты ричии не разрушают.

Выраженными антигенными свойствами, хотя и менее специфичными, чем у белков, обладают полисахариды некоторых бактерий. В частности, это относится к полисахаридам, извлеченным из возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза, туберкулеза, пастерелл, шигелл, сальмонелл, дрожжей, грибов, спирохет, свиных аскарид — *Ascaris lumbricoides*.

Образование антител способны вызывать белково-липидные комплексы. Чистые липиды неантигенны.

К антигенам относят митохондрии, рибосомы и нуклеонды. Насчет ДНК Бойд (1969) считает, что она даже в форме нуклеопротеида является гаптенем, а у В. Д. Тимакова с сотрудниками имеются сведения, что ДНК присущи антигенные свойства.

Животные антигены различают по происхождению, специфичности, химическому составу и другим признакам.

Видовые антигены. У разных видов животных гуморальные и клеточные антигенные вещества взаимно чужеродны. Причем чем дальше стоят друг от друга биологические виды, тем эта чужеродность более значительна. С другой стороны, чем ближе таксономическое положение видов, тем менее выражено иммунологическое различие их антигенов. Но даже в том случае, если белки разных видов животных выполняют одну и ту же функцию (гемоглобин, альбумин и некоторые другие белки), они все равно отличаются по химическим и серологическим признакам. Данные различия используют в биологии с целью систематики живого мира от вирусов и бактерий до животных и растений.

Органные или тканевые антигены обнаружены в хрусталике глаза, сперме, нервной ткани, почках, печени, легких, щитовидной и поджелудочной железах, в белках крови. Это антигены, специфические для данного органа, могут обладать некоторой чужеродностью для данного индивида и для индивидов других видов.

В здоровом организме антигены собственных органов не могут выйти в кровь и с ее помощью прийти в соприкосновение с клетками, вырабатывающими антитела. Но при различных патологических состояниях (ранение, воспаление и др.) такая возможность появляется и выработанные антитела могут вызвать повреждения указанных органов. Считают, что симпатическое воспаление глаз, черепно-мозговых нервов, некоторые заболевания центральной нервной системы и внутренних органов имеют иммунопатологическое происхождение. С другой стороны, антисыворотки против органа данного вида будут реагировать с гомологичными органами других индивидов этого же вида.

Помимо видовых антигенов, которые присутствуют на всех стадиях развития зародыша, и органных, возникающих в процессе дифференциации тканей, на отдельных этапах развития зародыша появляются и исчезают **стадио специфические антигены**.

Изоантигены имеются у одних индивидов данного вида и отсутствуют у других. Они являются преимущественно полисахариды клеток, с помощью которых устанавливают групповые и типовые

различия клеток, в частности группы крови у животных и у человека.

По данным В. М. Лубанского (1970), у крупного рогатого скота зарегистрировано 11 генетических систем — А, В, С, F - v, J, S, L, M, N, Z, R¹ — S¹, контролирующие образование 100 антигенных факторов эритроцитов, комбинация которых образует 369 фенотипов, у лошадей соответственно имеется восемь генетических систем — А, D, P, Q, С, К, Т, I, 16 антигенных фракций. У свиней — 14 генетических систем — А, В, С, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, 50 антигенных фракций эритроцитов. У овец семь генетических систем — А, В, С, D, M, R — O, X — Z, 26 антигенных фракций эритроцитов. У кур — 14 генетических систем — А, В, С, D, E, H, I, J, K, L, N, P, H_i, V_h объединяют около 60 антигенных фракций эритроцитов.

Вообще проблема групп крови у животных, антигенных фракций эритроцитов и их генетического детерминирования изучена недостаточно, неполно и, вероятно, неточно. При переливании крови имеет значение ограниченное число ее групп.

У человека насчитывали четыре группы крови: O, A, B, AB. Позднее в группе A выявили две подгруппы — A₁ и A₂ и соответственно в группе AB — A₁B и A₂B. В настоящее время в группе A различают: A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A_x и др. Кроме того, в эритроцитах всех групп крови найден антиген H. Интересно, что антигены A, B и H обнаружены также в слюне, сперме, амниотической жидкости, слезах, моче, спинномозговой жидкости; антигены A и B — в лейкоцитах, а антигены системы ABO и резус — в тромбоцитах. Имеются также антигены M, N. Вообще в эритроцитах более 70 различных антигенов, которые могут дать около 200 000 сочетаний, но практическое значение при переливании крови имеют антигены групп эритроцитов, O, A, B, AB и Rh.

Эритроциты содержат принципиально три основные разновидности антигенов: видовые (неспецифические), общие для данного вида животных, групповые (специфические), позволяющие различать описанные группы крови, и гетерогенные (неспецифические для человека).

Гетерогенные (гетерофильные) антигены. Наиболее изучен из них антиген Форсмана*. Он встречается в эритроцитах барана и в почках морской свинки, в эритроцитах у овец и коз, в органах и в эритроцитах у кур и отсутствует в эритроцитах и органах кролика. Если кролика проиммунизировать тканью почки морской свинки, то в сыворотке крови кролика накопятся антитела: к почкам морской свинки и к эритроцитам барана. К настоящему времени гетерогенные антигены обнаружены также у микроорганизмов (B. anthracis, некоторых сальмонелл, шигелл, пастерелл), растений, червей, ракообразных, рыб, амфибий, птиц, китообразных, копытных животных, собак, кошек, обезьян. Главной составной частью гетерогенного антигена, по-видимому, является полисахарид.

Различают также антигены несовместимости ткани, препятствующие гетеро- и гомопластике, и аутоантигены. Последние образуются из собственных белков при воздействии на

* В действительности антиген Форсмана является гаптенем.

них экзогенными химическими или физическими веществами или под влиянием токсинов, самих бактерий и вирусов.

Во всех указанных случаях, вероятно, происходит либо присоединение к собственным белкам химических группировок, играющих роль гаптена, либо денатурация собственных белков химическими и физическими агентами, либо блокирование или разрушение иммуногенного комплекса диазотированием, ацелированием или дезаминированием. Собственные белки приобретают новую специфичность и становятся аутоантигенами, чужеродными для своего хозяина, и против них образуются антитела — аутоантитела.

Антигены бактерий. Сложный химический состав бактерий априорно предполагает и их сложное антигенное строение. Белки, полисахариды, липиды, органические кислоты, комплексные соединения белков с углеводами и липидами и другие биохимические комплексы, обеспечивающие организацию и структуру бактериальных клеток, одновременно составляют и их антигенное разнообразие, мозаику их полных и неполных, групповых и специфических антигенов. Антигенные вещества, изолированные из тела грамотрицательных бактерий, получили название соматических или О-антигенов, из оболочек и капсул — К-антигенов, из жгутиков — Н-антигенов.

Групповые антигены являются общими для двух или более видов (подвидов, типов) бактерий, входящих в один или разные роды (подвиды, типы). В частности, общие антигены отмечены у отдельных видов (типов) бактерий рода *Salmonella*, у бактерий родов *Francisella* и *Brucella*, у подвида, типов и подтипов *Shig. Flexneri* и т. д.

Специфические антигены имеются у данного вида, типа или подтипа микроорганизма; у других видов, типов или подтипов микроорганизмов их нет. С помощью видовых (типовых, подтиповых) антигенов и приготовленных против них сывороток в пределах рода (родов) дифференцируются виды, внутри вида (подвида) — типы и относящиеся к ним подтипы. Так, в пределах рода *Salmonella* по комбинации антигенов дифференцировано около 700 видов и типов сальмонелл, у подвида *Sh. Flexneri* — пять серотипов, а у типов — по несколько подтипов.

В общих чертах целесообразно рассмотреть антигены грамположительных, грамотрицательных, кислотоупорных микроорганизмов и протективные антигены.

Антигены грамположительных бактерий. Интерес представляют антигены *B. anthracis*, стрептококков, стафилококков и пневмококков.

Из стенки *B. anthracis* изолирован специфический полисахарид, состоящий из остатков d-глюкозамина, галактозы и уксусной кислоты. Капсула в отличие от многих других микроорганизмов состоит из полипептида. Асколи обнаружил термостабильный преципитиноген. Вероятно, он идентичен специфическому полисахариду. Преципитиноген преципитируется специфической антисывороткой, на чем основана диагностическая реакция Асколи.

Стрептококки содержат групповой полисахарид С, на основе которого, используя реакцию преципитации, Ленсфильд (1929, 1933) разделила гемолитических стрептококков на 17 групп: А, В, С, D и т. д. В пределах группы А, патогенной для человека, различают более 40 серотипов на основе М-белкового антигена, обуславливающего вирулентность стрептококков. Эти стрептококки содержат также типоспецифический Т-белковый антиген (включающий О, К и L антигены), с наличием которого связана реакция агглютинации. Представитель стрептококков группы В — возбудитель мастита крупного рогатого скота *Str. agalactiae*, *syn. Str. mastitidis*. Данный вид на основании типоспецифического полисахарида дифференцирован более чем на 15 типов, из них шесть главных и ряд подтипов. Группу С составляют *Str. equi* — возбудитель мыта, *Str. pyogenes* — патогенный для различных животных, *Str. dysgalactiae* — поражающий крупный рогатый скот. Из стрептококков выделена также нуклеопротеидная Р-фракция, общая для других групп стрептококков, пневмококков и стафилококков. Стрептококки группы А, С и G выделяют также стрептолизин (гемолизин) О и S, обладающие антигенными свойствами. Многие стрептококки в окружающую среду выделяют эритрогенный токсин, фермент гиалуронидазу, а стрептококки группы А, кроме того, протеназу.

Стафилококки реакцией преципитации с полисахаридным антигеном дифференцированы на две большие группы: А — патогенные и В — сапрофитные. Другие исследователи делят стафилококков на три группы или типа А, В, С. Реакцией агглютинации с адсорбированными сыворотками определено девять подтипов стафилококков. Описаны: экзотоксин с некротизирующими свойствами, гемолизины α , β , γ , δ , лейкоцидин, разрушающий лейкоциты; некоторые стафилококки продуцируют энтеротоксин, патогенные штаммы — коагулазу, гиалуронидазу и почти все патогенные культуры — фибринолизин.

Пневмококки S-формы по их капсульному полисахариду дифференцированы почти на 80 серотипов.

Из многих грамположительных бактерий, в том числе из стрептококков, выделен полиглицерофосфатный антиген, отсутствующий у грамотрицательных бактерий.

Антигены грамотрицательных бактерий. Заслуживают краткого рассмотрения полный антиген Буавена, антигены сальмонелл, эшерихий, шигелл, бруцелл и некоторые другие.

В 1933—1935 гг. Буавен и Месробеану из *S. typhimurium* извлекли трихлоруксусной кислотой вещество с выраженными антигенными свойствами, не являющееся ни белком, ни полисахаридом. Позднее оказалось, что оно состоит из полисахарида, белка и липида, выделяется из многих S-форм грамотрицательных энтеробактерий, идентично или почти идентично их О-антигену, наделено токсическими свойствами и является эндотоксином. Токсичность, как считают ученые, определяется наличием в эндотоксине так называемого липида А. Последний обладает также сильным адьювантным действием. Полисахариду принадлежит роль индуктора специфических антител. Описываемое комп-

лексное вещество вошло в литературу под названием полного антигена Буавена.

Особенно важными оказались исследования Кауфмана и других ученых по антигенному составу сальмонелл. Наличие у сальмонелл О- и Н-антигенов впервые установили в 1930 г. Смит и Риф и независимо от них Вейль и Феликс у *V. proteus*. О-соматический антиген по химическому составу весьма близок полному антигену Буавена, термостабилен, разрушается лишь после 2—5-часового кипячения. Кауфман и Уайт изучили различные типы О-антигена, ныне обозначаемые арабскими цифрами 1, 2, 3 и т. д. По сходству О-антигена авторы разделили виды сальмонелл на ряд групп: А, В, С₁, С₂ и т. д.

Н-жгутиковый антиген белковый, термолабильный, разрушается при 80°. Антигенный состав жгутиков неоднородный, имеются специфические — а, в, с и т. д. — антигены (специфическая или 1-я фаза) и групповые — 1, 2, 3 и т. д. (групповая фаза или 2-я фаза).

Соматические и жгутиковые антигены у сальмонелл создают различные комбинации антигенного состава. Некоторое представление об этом можно составить по таблице 11, заимствованной у Бойда (1969).

В 1960 г. Штауб и Вестфаль при хроматографии на бумаге углеводов сальмонелл обнаружили группу дезоксисахаров. Их пять: абекоза, тивелоза, аскарилоза, паратоза, колитоза. Последняя имеется также у *E. coli* O111. Все дезоксисахара являются 3, 6-дидезоксигексозами, все они занимают концевое положение, благодаря чему именно они и вступают в контакт с антителами. Этому способствует также наличие в молекуле дезоксисахаров гидрофобной СН₂-группы, легче других связывающейся с активным центром антитела, которой нет в других углеводах. Дидезоксисахара и обеспечивают сальмонеллам высоко специфическую серологическую (иммунологическую) активность.

Таблица 11

Соматические и жгутиковые антигены некоторых широко распространенных сальмонелл

Группа	Вид	О-антигены	Н-антигены	
			фаза 1-я (специфическая)	фаза 2-я (групповая)
А	<i>S. paratyphosa</i>	(1), 2, 12	а	—
В	<i>S. schottmuelleri</i>	(1), 4, (5) 12	б	1,2
	<i>S. typhimurium</i>	(1), 4, (5), 12	и	1,2
С ₁	<i>S. hirschfeldii</i>	6, 7	с	1,5
	<i>S. choleraesuis</i>	6, 7	с	1,5
	<i>S. oranienburg</i>	6, 7	m. t.	—
	<i>S. montevideo</i>	6, 7	g. m. s.	—
С ₂	<i>S. newport</i>	6, 8	e. h.	1,2
	<i>S. typhosa</i>	9, 12	d	—
	<i>S. enteritidis</i>	(1), 9, 12	g. m.	—
	<i>S. gallinarum</i>	1, 9, 12	—	—
Е	<i>S. pullorum</i>	1, 9, 12	—	—
	<i>S. anatum</i>	3, 9	e. h	1,6

Каждый вид сальмонелл обладает только одним дидезоксисахаром. Оказалось, что и отнесение вида сальмонеллы к той или другой группе по классификации Кауфмана — Уайта происходит на основе дидезоксисахара. Например, паратоза оказалась характерной для сальмонелл группы А, абекоза — для групп В и С₂, тивелоза — для группы D. Более того, выяснилось, что абекоза является составной частью четвертого антигена группы В, тивелоза — девятого антигена группы D, колитоза — 35 антигена группы О. Изложенное хорошо иллюстрирует рисунок 62, заимствованный у Бойда (1969).

К-антигены — поверхностные оболочечные или капсульные антигены, у сальмонел их три: Vi, 5 и М. *Vi-антиген* — антиген вирулентности, обнаруженный в 1940 г. Феликсом и Питтом у S-форм возбудителя брюшного тифа; это довольно лабильное вещество позднее было найдено и у некоторых других сальмонелл и шигелл. Оно оказалось высокоиммуногенным; *антиген 5* биохимически и серологически отличается от Vi-антигена, не вирулентен. Vi-антиген *S. Schottmuelleri* и *S. typhimurii* идентичны антигену 5; *антиген М* обнаружен в слизистых штаммах сальмонелл и некоторых штаммах эшерихий. Это полисахарид, свободный от азота.

Согласно данным Кауфмана, у эшерихий дифференцировано 140 О-соматических, 40 Н-жгутиковых и 79 К-антигенов. В состав К-антигенов входят I, В, Vi, А и М-антигены. По О-антигену различают 140 серогрупп эшерихий. В пределах каждой группы антиген может находиться в различных комбинациях с Н- и К-антигенами. Каждая такая комбинация характеризует серотип (О-55: В₅: Н₄; О-55: В₅: Н₆ и т. д.). *I-антиген* эшерихий близок Vi-антигену, разрушается при 100°. *В-антиген* поверхностный, оболочечный, имеет ряд разновидностей, разрушается после кипячения. *А-антиген* — разновидность капсульного антигена слизистых колоний. А- и М-антигены термостабильны.

Среди шигелл на основе О- и К-антигенов дифференцировано пять видов возбудителей: *Sh. Grigoriewa—Shiga*, *Sh. stutzeri—Schmitzii*, *Sh. Large—Sachsi*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei*. Вид Флекснера имеет три подвида: *Sh. flexneri*, *Sh. newcastlii* и *Sh. boydii*. Подвид Бойда включает 15 типов, а подвид Флекснера — ряд типов и подтипов.

Вильсон и Майльс (1932) у бруцелл изолировали два антигена А и М. Открыты также I-антиген, по-видимому, идентичный Vi-антигену *S. typhi*, и комплекс О-антигенов (эндоантигенов).

Возбудитель сапа *Actinobacillus mallei* имеет две антигенные разновидности. Одна содержит антиген, общий с возбудителем мелиоидоза, вторая — антиген, свойственный только сапной бактерии. Найдены также специфический видовой полисахарид и неспецифический нуклеопротеид.

P. pestis содержит ряд антигенов. Из них наиболее хорошо изучены две белковые фракции: IА, в состав которой входит углевод, и IВ — безуглеводная. Обе они, как полагают, локализируются в клеточной стенке возбудителя.

Антигены кислотоустойчивых бактерий. Антигенный состав возбудителей туберкулеза, вероятно, весьма богат,

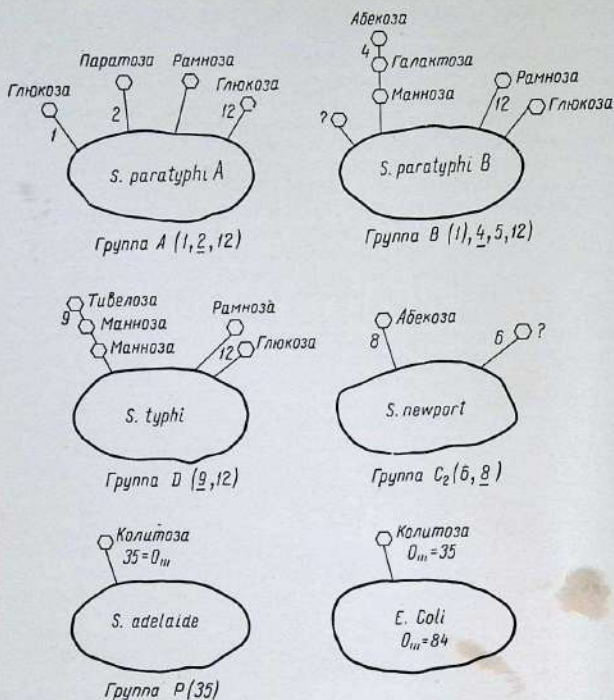


Рис. 62. Схема роли сахаров в специфичности некоторых антигенов по системе Кауфмана — Уайта.

но изучен совершенно недостаточно. В свое время Кох приготовил так называемый старый туберкулин, являющийся фильтратом культуры микобактерий. Позднее из него получили очищенное антигенное белковое вещество (PPD) и активный углевод. Из микобактерий выделен также липополисахарид с антигенными свойствами.

Протективные (защитные) антигены. Впервые такой антиген в очищенном виде получил из отечной жидкости сибиреязвенного карбункула Глаудстон в 1946 г. Позднее его обнаружили в 20-часовой культуре возбудителя сибирской язвы на синтетической среде, содержащей ряд аминокислот, минеральные соли и ростовые вещества. Это белок, близкий альфа-2-глобулину, термолабилен, разрушается при 56° в течение 30 минут, активен при + 4° до двух лет. Из него приготовлена

высокоэффективная химическая вакцина против сибирской язвы. Введение ее в организм, как показалось вначале, не сопровождается выработкой антител. Протективные антигены, будто бы сами обеспечивали защиту организма от возбудителя. Отсюда и их название — протективные.

В 1961 г. стало известно, что протективный сибиреязвенный антиген (фильтрат культур *B. anthracis*) содержит два антигена: термостабильный, не обладающий защитными свойствами, и термолабильный, наделенный ими. Особыми приемами была доказана выработка комплемент-связывающих антител к лабильной фракции протективного антигена и их прямая связь с напряженностью образующегося иммунитета. Возможно, что открытые Байлем сибиреязвенные агрессивины и протективный антиген одно и то же.

Защитные протективные антигены обнаружены у возбудителя чумы (фракция 1-клеточной стенки бактерии чумы), бруцеллеза, туляремии, коклюша. Поиски их продолжаются и у других микроорганизмов.

Синтетические антигены. Некоторые синтетические полипептиды с низким молекулярным весом, порядка 4000, оказались способными вызывать образование антител. Такие антигены используют для изучения структурных особенностей антигенных молекул, их состава, конфигурации, заряда и др.

Антигенность — способность антигена вызывать образование антител. Различают сильные и слабые антигены. Антигенность определяется величиной молекулы антигена (молекулярный вес должен быть не менее 10 000). Чем крупнее молекула, тем лучше выражена антигенность. Вместе с тем некоторые белки разных видов животных, выполняющие одну функцию, независимо от их молекулярного веса могут быть слабыми антигенами. Например, гемоглобин лошади — слабый антиген для кролика, инсулин свиньи и коровы — слабые антигены для человека. И все же величина молекулярного веса, как критерий антигенности, весьма относительна. Сывороточный альбумин и гемоглобин имеют одинаковую величину молекулы, но альбумин антиген сильный, а против гемоглобина антитела вырабатываются с трудом; высокомолекулярные полисахариды — слабые антигены, а полипептиды, состоящие всего из нескольких аминокислот, являются удовлетворительными антигенами.

Гауровиц (1969) связывает антигенность с жесткостью структуры детерминант (см. ниже). Желатина, обладающая нежесткой структурой и слабой антигенностью, становится сильным антигеном после введения в ее молекулу химических веществ (например, тирозина), увеличивающих жесткость. Усиливается антигенность желатинны и при введении ее в организм с адьювантами. Н. Н. Жуков-Вережников (1964 г.) находит, что антигенность прямо пропорциональна химической чужеродности. Чем дальше от белков данного организма стоит антиген по своему химическому составу, тем он сильнее для этого организма. Автор считает, что антиген должен обладать специфичностью и эффективностью — способностью вызывать иммунитет. Наиболее точно положение о чужеродности сформулировал Р. В. Петров

Он считает, что она связана с генетически чужеродной информацией. Однако ни одно существующее объяснение антигенности не является исчерпывающим.

Специфичность. Большинство естественных антигенов состоит из двух частей: белковой высокомолекулярной, определяющей функцию антигена, и небелковой низко- или высокомолекулярной, придающей антигену специфичность. Этот второй компонент антигена получил название «фактора специфичности», или «детерминанты», или гаптена. Именно он обеспечивает специфическую связь с антителами. Если детерминанта отделяется от антигена, то последний называют двухкомпонентным в отличие от однокомпонентного с неотщепляемым фактором специфичности, прочно соединенным с коллоидным носителем. Детерминантами могут быть углеводы, пептиды, липиды, ДНК или РНК, ароматические группы и др.

Считалось, что реагирующими группами антигенных детерминант белков являются ионизирующие группы NH_2 , COOH и гуанидиновая. Бойд (1969) сообщает, что указанные группы не существенные части антигенных детерминант нативных белков. Таким образом, строение детерминант природных белков неизвестно. У полисахаридно-белково-липидных антигенов специфичность обеспечивается дидезоксисахарами.

Тщательное исследование О-антигена (эндотоксина) сальмонелл позволило выяснить химические основы специфичности. Продукты распада эндотоксина: неразрушенный полисахарид (липополисахарид), конъюгированный белок и легко отщепляющийся липид В. Липополисахарид, в свою очередь, расщепляется на фосфорилированный полисахарид и липид А. Липид А является носителем токсичности эндотоксина и адьювантом, полисахарид определяет специфичность антигена. При гидролизе полисахариды распадаются на фосфорную кислоту и 6—7 различных сахаров: гексозаминов, гептоз, гексоз, пентоз и дидезоксисахаров. Дидезоксисахара, как указывалось, и обеспечивают специфичность. Каждый антиген (рецептор) сальмонелл имеет, как правило, только ему свойственную концевую детерминанту. Тем не менее встречаются одни и те же детерминанты у двух разных антигенов (рецепторов), например абекоза на конце антигена 4 и 8 *S. paratyphi* и *S. newport*. Именно этим и объясняются перекрестные реакции между названными сальмонеллами. При мягком расщеплении белков и веществ групп обнаруживаются скрытые антигенные детерминанты.

Итак, для выполнения функции специфичности детерминанты должны быть концевыми, иметь определенный пространственный рисунок и полярную заряженность, то есть быть свободными и активными.

Детерминанты часто сравнивают с валентностью, так как антигены в основном мнововалентны и редко двухвалентны. Поэтому даже небольшая молекула антигена может присоединить несколько молекул антител. В связи с тем, что детерминанты нативных белков неизвестны, валентность белковых антигенов была определена по числу молекул антител, обнаруживаемых в преципитате. Таким способом нашли, что валентность белков колеблется от 5 (яичный альбумин)

до 231 (гемоцианин). Однако валентность белковой молекулы средней величины находится в пределах от 5 до 15.

Соединение с антителами, как и вообще соединение между молекулами, обеспечивается электростатическими, вандерваальсовыми силами, а также с помощью водородных мостиков.

Изолированные детерминанты являются гаптенами, они одновалентны. Соединяясь с антителами, они блокируют их, после чего реакция блокированных антител с полными антигенами становится невозможной.

Н. Н. Жуков-Вережников (1964) считает, что специфичность антигенов не исчерпывается химическими особенностями детерминант, что она связана с биологическим влиянием антигенов на нуклеиновые кислоты клеток, синтезирующих антитела. Это влияние изменяет код и РНК и ДНК клеток и индуцирует выработку ими иммунных глобулинов.

Изменение химической структуры антигенов. Денатурация белковых антигенов кислотами, солями тяжелых металлов, светом (в том числе ультрафиолетовым), теплом, спиртом, ацетоном, эфиром и другими способами изменяет специфичность, но не лишает белок антигенности. Лишь крепкие щелочи устраняют антигенные качества белков. Денатурированные белки лучше взаимодействуют с антителами против денатурированных антигенов и хуже с антителами против неизмененных белков. Считают, что при иммунизации денатурированным белком у животного вырабатываются антитела в основном против денатурированного и нативного белков. Но при реакции антител с денатурированным белком преципитат почему-то не образуется.

Формалин, добавленный к экзотоксинам в дозе 3—5 мл на 1 л при 37—40°, в течение 3—4 недель лишает их токсичности, но не лишает антигенности. Получение таким образом анатоксинов способствовало быстрому внедрению их в практику. Вначале анатоксины были изготовлены против дифтерии и столбняка, а в наше время против ботулизма и возбудителя газовой анаэробной инфекции.

Конъюгированные антигены — белки, получившие новую иммунологическую специфичность после введения в их молекулу простого химического вещества. Появление таких белков позволило особенно тщательно изучить специфичность антигенов. Большие заслуги в этом принадлежат Ландштейнеру (1936). Воздействуя диазотированными аминами, ученый придавал белкам специфичность введенного химического вещества. Образованные против конъюгированного антигена антитела реагировали как с белковой молекулой, так и с конъюгированным в него химическим веществом. Для выявления антител только против конъюгированной химической группы нужно, чтобы в серологической реакции участвовал другой белковый антиген (тест-антиген), не применявшийся для иммунизации животного и конъюгированный тем же веществом. Реакция с тест-антигеном не будет зависеть от белка и пойдет только за счет конъюгированного агента. Для иммунизации Ландштейнер готовил конъюгированный антиген из лошадиной

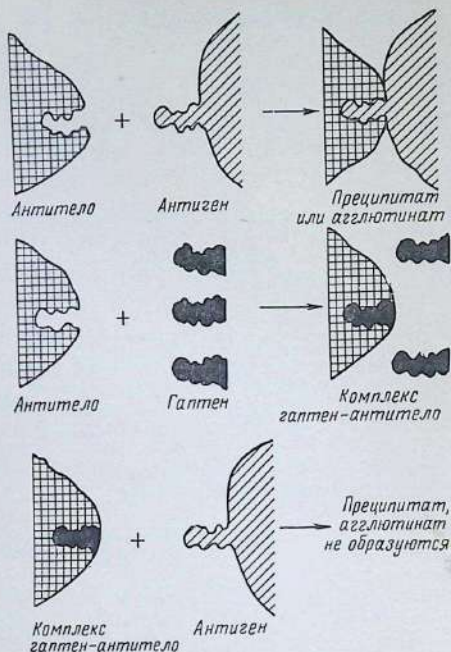


Рис. 63. Принцип задержки серологических реакций гаптенем.

сыворотки, а тест-антиген — из сыворотки крови курицы. Используя большое количество конъюгированных антигенов, он смог выяснить многие стороны интимного механизма специфичности реакции антигена — антитела и пределы ее разрешающей способности. Она оказалась довольно высокой.

Реакция задержки. Сущность этой реакции заключается в том, что если антисыворотку против конъюгированного антигена перед постановкой реакции преципитации обработать химическим веществом (гаптенем), входящим в конъюгированный антиген, то реакция преципитации с конъюгированным тест-антигеном не получится. Не произойдет она потому, что гаптен свяжет специфические к нему антитела и конъюгированный тест-антиген преципитироваться не будет (рис. 63).

С помощью реакции задержки были изучены различные антигенные детерминанты и их сродство с антителами, силы притяжения,

действующие в реакции антиген — антитело, количественное выражение этих сил.

Механизм действия антигенов. К настоящему времени выяснено, что антигены обладают специфическим воздействием на организм, общим действием, адьювантным эффектом, изменяют иммунологическую реактивность организма, способны вызвать иммунологический паралич и обусловить иммунологическую толерантность.

Общее действие антигенов. Изучено главным образом общее действие на организм полных антигенов — эндотоксинов, извлеченных из грамотрицательных бактерий. Они вызывают лихорадку, лейкопению, с последующим лейкоцитозом, сосудистые расстройства, понос, нарушение углеводного обмена (гипергликемию, сменяющуюся гипогликемией), феномен Санарелли — Шварцмана, адьювантный эффект. Действующим началом в этом процессе считают липидную фракцию А эндотоксинов. Внутривенное введение эндотоксинов лошади, собаке, кошке, кролику, обезьяне через четверть-полтора часа вызывает лихорадку и лейкопению. Спустя 2—3 часа температура доходит до максимума, затем быстро снижается. При инъекции больших доз полного антигена возможна вторая лихорадочная волна, вероятно, за счет эндогенных пирогенов, высвобождаемых лейкоцитами, повреждаемыми эндотоксинами. Добавление сыворотки к эндотоксинам увеличивает их пирогенный эффект, а температура поднимается еще выше. От внутривенного впрыскивания кроликам 3—5 мл эндотоксина тифозно-паратифозных бактерий (поливакцины) через 5—15 минут отмечают сосудистый коллапс. Животные тяжело и редко дышат, ложатся на бок, рот раскрыт, после нескольких вздрагиваний погибают. Картина очень напоминает анафилактический шок.

Влияние антигенов на различные хеморецепторы, барорецепторы, вегетативную нервную систему и на обмен веществ возбудимых тканей подробно изучил А. Д. Адо (1952). Он установил возбуждающее действие антигенов на центральную нервную систему, на чувствительные окончания, на нервные проводники и на другие возбудимые ткани; в последних изменяются обменные процессы, имеющие отношение к передаче возбуждения. Ученый отметил, что под влиянием дизентерийного антигена, введенного в каротидный синус, у животного рефлекторно повышается кровяное давление и устраняется дизентерийный токсикоинфекционный коллапс. Исследователь наблюдал выделение дизентерийного антигена почками, устранение реактивности гладкомышечных органов.

Эти и другие эффекты (регуляция теплообмена, дыхания), рефлекторно возникающие под влиянием антигенов в инфицированном организме и нормализующие его нарушенные функции и внутреннюю среду, отнесенные И. П. Павловым к «физиологической мере против болезни», составляют, по А. Д. Адо, сущность патофизиологического действия антигенов, специфической защиты организма от инфекции без участия антител. Именно специфической, ибо ученый нашел, что регистрируемые под влиянием антигена сдвиги характерны для каждого антигена.

Изменение иммунологической реактивности. П. Ф. Здродовский (1950, 1961, 1963) привел значительное количество фактического материала о подчиненности действия антигенов некоторым физиологическим закономерностям: возбуждения, торможения, восстановления реактивности, суммации, рецепции и конкуренции антигенных раздражений. Эти исследования широко известны.

Иммунологическая толерантность — состояние иммунологической ареактивности к специфическому антигену. Данное явление открыто в 1953 г. чехом Гашеком и англичанином Медаваром. Гашек доказал, что парабиоз цыплят после вылупления из яйца обуславливал их взаимную толерантность к переливаемой крови и пересаживаемым кожным лоскутам: против элементов крови не вырабатывались антитела, трансплантат не отторгался. Медавар установил то же на двух линиях мышей, одной из которых в эмбриональном периоде вводились клетки другой линии мышей. После рождения мышь реципиент была толерантна к клеткам и кожным лоскутам мыши донора. Выяснилось, что толерантность обуславливают живые клетки костного мозга, селезенки, лимфатических узлов донора, часть которых приживает в организме реципиента и они в постнатальном периоде не образуют антител против кожи своего бывшего хозяина.

Толерантность образуется не в любое время, а лишь в течение адаптивного периода. У кроликов он заканчивается к 22—24-му дню эмбрионального развития; у мышей, кур и индюшек — через 1—2 дня после рождения; у собак, крыс, уток — через 2—5 и больше дней после рождения и т. д. Полнота и продолжительность толерантности также зависят от ряда факторов. Она наиболее выражена в том случае, если степень родства между реципиентом и донором ближе, если реципиент от донора получил способные к размножению клетки лимфоидного или миелоидного ряда и, наконец, если их доза оптимальна для получения данного феномена. Например, линии мышей А становятся на 100% толерантными к кожному трансплантату мышей линии (СВА × А) F₁ в том случае, когда получают от них на грамм веса 5 000 000 селезеночных клеток: 1 000 000 клеток приводит к образованию толерантности лишь у 25% мышей линии А. Чем дальше родственность между реципиентом и донором (разные виды), тем труднее создать толерантность, тем она менее полна и продолжительна или вовсе не образуется.

Частичная или кратковременная толерантность создается у реципиентов в неонатальном периоде на введение им растворимых антигенов и клеток, неспособных к пролиферации. И в этом случае доза антигена на одну иммунокомпетентную клетку играет большую роль. Рассчитано, что для создания толерантности у новорожденного крольчонка к бычьему сывороточному альбумину крольчонок должен получить более одной молекулы белка на одну клетку, вырабатывающую антитела, или 10¹⁰—10¹¹ молекул. У отдельных крольчат частичная толерантность к человеческому сывороточному альбумину сохраняется до 1—2 лет; у мышей к сывороточным гетероальбуминам — до 4—6 недель; у цыплят к гетерологичным эритроцитам — до 25—50 дней, к гомологичным — до 4—7 месяцев.

В итоге различных исследований было установлено, что толерантность специфична, может быть образована к трансплантатам и антигенным веществам, при этом возможна различная степень ее выраженности и длительности.

Иммунологический паралич. В 1942 г. об открытии этого явления сообщили Фелтон и Оттингер. Суть его сводится к тому, что при инъекции определенного количества антигена в вену, брюшину и толщу кожи животному последнее в течение длительного срока не способно образовывать антитела на этот антиген. Данный феномен был установлен на мышах, которым вводили пневмококковый полисахарид I типа в дозе 500 мг, II и III типа по 50 мг. Иммунологический паралич от полисахаридов пневмококков I и III типов продолжается 15 месяцев, от II типа — 17 месяцев и является тилоспецифическим. Механизм иммунологического паралича не ясен. Считают, что он относится к явлениям иммунологической толерантности, что антиген подавляет или разрушает иммунологически компетентные клетки. Прекращается этот феномен, вероятно, в результате появления новых, не чувствительных к нему клеток. П. Ф. Здродовский (1963) утверждает, что между процессами торможения иммунологической реактивности и «иммунологическим параличом» Фелтона нет ничего общего.

Принцип действия ассоциированных антигенов. Было установлено, что при введении в организм одновременно двух и более антигенов возможны четыре явления: потенцирование, доминирование, взаимное угнетение или адекватная реакция организма на каждый антиген.

Потенцирование — усиление одним антигеном эффекта действия другого антигена. Возможно взаимное усиление двух или большего числа антигенов. При добавлении к ботулиновому токсину Д 0,2%-ной желатины токсичность увеличивается в 20 000 раз. Усиливает ядовитость токсина ботулизма ряд аминокислот: триптофан, аспарагин, солянокислый орнитин. Ядовитость токсинов *Cl. perfringens* и *Cl. oedematiens*, а также *Cl. perfringens* и *Cl. septicus* в смеси возрастает в десятки раз.

Доминирование, или конкуренция. Различают качественное или количественное доминирование. Сильные антигены, введенные в организм (в равнозначных количествах) со слабыми антигенами, угнетают продукцию антител к последним. То же наблюдается при смешивании неравных количеств качественно равнозначных антигенов. Резкое угнетение выработки антител к возбудителю дизентерии отмечали у животных, получивших 8 млрд. убитых сальмонелл брюшного тифа и 1 млрд. дизентерийных бактерий. Титры антител к дизентерийному компоненту были в 2 раза меньшими, чем в контроле.

Взаимное угнетение антигенности. Подобные эффекты, как и предыдущие два, описаны применительно ко многим ассоциациям антигенов. Угнетение образования антител зарегистрировано к антигенам лептоспир и возбудителям дизентерии.

Адекватная реакция организма на антигены. В этом случае наблюдается одинаковая иммунологическая ответная реакция организма на каждый антиген, инъектированный отдельно или в ассоциации с другими. Многие ассоциированные вакцины (против кишечных инфекций и др.) построены на этом принципе.

Глава 15. АНТИТЕЛА

Антителами считают специфические или иммунные глобулины, отличающиеся от нормальных и других иммунных глобулинов своими активными центрами — относительно небольшими участками, ответственными за соединение с антигеном.

К антителам относят белки животного происхождения, которые обладают функцией антител, и белки, сходные по химической струк-

туре и антигенной специфичности, а также миеломные белки, белки Бенс-Джонса и некоторые другие. Функцией антител наделены γ -, β - и в ряде случаев, возможно, α -глобулины.

Антитела при 70° и от воздействия спирта при высокой температуре денатурируются и их активность нарушается. Последняя, кроме того, зависит от рН среды, электролитов в ней и других компонентов. Сернистый аммоний, сернистый натрий, спирт при -5° осаждают γ -глобулины сыворотки, но не повреждают их антителой функции. На этом основано фракционирование белков сыворотки и один из способов очистки антител.

Различают антитела неprecипитирующие (неполные, одновалентные, блокирующие, агглютиноиды) и преципитирующие (полные, двух- или шестивалентные). Первые, соединяясь с антигенами, в пробирках не дают видимой реакции, вторые образуют преципитацию и ряд других визуальных феноменов. По размещению в организме антитела бывают циркулирующие (классические), обнаруживаемые в сыворотке крови и других жидкостных фазах организма. Возможно, существуют клеточные и внутриклеточные антитела. Большинство антител соединяются с антигенами при 37° или несколько большей температуре. Это тепловые антитела. Их подавляющее большинство. Другие тот же эффект проявляют при $+5^\circ$ — криофильные или холодовые антитела. К ним относятся холодовые гемолизины и холодовые гемагглютинины. Третьи соединяются с антигенами при температуре 0° , а максимальный эффект действия проявляют при $+40^\circ$. Они названы двухфазными, биотермическими, а также гемолизинами Донат—Ландштейнера.

Антитела делят, кроме того, на антитоксические, антимикробные и антиклеточные. К антитоксическим антителам относят антитоксины, к антимикробным — агглютинины (склеивающие бактерий), преципитины (агрегирующие белковые молекулы), бактерицидные (убивающие бактерий без заметного изменения их формы), лизины (растворяющие бактерий), опсонины и тропины (облегчающие фагоцитоз бактерий), вируснейтрализующие и иммобилизирующие антитела (обездвиживающие спирохет). Всеми этими свойствами чаще обладает одно и то же антитело. Антиклеточные антитела дифференцируются на гемагглютинины (склеивающие эритроциты), лизины (растворяющие красные кровяные клетки крови), цитоллизины (лизирующие животные клетки) и цитотоксины (умерщвляющие тем или иным способом клетки тканей). Антитела против собственных белков и клеток тканей и органов получили название аутоантител.

Антитела делят также на естественные (или нормальные) и приобретенные. Первые — макроглобулины с константой седиментации 19S (см. ниже), вторые — легкие антитела 7S. В действительности процесс биосинтеза приобретенных антител тоже начинается с продукции 19S-глобулинов. Из этого правила имеются исключения: против О-антигенов образуются только макроглобулиновые — 19S-антитела, против флагеллина — только легкие 7S-антитела. С другой стороны, на первичный иммунологический стимул организм обычно

отвечает образованием макроглобулинов, затем 7S-антител, на вторичный чаще — 7S-глобулинов.

Помимо перечисленных выше, антитела могут вызвать феномены слипания бактерий, набухания капсул и нагрузки тромбоцитов. Вводятся в практику флуоресцирующие антитела. Перечисленные антитела и вызываемые ими феномены хорошо и широко известны. Поэтому нет необходимости останавливаться на них подробно. Вместе с тем описание реакции преципитации в геле и флуоресцирующих антител целесообразно, поскольку сведения о них сравнительно новы.

Реакция преципитации в геле. В тех случаях, когда необходимо выяснить количество разных антигенов и антител в биологических жидкостях организма и сыворотке крови, прибегают к реакции иммунодиффузии указанных компонентов в агаре. Полагают, что различные антигены и антитела имеют разную величину молекул и в агаровом геле, при равных условиях, будут диффундировать с различной скоростью. Если смесь, содержащую разные антигены, поместить в одну агаровую лунку, а антисыворотку — в другую, то в зоне между ними образуется определенное число линий преципитата, соответствующее обычно меньшему числу пар антиген-антитело, находящихся в исследуемых жидкостях. В подобной постановке опыта наблюдается двойная иммунодиффузия, так как антигены и антитела диффундируют навстречу друг другу.

Если в агаре создать постоянную концентрацию одного компонента реакции и внести в него другой компонент, то образуется простая иммунодиффузия — диффузия одного компонента. Следовательно, существуют методы простой и двойной иммунодиффузии. Если линии преципитата против лунок с антигенами совпадают, образуя одну изогнутую линию, то считают, что имеется одна гомологичная система антиген — антитело, если расходятся, то системы разные.

Методы простой иммунодиффузии. Оудин предложил реакцию в пробирке. На агар, смешанный пополам с исследуемой сывороткой, настилают антиген. Пробирки выдерживают несколько дней при 0—4°. Через несколько часов или в первый день регистрируют зоны преципитации. Петри и Стибен засеивали возбудителей газовой гангрены в чашках на агар, содержащий смесь соответствующих антитоксических сывороток. Через 48—72 часа роста при 37° вокруг колоний бактерий, выделяющих гомологичный токсин, появлялись кольцевые линии преципитата. Оухтерлонн пользовался двухслойным агаром в чашках. Нижний слой содержал преципитирующую сыворотку, в верхнем, лишенном ее, в выдолбленных луночках находился антиген. Реакцию читали через несколько дней выдерживания проб при 0—4°. Вокруг луночек образовывались линии преципитата.

Методы двойной иммунодиффузии. Элек рекомендует засеивать материал, содержащий токсигенные бактерии, на элективный для них агар в чашках, на поверхность которого положена полоска фильтровальной бумаги, пропитанная гомологичной сывороткой. Посевы материала делаются штрихами или площадками перпендикулярно к листочку бумаги. Через 24—72 часа роста около культур,

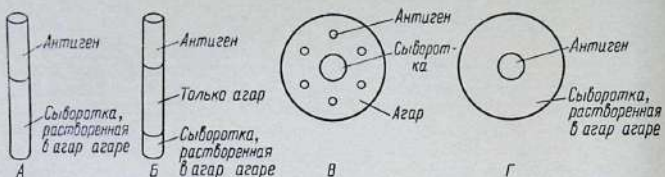


Рис. 64. Схема постановки реакции иммунодиффузии:

А — простая диффузия по Оудину; Б — двойная линейная диффузия по Оукли — Фултроппу; В — двойная радиальная диффузия по Оухтерлони; Г — одинарная радиальная диффузия.

выделяющих гомологичный токсин, отмечают зону преципитата. Реакцию широко применяют для диагностики дифтерии. Оукли и Фултропп использовали три слоя агара в пробирке. Нижний содержал антисыворотку, верхний — антиген, в среднем образовывались линии преципитата после выдерживания проб при 0—4°. Вместо смеси антигена с агаром сверху можно наслаивать раствор одного антигена. Оукли с той же целью брал агаровые пластинки с лунками, одни из которых он заполнял антигенами, другие — антисывороткой (рис. 64). Существует несколько модификаций этого метода: микропреципитация на предметных стеклах, на фотопластинках, в стеклянных капиллярах.

Число систем антиген — антитело, выявляемых реакцией преципитации в агаровом геле, неточно. На него влияет ряд факторов. В частности, следует иметь в виду, что существует два типа преципитинов: кроличьи (R) и лошадиные (H). При избытке антигена преципитат от R-антител растворяется, при избытке антитела он растворяется частично. Преципитаты от H-антител полностью растворяются как при избытке антигена, так и при избытке антитела. Тип преципитинов во многом зависит и от антигена, применяющегося для иммунизации. Против белков и против экзотоксинов обычно вырабатываются антитела типа H. Следовательно, в реакции преципитации лучше брать оптимальные отношения антигенов и антител.

Методом иммунодиффузии можно определить концентрацию антигенов и антител в жидкостях.

Метод иммуноэлектрофореза предложил Грабар (1963) для дифференциации антигенов и антител в смеси. Он является комбинацией двух методов — электрофореза и двойной иммунодиффузии. Вначале антиген, например сыворотку человека, фракционируют в электрическом поле. Для этого в агаровой пластинке, покрывающей дно специальной камеры, делают лунки. В них наливают сыворотку человека и ее фракции разгоняются током определенной силы и определенного напряжения. Затем вдоль лунок с каждой стороны вырезают полоски агара, место заливают тонким слоем агара, а после его застывания заполняют лошадиной преципитирующей антисывороткой против белков сыворотки человека. Наступает двойная иммунодиффузия. Линии преципитата в форме дуг появляются уже через 24 часа. Окончательное число их образуется через 3—7 дней. Агаровые пластинки можно зафиксировать, высушить, линии преципитата окрасить и зарисовать или сфотографировать. Суданом черным окрашиваются преципитаты из липидов и липопротеидов, реакцией Шиффа — из глюкотеинов, пиронином — из нуклеопротеидов.

Меченые антитела. Ими являются γ -глобулины иммунных сывороток, окрашенные (конъюгированные) изотиоцианатом флуоресцеина или другими флуоресцирующими красителями. Лучший из них флуоресцин изотиоцианат. Он стабилен, легко связывается с антителами, интенсивно светится, долго хранится при комнатной температуре.

Существует два метода использования флуоресцирующих сывороток: прямой и непрямой. **Прямой метод.** Каплю меченой сыворотки наносят на мазок или срез ткани, содержащие соответствующий антиген. Получают комплексное флуоресцирующее соединение антиген—антитело, обнаруживаемое с помощью специального флуоресцирующего или обычного микроскопа в сине-фиолетовом свете. Данный метод позволяет не только проводить экспрессную диагностику инфекционных заболеваний, обнаруживать патогенные агенты во внешней среде, но и устанавливать молекулы антигена и антитела в клеточных структурах.

Глобулиновые фракции получают осаждением разведенной иммунной сыворотки насыщенным раствором сернокислого аммония. Осадок трижды отмывают дистиллированной водой. Растворенный глобулин диализируют при $0-5^{\circ}$ против физиологического раствора, который часто меняют до полного удаления сернокислого аммония. γ - и β -глобулиновые фракции получают также осаждением их из иммунных сывороток раствором спирта. Очищенный γ -глобулин получают либо хроматографическим методом, либо препаративным электрофорезом. Взаимодействие конъюгированных глобулинов с антигенами происходит в течение 10 или 30 минут при 37° . Используют прямой и непрямой методы.

Непрямой метод (разработан Уилером и Кунсом в 1954 г.). С его помощью можно обнаружить неизвестный антиген или неизвестное антитело. Допустим, что в исследуемом материале подозревают наличие бруцелл или их антигенов. Из материала делают мазок и обрабатывают его кроличьей антибруцеллезной сывороткой, которая соединяется с бруцеллами или их антигенами, но это соединение невидимо под микроскопом. Обработав дополнительно мазок флуоресцирующим глобулином, извлеченным из сыворотки животного, иммунизированного кроличьей сывороткой, делают реакцию визуальной. Окрашенный глобулин соединяется с неокрашенными антителами, адсорбированными бруцеллами, флуоресцирует, и этим хорошо обнаруживает весь комплекс.

Для выявления подозреваемых, скажем, бруцеллезных антител в сыворотке больного ею обрабатывают мазок, содержащий бруцеллы. Происходит соединение невидимого антитела с бруцеллами. После дополнительного воздействия на мазок конъюгированным глобулином наличие противобруцеллезных антител в исследуемой сыворотке обнаруживают без труда, как в первом случае. Аналогично антитела выявляют в других биологических жидкостях организма — спинномозговой жидкости, моче и т. д.

Реакции с флуоресцирующими антителами быстры, надежны, просты и очень чувствительны. Так, с их помощью обнаруживают единичные

стрептококки, концентрация которых не превышает 40 клеток/мл и которые смешаны с 10 млн. других бактерий. Однако метод не лишен недостатков. Им нельзя дифференцировать виды и типы колибактерий Аризона и сальмонелла, имеющих общий антиген и дающих перекрестную реакцию с флуоресцирующим глобулином; может вообще произойти неспецифическая окраска антигенов. Следует также иметь в виду, что грибы и некоторые ткани обладают собственной флуоресценцией.

Природа и свойства антител. Известно, что антитела связаны с глобулиновой фракцией сывороточных белков, в альбуминах их нет.

Нормальные глобулины человека, лошади, крупного рогатого скота и кроликов по электрофоретической подвижности делят на три фракции γ , β , α . Причем именно с иммунными γ -глобулинами преимущественно и связаны антитела. Об этом свидетельствует ряд фактов: при агаммаглобулинемии нет антител; тотальное облучение разрушает клетки, вырабатывающие антитела, при этом исчезают и γ -глобулины; новорожденные имеют незначительное количество как антител, так γ - и β -глобулинов.

Альфа-, бета- и гамма-глобулины, в свою очередь, в порядке убывающей электрофоретической подвижности подразделяются на две и более фракции α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2 . Фракция глобулинов лошади с промежуточной скоростью движения между β - и γ -глобулинами получила название Т-глобулина.

Имуноэлектрофоретически с помощью иммунной преципитирующей сыворотки лошади в сыворотке человека установлены: 4—5 α_1 -, 4—5 α_2 -, 4—5 β_1 -, 2—3 β_2 -глобулины и 1 γ -глобулин (Бакхауз, 1963). Имеются сообщения о том, что во фракции α_2 выявляют до 12 отдельных компонентов. β_{2M} , как полагают, соответствует макроглобулину или γ_1 -глобулину. У лошади в сыворотке крови иммуноэлектрофоретически обнаружено 20 антигенов, у крупного рогатого скота — 17—22, у овец — 21—24, у кур — 14—18.

По седиментационным данным сывороточные белки делят на десять видов. В их число входят альбумины с константой седиментации 4,5 и молекулярным весом 70 000; γ - и β_{2A} -глобулины с константой осаждения 7,1 и молекулярным весом 160 000; β_{2M} -глобулины с константой седиментации 19S и молекулярным весом 900 000 или 1 000 000; у противоневмококковых антител лошади, свиньи и быка константа седиментации 18S, а молекулярный вес 900 000.

Классификация иммуноглобулинов разработана в 1964 г. Международной комиссией, созванной Отделом иммунологии ВОЗ* в Праге.

Различают пять главных классов иммуноглобулинов (Ig): γ G (IgG), γ M (IgM), γ A (IgA), γ D (IgD), γ E (IgE).

γ G (IgG)-глобулины (γ ; 7S; 6,6 S γ ; γ_2 ; γ_{5S}) составляют большую часть иммуноглобулинов сыворотки крови. На их долю приходится 85—90% общей активности антител сыворотки. Имеют молекулярный

* Всемирная организация здравоохранения.

вес 160 000 и константу седиментации 7S. Электрофоретически это наиболее медленная фракция из всех белков сыворотки. γ G-глобулины содержат до 2,5% углеводов, состоят из двух тяжелых и двух легких полипептидных цепей, имеют общие с другими Ig антигенные детерминанты (в легких цепях) и свойственные только γ G-глобулинам (в тяжелых цепях), обеспечивают пассивную анафилаксию, передаются от матери плоду через плаценту. γ G-глобулины относятся к двум типам. Первый из них после обработки папанном дает слабокислые фрагменты, а второй — менее кислые фрагменты. Среди них выделяют четыре разновидности: γ G₁, γ G₂, γ G₃ и γ G₄.

γ M (IgM)-глобулины (γ ₁M, β ₂M, 19S γ , γ -макроглобулины) составляют 5—10% глобулинов, содержат до 10% углеводов, имеют константу седиментации 19S и молекулярный вес 800 000—1 000 000. Электрофоретически передвигаются быстрее γ G-глобулинов, при восстановлении распадаются на 7S-субъединицы, при более глубоком гидролизе — на тяжелые и легкие цепи. Для γ M имеются специфические антигенные детерминанты в тяжелых цепях и общие с другими Ig-глобулинами — в легких цепях. Предполагают, что γ M-глобулины содержат до десяти активных центров. Они активнее γ G-антител в 60—180 раз.

γ A (IgA)-глобулины (β ₂A; γ ₁A) имеют 10% углеводов и молекулярный вес 300 000. Найдены пока только у человека. Имеется предположение, что T-глобулин лошади (носитель антикоагулянтных антител) эквивалентен IgA-глобулину человека. Восстановление γ A-глобулинов также приводит к высвобождению тяжелых и легких цепей.

γ D (IgD)-глобулины. IgD составляет 0,2—1% всех сывороточных иммуноглобулинов. В норме в 100 мл сыворотки содержится 0,5—40 мг, синтезируется со скоростью 0,03—1,4 мг/кг в день. Константа седиментации 6,5—7S. Включает две легкие цепи типа K и L и две тяжелые цепи. Имеет антигенную специфичность и β -глобулиновую электрофоретическую подвижность. Большая часть IgD (73%) является внутрисосудистым компонентом. Не обладает кожносенсибилизирующей и комплементфиксирующей способностью.

γ E-глобулин (IgE) обнаружен в нормальной сыворотке и среди миеломных белков. В норме в 100 мл сыворотки содержится 10—140 наногр. Скорость синтеза неизвестна. Константа седиментации 7,23—8S; содержит 10,71% углеводов. Включает две легкие цепи типа K и L с молекулярным весом 22 500 и две тяжелые цепи — E с молекулярным весом 75 500. Молекулярный вес всей молекулы — 200 000. IgE имеет антигенные детерминанты, общие с другими классами иммуноглобулинов, и специфические. Обладает сенсибилизирующей активностью. Антитела-реагины ассоциируются с γ E-глобулинами.

Строение иммуноглобулинов одинаково не только у одного животного, но и у всех видов животных, отличаются они лишь последовательностью аминокислот в легких цепях.

Вновь открываемые классы и подклассы иммуноглобулинов рекомендовано обозначать в скобках и применять термин, указывающий на происхождение (географическое название или имена больных), либо обозначать малой латинской буквой.

В плазме и моче здоровых животных и людей обнаруживают некоторые микроглобулины, близкие Fab-фрагментам иммуноглобулинов.

При ряде заболеваний и патологических состояниях находят патологические глобулины: миеломные, белки Бенс-Джонса и др.

Размеры, форма молекул и молекулярный вес. γ G и γ M-глобулины (антитела) в водных растворах асимметричны. Размер молекул γ G-глобулинов, по данным седиментации, вискозиметрии и диффузии — 235·44Å. По расчетам Бойда (1956), γ M-антитела имеют размер 930—981Å·47Å, а не гидратированные γ M-глобулины — 882—928Å·55Å. Размер молекул белков Бенс-Джонса 21·48,3·74,8Å.

Разумеется, в зависимости от метода исследования протяженность молекул иммуноглобулинов меняется.

Антитела кролика к вирусам полиомы и бородавок при электронномикроскопическом исследовании имели вид цилиндра. Однако антитела пластичны и легко меняют свою форму, представляясь то в виде римской цифры V, как бы перегибаясь в центре, то в форме петель. Свехаг (1967) на основе электронной микроскопии пришел к убеждению, что антитела — эллипсоиды 1 : 3, а M-глобулины имеют форму паука с пятью ножками — носителями активных центров антител.

Помимо γ G и γ M-антител с константой седиментации соответственно 7S и 19S и молекулярным весом 160 000 и 900 000 у лошадей обнаружены антитела с 9,5S и молекулярным весом 400 000; у кожносенсibiliзирующих антител седиментация была 8—11S.

Химический состав. Иммуноглобулины в отличие от других глобулярных белков содержат больше оксиаминокислот и дикарбоновых аминокислот. Разницы в аминокислотном составе двух разных антител либо вовсе нет, либо она незначительна. N-концевыми кислотами γ G-глобулина человека являются аспарагиновая и глутаминовая аминокислота, а также серин; в γ G и γ A (T)-глобулинах лошади имеются, кроме того, аланин, валин, лейцин, треонин и др. C-концевые аминокислоты иммуноглобулинов изучены хуже. Имеются сведения о том, что в γ -глобулинах человека находили серин, глицин и следы аланина, по другим данным — глицин, аргинин, цистеин, серин.

Валентность. γ G-глобулины, как правило, двухвалентны. Это значит, что они имеют два активных центра (или участка), которыми присоединяются к антигену и преципитируют (или агглютинируют) его, делая феномен визуальным. Валентность γ M-антител точно неизвестна, но они многовалентны. Имеются сообщения о шестивалентности и даже о десятивалентности макроглобулинов. Неполные (одновалентные, непреципитирующие) антитела в действительности, как считают, двухвалентны, но реакция между ними, антигенами и гаптенами не визуальна.

Антигенные свойства. В иммуноглобулинах различают до семи антигенных детерминант (Незлин, 1966).

1. Детерминанты, общие для всех иммуноглобулинов. Имеются у каждого животного. У человека наблюдают два типа детерминант γ G-глобулинов: K (тип I) и

I. (тип II); то же отмечают и в белках Бенс-Джонса и патологических глобулинах. Они содержатся в легких полипептидных цепях.

2. Детерминанты, характерные для основных типов иммуноглобулинов. Локализуются в Fc-папаиновых фрагментах тяжелых полипептидных γ , α и μ -цепей (см. ниже), а также в D-типе тяжелой цепи.

3. Детерминанты вариантов основных типов иммуноглобулинов. Обнаружены у γ G-глобулинов лошади, человека, мышей, морских свинок; связаны, по-видимому, с Fc-фрагментами тяжелых цепей.

4. Аллотипические детерминанты (см. ниже).

5. Детерминанты, выявленные после рекомбинации тяжелой и легкой цепей. Такая рекомбинация может наблюдаться спонтанно. В одном случае генотипическая детерминанта человека gmb³ была локализована в Fd-фрагменте.

6. Внутренние (скрытые) детерминанты, выявляемые при глубоком ферментативном гидролизе. Обнаружены при гидролизе кроличьего γ -глобулина, при пепсином переваривании анти-резус-антител, при длительном хранении γ -глобулинов человека.

7. Индивидуальные детерминанты иммуноглобулинов и антител. Выявляются при иммунизации антителами животных и получении от них анти-антител. У отдельных анти-антител таким способом обнаружены индивидуальные антидетерминанты к активному центру антитела.

Гетерогенность. Еще в 1936 г. Ландштейнер и Ван Дер Шеер на основе ряда исследований пришли к выводу, что «антитела, образованные в ответ на действие одного антигена, хотя и адаптированы к определенной структуре, все же не вполне однородны и отличаются в какой-то степени по специфичности». Бойд (1963, 1969) эту же мысль выразил так: молекулы антитела образуют «большую семью, члены которой в различной степени отличаются от среднего». Следовательно, антитела к одному и тому же антигену могут быть разными: преципитирующими и неprecипитирующими, авидными и неавидными, тождественными и нетождественными в антигенном, химическом и других отношениях.

Теперь мы знаем, что антитела относятся к различным классам иммуноглобулинов и уже одно это делает их гетерогенными к одному и тому же антигену. Дело, однако, не только в этом. Оказалось, что антитела даже одного класса неоднородны.

Р. С. Незлин (1966) кроличьи преципитирующие γ G-антитела против сывороточного альбумина человека смог разделить на пять фракций. Два типа антител найдены в иммунных сыворотках против типоспецифических полисахаридов пневмококков, обладающих различной активностью. Гетерогенность антител отмечена не только против белковых и полисахаридных антигенов, но и против комплексных, в том числе конъюгированных антигенов и против гаптен. Явление это не совсем ясно. Полагают, что гетерогенность антител определяется известной микрогетерогенностью детерминант антигена. Даже очищенный сывороточный альбумин имеет неоднородные детерминанты. Гетерогенность может быть вызвана выработкой антител на комплекс антиген-антитело, что наблюдается при многократной иммунизации, различием клеток, вырабатывающих антитела, и, вероятно, другими причинами.

Структура антител. В структурном отношении антитела — это белки, несущие специфические активные группы или активные центры (антидетерминанты). При воздействии протеолитическими ферментами антитела распадаются на фрагменты — искусственные осколки антител, а при восстановлении дисульфидных связей — на пептидные

цепи, из которых состоят антитела, или на субъединицы, включающие тяжелые и легкие цепи антител.

Активные центры антител. Эти части молекул антител незначительны. Площадь участка антитела, специфически вступающего в реакцию с антигеном, не превышает 700\AA^2 , что составляет примерно 2% поверхности антитела. Активный центр антител состоит из 10—20 аминокислотных остатков, что соответствует примерно 1% всех аминокислотных остатков антитела. Винклер (1963) нашел, что активный центр антител состоит не более чем из трех или четырех аминокислотных остатков.

Химический состав активных центров изучен недостаточно полно. Отмечено, что наиболее постоянно в активных центрах различных (но не всех) антител присутствует тирозин. Он участвует в реакциях как против нейтральных (незаряженных), так и против отрицательно и положительно заряженных гаптенов. Однако имеются сообщения о том, что активные центры антител к гаптенам, заряженным положительно, имеют отрицательно заряженную группировку COOH^- , к гаптенам, заряженным отрицательно, — положительную группировку — NH_4^+ .

В активном центре различных антител обнаруживали лизин, триптофан и другие аминокислоты.

Фрагменты антител. Портер (1959), воздействуя на молекулу γ -глобулина и антител папаином, нашел, что они распадаются на три фрагмента: I и II (Fab-фрагмент), весьма сходные между собой, и фрагмент III (Fc-фрагмент). Активный центр антител оказался связанным с Fab-фрагментом. Константа седиментации каждого фрагмента соответствовала 3,5S, а молекулярный вес около 50 000. Основная часть углеводов оказалась связанной с фрагментом III (рис. 65).

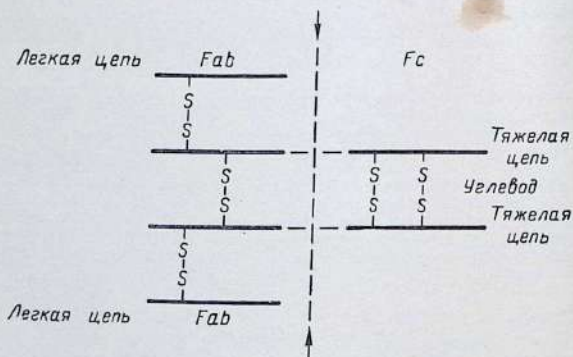


Рис. 65. Схема строения молекулы γ G-глобулина кролика по Портеру (вертикальный пунктир — место расщепления папаином).

Дальнейшее изучение фрагментов гидролизного расщепления глобулинов лошади, человека, кролика, мыши к белкам, полисахаридам и конъюгированным антигенам показало, что образуются две электрофоретически подвижные фракции: быстрая и медленная. Обе фракции при ультрацентрифугировании, как указывалось, имеют одну константу седиментации 3.5S. Медленный компонент во всех случаях оказался одновалентным антителом. Соединяясь с антигеном, он блокировал его и этим задерживал визуальную реакцию преципитации, флукуляции, связывания комплемента. Антитоксический γ -глобулин лошади при воздействии папаином также расщепляется на быструю (F) и медленную (S) фракции. S-фракция *in vitro*, блокируя анатоксин, тормозила его флукуляцию и связывание комплемента, а *in vivo* нейтрализовала токсин. F-фракция не обладала этими свойствами. Пепсин, трипсин, папаин, бромелаин, протеазы крови переваривают антитела и γ -глобулины различных видов животных примерно одинаково.

В 1964 г. в Праге разработали следующую классификацию фрагментов папаинового гидролиза:

прежние наименования	предлагаемые наименования
A, C, S (I, II — у кроликов)	Fab-фрагмент (реагирующий с антигеном)
B, F (II — у кроликов)	Fc-фрагмент (кристаллизующийся)
A — часть	Fd-фрагмент

При необходимости указать цепь делается приставка, например F_α или F_β. Для 5S фрагментов пепсинового гидролиза, имеющих два активных центра, предлагается наименование F (ав¹)₂, для одновалентного фрагмента Fab¹. Аналогично обозначают фрагменты иммуноглобулинов, не обладающие активностью антител.

Пептидные цепи и субъединицы антител. Восстановлением междучепьевых дисульфидных связей в молекуле γ G-глобулина было найдено, что они содержат около 70% тяжелых цепей (A-цепей) и около 32% легких (B-цепей). То же наблюдали и при воздействии на γ M-макроглобулин меркаптоэтанолом.

Для иллюстрации приводим молекулярные веса γ G-пептидных цепей: тяжелая цепь γ -глобулина лошади (рН 3,5) — 50 300; легкая цепь γ -глобулина лошади (рН 7,5) — 19 400; легкая цепь γ -глобулина кролика (рН 7,5) — 20 000; Fab-фрагмент γ -глобулина кролика (рН 3,5) — 40 000; участок тяжелой цепи из Fab-фрагмента кроличьего γ -глобулина (рН 3,5) — 21 600.

Молекула γ G-глобулина, как выяснилось теперь, состоит скорее всего из четырех цепей: двух легких с молекулярным весом около 30 000 и двух тяжелых с молекулярным весом около 50 000, соединенных дисульфидными связями. Легкие цепи γ -глобулинов разных животных и различных антител при электрофорезе в щелочных буферных растворах делятся на десять фракций. Тяжелые цепи кроличьего γ -глобулина в отличие от легких цепей имели значительно больше гистидина, аргинина, пролина, аланина, метионина, тирозина и S-карбоксиметилцистеина. Полагают, что все или подавляющее число N-концевых аминокислот находятся в легких цепях и лишь незначительная часть в тяжелых. Основными N-концевыми аминокислотами человеческого γ -глобулина являются две (аспарагиновая и глутаминовая), кроличьего также две (аланин и аспарагиновая кислота), лошадиного и бычьего — 4—5, свиного — три.

С какой цепью связан активный центр антител? В этом вопросе пока нет единства мнений. Однако большинство ученых считают, что для проявления активности нужен комплекс тяжелых и легких цепей антител. В то же время установлено, что активность искусственных, гибридных молекул антител и γ -глобулинов была связана с тяжелыми цепями. Возможно, легкая цепь лишь частично участвует в формировании активного центра или стабилизирует структуру тяжелой цепи.

В антигенном отношении легкие и тяжелые цепи оказались различными. По антигенному признаку легких цепей γ -глобулины человека делятся на два типа: тип I (или K) и тип II (или L). Выяснилось и другое: папаиновые гидролизаты гетерологичных и аутологичных γ -глобулинов вызывают у кролика образование преципитинов, реагирующих с этими фрагментами, но не с целой молекулой неизмененного γ -глобулина. Это свидетельствует о наличии в γ -глобулинах, в том числе аутологичных, скрытых (глубинных) детерминант, выделяемых лишь после расщепления белковой молекулы.

Проиллюстрируем свойства пептидных цепей γ G-глобулинов.

	Тяжелая цепь	Легкая цепь
Содержание в молекуле (в %)	68	32
Молекулярный вес	50 000	20 000
Углеводы	есть	нет
Антигенные детерминанты, общие с γ A и γ M-глобулинами	нет	есть
Антигенные детерминанты, специфичные для γ G-глобулинов	есть	нет
Генотипические факторы человека:		
Gm	есть	нет
Iny	нет	есть
Аллотипические детерминанты кролика	«а»	«в»
Присутствие в папаиновом фрагменте:		
Fab	есть	есть
Fc	есть	нет
Способность связывать комплемент	есть	нет

При неполном восстановлении всех дисульфидных связей получают субъединицы γ G-глобулина, содержащие оба типа цепей. Такие субъединицы получены из γ -глобулина кролика. Они состояли из двух одинаковых половин, каждая из которых содержала тяжелые и легкие цепи. Константа седиментации половинок равнялась 2,8—2,9S, а молекулярный вес около 80 000. Объединение половинок, что происходит при доведении реакции до нейтральной, приводит к образованию исходной молекулы 7S. Описанные и иные субъединицы γ G-глобулинов получены рядом исследователей. В частности, был получен фрагмент 5,3S с качествами двухвалентного антитела. γ M-глобулины человека при мягком восстановлении дисульфидных связей высвобождали субъединицы с молекулярным весом, равным 185 000, при этом антигеновая активность глобулинов исчезала. γ A-глобулины человека при восстановлении образовывали субъединицы, сходные с субъединицами γ G-глобулинов.

В 1964 г. в Праге была принята следующая классификация пептидных цепей. Предложено вместо прежних названий H, L, A и B пептидные цепи пользоваться словами: «легкие» (H, L) и «тяжелые» (A, B) цепи:

а) Тяжелые цепи (обозначаются малыми греческими буквами, которые соответствуют заглавным латинским в обозначении класса иммуноглобулина)

Класс иммуноглобулина	Тяжелая цепь
γ G или IgG	γ (гамма)
γ A или IgA	α (альфа)
γ M или IgM	μ (мю)
γ D или IgD	δ (дельта)

б) Легкие цепи

Прежние обозначения	Предлагаемые обозначения	
	Имуноглобулин	Легкие цепи
Тип I	Тип K	κ (каппа)
Тип II	Тип L	λ (лямбда)

в) Молекулярные формулы

Прежние обозначения	Иммуноглобулин	Молекулярная формула
7S γ — тип I	γ GK или IgGK	$\gamma_2\lambda_2$
7S γ — тип II	γ GL или IgGL	$\gamma_2\lambda_2$
γ_1 A — тип I	γ AK или IgAK	$\alpha_2\lambda_2$
γ_1 A — тип II	γ AL или IgAL	$\alpha_2\lambda_2$
γ_1 M — тип I	γ MK или IgMK	$(\mu_2\lambda_2)_3$
γ_1 M — тип II	γ ML или IgML	$(\mu_2\lambda_2)_3$

Глобулины мочи, состоящие из легких цепей λ_2 или λ_2 (если в димерной форме).

Специфичность антител. Серологические реакции обладают значительно большей специфичностью и чувствительностью, чем химические. Антитела за очень редким исключением реагируют только с теми антигенами, против которых они выработаны и подходят к ним как отпечаток к пальцу. Эта последняя особенность получила название комплементарности антител — дополнения к детерминанте антигена.

Антитела способны различать не только белки и антигенные полисахариды разных видов животных, но и незначительные изменения в структуре тех и других. Они различают правовращающие (d) и левовращающие (l) простые химические соединения, присоединенные к белковому антигену. В частности, ученые с помощью преципитинов дифференцировали d- и l-винную кислоту, а обе эти от мезовинной кислоты. Серологически удалось дифференцировать D-глюкозу и D-галактозу и даже α — D-глюкозид и β — D-глюкозид. Имеются указания на то, что полипептиды, построенные из синтетических D-глутаминовой кислоты и D-лизина, не вызывают выработки антител. Полипептиды, построенные из L-форм тех же аминокислот, активны и против них антитела образуются. Однако если в синтетические полипептиды ввести шесть молекул D-тирозина, то антитела образуются.

Разграничению поддаются также различные простые химические группы, например кислотные, конъюгированные в белок. Антитела курицы против белка лошади, с включением в мета-положение метаниловой кислоты, реагируют с белком лошади, к которому присоединена m-аминоарсиновая кислота, или с белком, соединенным с m-аминобензойной кислотой. Эти кислоты сходны с метаниловой кислотой. Реакция произойдет, если они окажутся в мета-положении, но она будет слабее. Если они будут в пара-положении или гаптен окажется вообще без кислотной группы, то реакция будет совсем слабой или вовсе отсутствовать.

Специфичность антител, как считают, обуславливается химической структурой и пространственным рисунком их антидетерминант. Тем не менее еще не ясно, что же конкретно характеризует специфичность, так как концевое расположение аминокислот всех изученных антител и нормальных глобулинов кролика, по мнению Бойда (1963), однородно. Это как будто говорит против связи специфичности антител с их химической структурой. В то же время антитела и нормальные глобулины лошади и человека по их N-концевым группам неоднородны.

Пытаются связать специфичность с преобладанием в активном центре антител, главным образом триптофана, с особенностями свертывания полипептидной цепи в молекулу антитела.

Наряду с рассмотренными данными существует точка зрения, что специфичность антител связана с первичной структурой, от которой зависит и вторичная структура иммуноглобулина. Большой интерес в этом отношении представляют работы по молекулярной структуре

миеломных белков человека. В частности, было обнаружено, что в отличие от С-концевой половины белков Бенс-Джонса (полагают, что это легкие цепи миеломных белков), с определенной постоянной последовательностью аминокислот, N-концевая половина отличается вариабельностью, затрагивающей положение почти половины составляющих ее аминокислот. Имеются сообщения и об аналогичных данных, полученных на тяжелых цепях миеломных белков, где вариабельности подвержены около 100 аминокислот N-концевой половины. Можно легко себе представить астрономическое разнообразие антител, которое они могут дать.

Эти данные свидетельствуют о том, что тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов могут содержать стабильную и вариабельную части и именно последняя, вероятно, и обуславливает специфичность активного центра.

В связи с этим, по мнению Портера (1969), допустимы три возможности.

1. Стабильная часть молекулы иммуноглобулина детерминируется одним постоянным геном, вариабельная — тысячами. При образовании пептидных цепей они соединяются в молекулу иммуноглобулина под влиянием особого клеточного фактора. Антиген в этом случае выступает в качестве триггера синтеза антител.

2. Молекула иммуноглобулина кодируется стабильными и изменчивыми генами. В период клеточного деления во время генетической рекомбинации происходит взаимный обмен частями изменчивых генов, что и обуславливает большое разнообразие их, в свою очередь обеспечивающее множество вариабельных участков молекул иммуноглобулинов.

3. Ген, кодирующий вариабельную часть молекулы иммуноглобулина, повреждается особым ферментом. Другие ферменты восстанавливают повреждение, но вследствие ошибок допускают различную последовательность нуклеотидов в пределах данного гена. Это и дает различие аминокислотной последовательности вариабельной части молекулы иммуноглобулина.

Индукция биосинтеза антител. Синтез антител протекает в две фазы. Первая фаза индуктивная (латентная) (2—4 дня), при которой антитела и антителообразующие клетки не обнаруживаются; вторая фаза — продуктивная (начинается после четвертого дня) — антитела обнаруживаются в плазматических клетках и в оттекающей от лимфоидных органов жидкости.

Судьба антигена. Совершенно необходимым индуцирующим фактором антител является введенный в организм антиген. Теоретически можно допустить, что для этого процесса достаточно одной молекулы антигена или ее части на клетку. И действительно, в одних случаях нескольких сот молекул антигена шигелл, в других — одной десятиллионной грамма сывороточного альбумина на одну лимфоидную клетку достаточно, чтобы вызвать синтез антител. Расчеты показали, что антитела образуются клеткой, в которую попали всего две детерминанты антигена.

Установлено, что корпускулярные антигены попадают в клетки путем фагоцитоза, растворимые — с помощью пиноцитоза — отшнуровки погруженных внутрь клетки мешочкообразных углублений ее цитоплазмы, заполненных антигеном. Весьма возможно, что пиноцитозом обладают многие клетки. Во всяком случае, лимфоциты и плазматические клетки им наделены. Антигены после их введения в организм всегда обнаруживались в клетках типа макрофагов. Для внедрения антигена в клетку требуется всего несколько минут. В частности, антиген шигелл проникал в клетки лимфоузлов через 30 минут.

С помощью радиоактивных меток и флуоресцирующих антител удалось доказать, что антигены вскоре появляются в микросомах, затем митохондриях и в ядрах клеток. В этих структурах антиген или его детерминанты могут удерживаться длительное время (несколько недель и месяцев). Vi-антиген сохраняется в печени десять месяцев. Вычисления свидетельствуют, что сывороточный альбумин быка в печени кролика может находиться до трех лет.

Синтез нуклеиновых кислот. Через 2—5 дней после введения в организм животного антигена наблюдали значительное увеличение РНК, а отдельные ученые и ДНК. После вторичного антигенного раздражения наступает более энергичная стимуляция синтеза ДНК клетками, образующими антитела. Стимуляция специфична и при инъекции иного антигена не происходит. Синтез ДНК начинается через пять часов после инъекции антигена и продолжается 24 часа (Коев, Талмедж, 1965).

Некоторые авторы зарегистрировали увеличение обмена нуклеиновых кислот в селезенке по включению их предшественников, а некоторые установили нарастание высокополимерной РНК в селезенке и лимфоузлах иммунизированных кроликов. Отмечено накопление рибосомальной и информационной РНК в лимфоидных органах. Однако в клетках, вырабатывающих антитела, по данным многих экспериментов, количество информационной РНК, ответственной за синтез антител, стабильно. Предполагают, что плазматические клетки, вырабатывающие антитела, не образуют РНК, ответственную за синтез антител, а получают ее от клеток предшественников.

Значительный ряд ученых пытался установить индуцирующую роль РНК, извлеченной из клеток лимфоидных органов иммунизированных животных. Введение такой РНК неиммунизированным животным стимулировало продукцию соответствующих антител. Во многих случаях при этом обнаруживали наличие антигена в извлеченной РНК, который (а не РНК), как считают, вызывал продукцию антител.

Ингибиторы синтеза ДНК и РНК тормозят или предупреждают и синтез антител.

Индуктивная фаза образования антител. После введения различных антигенов в организм наступает период, в течение которого нельзя обнаружить ни антител, ни антителообразующих клеток. Этот период носит название индуктивного. Его длительность зависит от вида антигена, его дозы, пути введения, характера

иммунизации, метода индикации антител и т. д., и нередко при первичном ответе может составлять до трех суток. Индуктивная фаза (при первичном ответе) *in vitro* в культуре лимфоидных клеток не осуществляется. В организме в период этой фазы происходит выраженная пролиферация лимфоидных клеток, усиливается синтез нуклеиновых кислот и белка. Оказалось, что индуктивная фаза антителогенеза в отличие от продуктивной, когда образуются антитела, характеризуется чувствительностью к воздействию ионизирующей радиации, ингибиторов белкового и нуклеинового обмена. При вторичном иммунологическом ответе индуктивная фаза значительно короче (см. также главу 17). Несмотря на интенсивные исследования, механизм процессов, лежащих в ее основе, неизвестен.

Биосинтез антител. Единого мнения о механизме образования антител не существует. Одни авторы считают, что их синтез происходит независимо от нормальных глобулинов. Другие полагают, что молекула антитела образуется следующим путем: под влиянием антигена создаются активные центры антитела, а остальную часть молекулы составляют пептидные цепи нормального глобулина. Во всяком случае, чрезвычайно большое сходство или идентичность между иммунными и нормальными γ -глобулинами установлено подавляющим большинством ученых.

Кинетика образования антител. Продуктивная фаза характеризуется быстрым нарастанием антител в крови, особенно в период вторичного иммунологического ответа и медленным их уменьшением. Максимальная концентрация различных антител в сыворотке крови после первичной иммунизации регистрируется на пятый, седьмой, десятый или 15-й день; после инъекции депонированных антигенов — на 21—30-й или 45-й день. Далее, через один, два, три и более месяцев титры антител приходят к исходным. При иммунизации кроликов депонированной лептоспирозной вакциной антитела обнаруживались еще в значительной концентрации через девять месяцев. Бернет (1964) установил, что антитоксины накапливаются в крови до известного времени по логарифмической кривой. Носсаль (1966) предполагает, что одна клетка в одну секунду образует до 1500 молекул антитела.

После внутривенной реинъекции бычьего сывороточного альбумина у кроликов, иммунизированных несколько месяцев назад, антитела нарастали следующим образом. В течение первой, экспоненциальной, фазы, длившейся 25—30 часов, титры антител удваивались через каждые 2,2—3,7 часа и в общем увеличивались в 100—1000 раз. Во вторую, арифметическую, фазу удвоение титров наблюдали через 3,6—6,2 часа в течение двух суток. Вскоре после достижения максимума скорость нарастания антител снижалась и достигала приблизительно 5% максимальной скорости. Полагают, что обнаруженная закономерность двухфазной скорости образования антител типична для вторичного иммунологического ответа после внутривенного повторного введения антигенов иммунизированным кроликам. Найдено, что увеличение концентрации антител при вторичном иммунологическом ответе

происходит в результате увеличения числа клеток, вырабатывающих антитела, и в силу усиленного синтеза антител каждой клеткой.

В опытах А. Е. Гурвича (1964) по расчетам автора кролики образовывали за сутки до 0,5 г антитела на 1 кг веса и по 7800 молекул антител в минуту на каждую («работающую» и неработающую) лимфоидную клетку животного; концентрация вырабатываемых антител «работающими» клетками должна быть увеличена в 10—15 раз. Близкие к этому цифры приводят и другие авторы.

Количество вырабатываемых антител зависит от характера антигена и пути его введения. На О- и К-антигены в общем образуется небольшое количество антител, на лептоспирь антитела регистрируются в миллионных разведениях. При всех условиях введение антигена в область или в толщу самих лимфатических узлов сопровождается большей выработкой антител, чем при иных путях инъекции антигена. Внутримышечная инъекция столбнячного анатоксина значительно эффективнее внутривенной. Количество продуцируемых антител зависит также от линии животного продуцента.

Опыты на мышах линии А (Джексон, А) Хестон, BALB, DBA показали, что для создания иммунитета против 200Ld столбнячного токсина, «легко иммунизирваемым» мышам требовалось антигена в 10 раз меньше, чем иным линиям грызунов.

Р. В. Петров с соавторами (1963) обнаружили, что мыши линии С57ВL в равных условиях иммунизации вырабатывали противолептоспирозных антител в 15—20 раз больше, чем мыши линии С3Н. При вторичном иммунологическом ответе анти-телообразующая реакция стиралась.

Образовавшиеся антитела немедленно поступают в окружающую среду независимо от концентрации в ней имеющихся антител. Часть синтезированных антител некоторое время удерживается клетками в эндоплазматической сети и в околядерном пространстве. Удалось обнаружить антитела, связанные с рибонуклеопротеидами микросом селезенки и лимфатических узлов иммунизированных животных. Антитела освобождались лишь после разрушения РНК РНКазой.

Основным местом пребывания антител является кровь. Однако они могут быть только в тканях. В частности, при заражении мышей вирусом *Lymphogranulema inguinalis* в легкие или в мозг, антитела, нейтрализующие вирус, появляются только в легком или только в мозгу; многие одновалентные наклоточные и внутриклеточные антитела в крови также не обнаруживаются.

Последовательность синтеза различных антител. Установлено, что после первичной иммунизации вначале появляются тяжелые антитела — 19S(γ M), затем в течение короткого срока — антитела 19S и 7S(γ G) и, наконец, одни легкие — 7S. Синтез последних может продолжаться длительное время, порядка многих месяцев и лет. Антитела 19S обладают узкой специфичностью и реагируют только с гаптеной группой комплексного антигена, вторые (7S) вступают в реакцию как с гаптеном, так и с белком комплексного антигена.

Вторичный иммунологический стимул ускоряет синтез обоих типов антител и укорачивает фазу продукции 19S-глобулинов или они вовсе не синтезируются.

У новорожденных птиц и беспозвоночных животных наблюдается преимущественно синтез γ M-антител, на смену которым позднее приходят γ G-антитела. Лишь у куньих акул антитела принадлежат только к глобулинам, близким γ M, других антител у них не обнаружено.

Синтез антител *in vitro*. Продукция антител клетками, изъятymi от иммунизированных животных и приведенных в контакт с антигеном *in vitro*, наблюдалась всеми исследователями. Эти опыты документировали образование антитоксинов, гемолизинов и иных антител, которые появились после 2—3 или более дней от начала контакта иммунных клеток с антигеном. Количество образующихся антител значительно.

Метаболизм иммунных глобулинов. Иммунные глобулины могут попасть от матери плоду через плаценту или новорожденному с молозивом. У человека, приматов, кроликов, морских свинок, мышей, крыс γ G-глобулины легко пропускает гемохориальная плацента. Эпителиохориальная плацента лошади, коровы, козы, свињи и десмохориальная плацента овцы для иммунных глобулинов непроницаема. У иммунных коров и овец антител в молозиве больше, чем в сыворотке, и молозиво является единственным путем передачи иммунных глобулинов новорожденным. У кроликов столбнячные антитоксины проникают через плаценту и не передаются крольчатам-сосункам через молоко.

У грызунов и у грудных детей материнские антитела, поступившие через плаценту, постепенно исчезают, и их заменяют активно синтезируемые иммунные глобулины под влиянием перенесенных инфекций (часто бессимптомных) и антигенов бактерий, локализованных в кишечнике и других полостях. У абактериальных животных, выращенных в стерильных условиях, уровень γ -глобулинов по сравнению с обычными животными снижен.

Скорость полураспада антител в организме животного зависит от его вида, возраста и класса иммунного глобулина. У взрослых людей период полураспада γ G-глобулина равен восьми или 23 суткам, γ M-глобулина — восьми суткам, γ A — шести суткам, γ D — 2,8 суток. У крупного рогатого скота 50%-ный распад γ G-глобулинов происходит через 21 сутки, у собак — через восемь, у обезьян — через семь, у кроликов — через пять суток. У мышей γ A-глобулины распадаются через 1,2 суток, γ G — через 0,7—0,9, γ M — через 0,5 суток. Разница во времени распада объясняется, возможно, тем, что γ G, γ M, и γ A-глобулины образуются в разных клетках; при всех условиях γ G-антител продуцируется больше, чем остальных. Существенно отметить, что в отличие от сывороточных белков иммуноглобулины распадаются не до конечных, а до более или менее крупных фрагментов, которые и выводятся с мочой. Гетерогенные глобулины распадаются, как гомологичные глобулины, после пятого дня, с появлением против них преципитинов распад ускоряется.

Приведенные цифры касаются искусственно введенных глобулинов в организм животного. Их активная выработка и непрерывное поступление в кровь уменьшают эффект полураспада.

Группы γ -глобулинов. Подобно группам крови у животных и у человека обнаружены разные группы наследуемых сывороточных белков, то есть генетически контролируемые антигенные детерминанты, или аллотипы. Белки эти различаются антигенными свойствами, выявляемыми реакциями преципитации и их модификациями. Имеется в виду, что в хромосомах (или хромосоме) клеток, синтезирующих γ -глобулины, находятся определенные локусы и их аллели, ответственные за синтез антигенных детерминант белков сыворотки крови.

Аллотипы иммунных глобулинов кроликов. В генотипе кроликов различают два локуса *a* и *b*, контролирурующие синтез иммунных глобулинов. В локусе *a* имеются три аллеля — Aa^1 , Aa^2 , Aa^3 , контролирующие синтез трех детерминант иммуноглобулинов Aa^1 , Aa^2 , Aa^3 ; соответственно в локусе *b* также обнаружены три аллеля — Ab^4 , Ab^5 , Ab^6 , контролирующие синтез глобулиновых детерминант Ab^4 , Ab^5 и Ab^6 . Ныне у кроликов насчитываются семь аллотипов иммуноглобулинов. Детерминанты обоих локусов встречаются только в Fab-фрагментах иммуноглобулинов. Локус *b* контролирует синтез легких цепей. Тяжелые цепи содержат антидетерминанты, контролирующиеся локусами *a* и *b*.

Аллотипы иммунных глобулинов мышей. В генотипе мышей обнаружены три локуса, контролирующих синтез аллотипических антигенных детерминант двух подтипов γG ($\gamma 2a$ и $\gamma 2b$) и тип γA -глобулинов. Все три детерминанты локализируются в Fc-фрагменте γ -глобулинов. Аллотипические детерминанты $\gamma 2a$ -глобулинов имеют восемь иммунологически сходных аллельных вариаций.

Глава 16. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕОРИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ

Образование антител является очень сложной проблемой, так как затрагивает ряд вопросов из различных смежных дисциплин (генетики, биохимии, морфологии, цитологии, молекулярной биологии и др.), стыкующихся в настоящее время с иммунологией.

Предложено несколько теорий антителогенеза.

Теория прямой матрицы Гауровиц—Полинга. Сущность теории сводится к тому, что антиген, поступив внутрь клеток, вырабатывающих антитела, играет здесь роль матрицы, оказывающей влияние на образование молекулы γ -глобулина из полипептидных цепей, синтез которых протекает без участия антигена. Иными словами, первая фаза образования пептидной цепи будущего γ -глобулина протекает обычно в клетке и на нее антиген не влияет. «Вмешательство» антигена наступает во вторую фазу образования белка — фазу скручивания пептидных цепей в молекулу γ -глобулина. Антиген так изменяет концевые N-аминокислоты будущего антитела (γ -глобулина или его отдельных пептидных цепей), что они становятся комплементарными детерминантам антигена и легко вступают с ними в связь. Образовавшееся таким образом антитело отщепляется от антигена, поступает в кровь, а освободившийся антиген принимает участие в формировании новых молекул антител.

Эта теория вызвала ряд серьезных возражений. Она не может объяснить 1) образования иммунологической толерантности; 2) преобладающего количества вырабатываемых антител клеткой в единицу времени на имеющееся в ней во много раз меньшее число молекул антигена; 3) продолжительности образования антител организмом, исчисляемой годами или всей жизнью, и значительно меньшим сроком сохранения антигена в клетках и т. д. В 1965 г. Гауровицем предло-

жена новая концепция, по которой антиген изменяет не только вторичную, но и первичную структуру γ -глобулина.

Теория непрямой матрицы, или инструктивная теория Бернета — Фенера получила известность в 1949 г. Ее авторы считали, что макромолекулы антигена и, скорее всего, его детерминанты проникают в ядра клеток зародышевого типа, вызывают генетические, наследственно закрепленные изменения в них, следствием которых является образование антител к данному антигену. Допускается аналогия между описываемым процессом и трансдукцией у бактерий. Полагают, что изменения затрагивают ядерные нуклеиновые кислоты, участвующие в синтезе белка, или образуются новые ферментные системы, участвующие в этом процессе. Обретенное клетками новое качество образования иммунных γ -глобулинов передается потомству клеток в бесчисленных поколениях. Однако вопрос о роли антигена в описываемом процессе оказался спорным. Именно это обстоятельство явилось причиной возникновения теории Н. Йерне.

Теория естественной селекции Йерне. По представлениям Н. Йерне (1955), антиген не является матрицей для синтеза антител и не вызывает генетических изменений в клетках продуцентах антител. Его роль сводится к селекции имеющихся «нормальных» антител, спонтанно возникающих к различным антигенам. Происходит это будто бы следующим образом: антиген, попав в организм, находит соответствующее антитело, соединяется с ним, образовавшийся комплекс антиген — антитело поглощается фагоцитами и далее попадает в клетки, вырабатывающие антитела, и эти последние получают стимул производить именно эти антитела. При вторичном введении антигена процесс синтеза иммунных γ -глобулинов к данному антигену ускоряется и усиливается, подчиняясь закономерностям вторичного иммунологического ответа.

Легко заметить, что эта теория в значительной мере умозрительна. Она не встретила среди ученых ни особой симпатии, ни страстной критики. Сторонники и противники ее оказались к ней одинаково равнодушными. Вместе с тем она не лишена некоторых бесспорных фактов. γ -глобулины, как теперь известно, действительно играют в организме роль специфических транспортеров ряда веществ в клетки (липидов, полисахаридов) и выводят из них некоторые продукты метаболизма. Явление это — специфической адсорбции глобулинами ряда веществ, а не только антигенов — представляет большой теоретический и практический интерес.

Клонально-селекционная теория Бернета явилась (1959) дальнейшим развитием идеи Н. Йерне о селекции, но не антител, а клеток, производящих антитела. Ф. Бернет полагает, что в результате общего процесса дифференциации в эмбриональном и постнатальном периодах из мезенхимных клеток образуется множество (более 10 000) клонов лимфоидных и иммунологически компетентных клеток, способных реагировать с различными антигенами или их детерминантами и вырабатывать антитела — глобулины. Характер реагирования лимфоидных клеток на антиген в эмбриональном и постнатальном периодах

различен. Зародыш либо совсем не вырабатывает глобулинов, либо синтезирует их немного. Однако допускается, что его клоны клеток, которые способны вступить в реакцию с антигенными детерминантами собственных белков, реагируют с ними и в результате этой реакции уничтожаются. Так, вероятно, погибают клетки, образующие анти-А-агглютинины у организмов с группой крови А и анти-В-агглютинины с группой крови В.

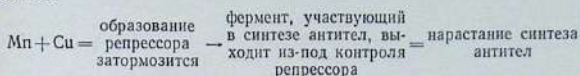
Если эмбриону ввести какой-либо антиген, то аналогичным образом он уничтожит соответствующий клон клеток и новорожденный теоретически в течение всей последующей жизни будет толерантным к данному антигену. Процесс уничтожения всех клонов клеток к собственным белкам зародыша заканчивается к моменту его рождения или выхода из яйца. Теперь у новорожденного осталось только нужное ему, только «свое» и любое «чужое», попавшее в его организм, он распознает. Ф. Бернет допускает также сохранение «запретных» клеток, способных реагировать с аутоантигенами органов, которые в процессе развития были изолированы от клеток, вырабатывающих антитела. Распознавание «чужого» обеспечивается оставшимися клонными мезенхимных клеток, на поверхности которых имеются соответствующие антидетерминанты (рецепторы), комплементарные к детерминантам «чужого» антигена. Природа рецепторов детерминирована генетически, то есть закодирована в хромосомах и не привносится в клетку вместе с антигеном.

Наличие готовых рецепторов неизбежно ведет к реакции данного клона клеток с данным антигеном, следствием которой теперь являются два процесса: образование специфических антител (иммунных глобулинов) и размножение клеток данного клона. Ф. Бернет допускает, что мезенхимная клетка, получившая антигенное раздражение, в порядке митоза дает начало популяции дочерних клеток. Если такая клетка осела в мозговом веществе лимфатического узла, она дает начало образованию плазматических клеток, при оседании в лимфатических фолликулах — лимфоцитам, в костном мозгу — эозинофилам. Дочерние клетки склонны к соматическим необратимым мутациям. При расчете на весь организм число мутирующих клеток за сутки может составить 100 000 или 10 000 000 и, следовательно, мутации обеспечат клоны клеток к любому антигену.

Суть своей теории Ф. Бернет сформулировал следующими словами, в которых не более 8 английских букв: «Отличать свое от чужого — главное условие жизни. Уже в чреве заложено то, что будет жить во взрослом. «Свое» — все, чему клетки не могут вредить; а те, что вредят, должны умереть. Со всем, что приходит из почвы или воздуха, идет борьба как со злом. Клетки пожирают микробов, спасая от них организм. Число клеток любого клона, берущего начало еще в утробе, при встрече с ключевым агентом быстро пойдет вверх, если доза антигена мала, но гибель их ждет, если его слишком много».

Теория Ф. Бернета вызвала большой интерес, симпатично подавляющего числа исследователей и огромный поток проверочных экспериментов. Сам автор теории указал к ним путь. «Если бы кому-нибудь

(Cu), конструирование репрессора затормозится, фермент, участвующий в синтезе антитела, выйдет из-под его контроля и синтез антител будет нарастать:



Дальше продукция антител протекает известное время и без участия антигена.

Л. Сцилард считает, что образование антител контролируется особыми не удваивающимися генами. Число их достигает 10 000 на каждый одинарный (гаплоидный) набор хромосом. Дальнейшее развитие теории Сциларда получила в работах А. Е. Гурвича (1964) и В. П. Эфроимсона (1963).

* * *

Дж. Ледерберг (1959) считает, что в генах, ответственных за синтез глобулинов, имеются участки, контролирующие образование активных центров антител. В норме функция названных участков заторможена и поэтому идет синтез нормальных глобулинов. Под влиянием антигена, а также, возможно, под действием некоторых гормонов происходит растормаживание и стимулирование деятельности участков гена, ответственных за образование центров антител, и клетка начинает синтезировать иммунные глобулины.

В. П. Эфроимсон (1963) выдвинул гипотезу мутационного или эволюционно-генетического происхождения иммунитета. Автор считает, что вещества с антителоподобными свойствами в организме хозяина возникают в результате мутирования гена (или генов), управляющего синтезом субстрата, в котором нуждается облигатный паразит. Это мутирование, как правило, ведет к незначительному изменению субстрата, вероятнее всего только в его реактивном центре. В итоге фермент облигатного паразита окажется способным соединиться с измененным субстратом, но не сможет его расщепить и ассимилировать. Субстрат, таким образом, превращается в «ловушку» для фермента. А так как система фермент паразита — субстрат хозяина имеет строго специфическую связь, то субстрат из питательного вещества для паразита становится антителоподобным веществом для него. Такое наследственное изменение, дающее хозяину иммунитет против паразита, будет подхвачено отбором и широко распространено у данного вида.

В качестве доказательства этого положения приводится пример с аномальным гемоглобином, ведущим к иммунитету против возбудителей малярии. Аналогично рассуждая, патогенные агенты, реагирующие с глобулином сыворотки хозяина, могут привести к превращению глобулина в специфический блокатор фермента, или, что то же, в иммунный глобулин. И в этом случае произошел бы отбор данного вида хозяина, в генотип которого вошли гены измененных глобулинов. Процесс усиленной продукции антител в след за введением антигена автор объясняет не только общезвестным фактором избирательного размножения лимфоидных клеток, но и активацией уже имеющихся генов в них, ответственных за синтез иммуноглобулинов. Можно предположить, что антиген специфически деблокирует, выводит из гетерохроматического состояния тот ген или гены, которые образуют к нему антитело.

Взгляд Эфроимсона заслуживает внимания. Он обоснован теоретически, хотя в этом отношении не все обстоит так, как бы хотелось. В частности, концепция «ловушки» ко многим ферментам неприменима, так как образующийся комплекс фермент — антитело остается активным. Вообще же необходимы прямые доказательства гипотезы.

Матрично-генетическая концепция иммуногенеза и его нейрогуморальная регуляция. Анализируя данные литературы и многолетние

исследования своих сотрудников, П. Ф. Здродовский предложил общую концепцию образования антител клетками и регуляцию этого процесса в целостном организме. Он исходил из следующих положений:

1) продуцентами антител являются клетки ретикуло-лимфоидной ткани;

2) биосинтез антител — это частный случай биосинтеза белка, регулируемого соответствующими участками ДНК в хромосомах клеток;

3) введенный в организм животного антиген обуславливает: а) растормаживание генетических детерминант, ответственных за синтез активных центров антител с сохранением расторможенности в ряде последующих генераций клеток; б) растормаживание отдельных участков ДНК, контролирующих размножение клеток, вырабатывающих антитела, что ведет к нарастанию антител; в) раздражение аденогипофиза, что индуцирует выработку СТГ и АКТГ, обеспечивающих регуляцию иммуногенеза в целостном организме;

4) неспецифическая стимуляция образования антител, осуществляемая различными адьювантами, сводится к усилению биосинтеза белка вообще и иммуноглобулинов в частности.

В своей концепции автор использует известные представления о комплексообразовании антигена и РНК в макрофаге, ассимиляции этого комплекса некоммитированными клетками — предшественниками с последующим гистогенезом плазматических клеток:



(см. главу 17).

В соответствии с представлениями ряда ученых (схема Жакоба и Моно) П. Ф. Здродовский отводит антигену роль дерепрессора определенных генов, контролирующих синтез соответствующих плементарных антител. Одновременно антиген, как допускает П. Ф. Здродовский в соответствии с теорией Г. Селье, раздражает аденогипофиз, в результате чего происходит выработка соматотрофного (СТГ) и адренкортикотропного (АКТГ) гормонов. СТГ стимулирует плазмоцитарную и антителообразующую реакцию лимфоидных органов, в свою очередь стимулированных антигеном, а АКТГ, воздействуя на кору надпочечников, вызывает выделение ею кортизона. Этот последний в иммунном организме угнетает плазмоклеточную реакцию лимфоидных органов и синтез клетками антител.

Действие гипофизо-адренкортикальной системы на продукцию антител может выявляться лишь в предварительно иммунизированном организме. Именно эта система организует анамнестические серологические реакции в ответ на введение в организм различных неспецифических раздражителей.

* * *

К. А. Лебедевым (1969) в основу представлений о механизме иммуногенеза положен принцип модификаций (фенокопий). Возникновение иммунологической специфичности связывается с самоспрогнозирующимися единицами, находящимися в цитоплазме (единицы внеядерной наследственности — ЕВН).

После встречи организма с антигеном он ассимилируется макрофагами и подвергается биохимической переработке. В цитоплазме макрофага тем или иным путем происходит активация ЕВН, которая комплексируется с антигеном (ЕВН + АГ). На этом комплексе, в том числе и против аминокислотной части АГ, происходит конструирование новой измененной ЕВН, имеющей авидитет к АГ и способной самореплицироваться. Эта атЕВН (антитело ЕВН) далее передается в лимфоцит, и, обладая способностью реплицироваться, определяет иммунологическую память.

Антителообразование происходит только в том случае, если АГ попадает в лимфоцит, содержащий атЕВН. Под его влиянием лимфоциты дифференцируются в плазматические клетки, синтезирующие антитела. Если же лимфоциты встречаются с антигенами, которые не могут в них проникнуть (агрегированные антигены, клетки и т. д.), лимфоциты подвергаются лишь пролиферации и осуществляют трансплантационный иммунитет благодаря наличию в них атЕВН, обладающей авидностью к соответствующим клеткам. При первичной иммунизации в силу латентного периода, необходимого для образования в макрофагах атЕВН, значительное количество лимфоцитов оказывается насыщенными АГ. Такие лимфоциты воспринять атЕВН не могут (допускается, что лимфоцит, воспринявший атЕВН, «запирается» для проникновения в него других атЕВН), а «свободных» лимфоцитов остается очень мало. Именно поэтому первичный ответ характеризуется индуктивным периодом и относительно слабым антителообразованием. При повторном ответе роль макрофагов уже сводится к минимуму; к этому периоду в организме достаточно лимфоцитов, содержащих атЕВН, и после встречи с АГ они сразу же начинают дифференцироваться в плазматические клетки, секретирующие АТ.

Если в организм вводят большие дозы АГ, то он блокирует практически все лимфоциты, в результате чего создается состояние иммунологической толерантности. Если в синтезе АТ участвуют ЕВН (без антигенной комплементарности) и атЕВН без АГ, фактически образуются так называемые неспецифические глобулины.

По мнению Фриденштейна и Черткова (1969), в феномене образования антител антигену не принадлежит ни роль стимулятора синтеза комплементарных предтерминированных клеток, ни роль дерепрессора соответствующих цистронов в ДНК клеток-предшественников. Дело заключается в том, что специфичность образуемого антитела выбирается в зависимости от антигена-индуктора каждой клеткой-предшественником. Однако каждая такая клетка не может образовать любое антитело, поскольку выбор осуществляется между отдельными клетками в популяции, а эти клетки выбирают одну из нескольких имеющихся у них программ белкового синтеза. Начало иммунологического ответа состоит в поиске отдельных исходными клетками нужного направления дифференцировки. При естественной трансформации клеток происходит дерепрессия многих цистронов, усиливается синтез и-РНК и именно в этот момент клетка становится «открытой» для действия различных индукторов (например, антигенов), которые закрепляют один из возможных путей белкового синтеза, но сами не служат дерепрессором.

Клетка начинает синтезировать все те виды иммуноглобулинов, которые записаны у нее в программе. Образующиеся антитела реагируют с антигенами, и это приводит к устойчивому синтезу комплементарных (если они имеются) и репрессии остальных. Если все образуемые антитела оказываются некомплементарными, клетки гибнут. Об этом и свидетельствует значительная гибель клеток в начале иммунного ответа. Таким образом, антиген осуществляет выбор дифференцировки клеток-предшественников и служит сигналом для ее начала.

Допускается, что не каждая трансформирующаяся клетка отвечает на воздействие митогенного стимула. Именно поэтому по современным представлениям и существует четыре вида клеток-предшественников — S, SS, X и Y клетки (см. главу 17).

Из современных представлений об иммунологическом процессе интересна гипотеза Р. В. Петрова (1970), предполагающая участие в нем взаимодействия определенных клеток. Автор постулирует, что для реализации иммунологического ответа, иммунопопоза необходимо кооперативное взаимодействие трех видов клеток: лимфоцита, активированного антигеном (происходящего из тимуса), макрофага, ассимилировавшего антиген, и недифференцированной стволовой клетки. События разворачиваются следующим образом.

Антиген, попадая в организм, с одной стороны, ассимилируется макрофагами, которые его утилизируют и формируют антигенную информацию, с другой — он активизирует лимфоциты, образующие индуктор иммунопоэза, являющийся, по-видимому, метаболитом, структура которого генетически специфична. Для осуществления иммунопоэза стволовая клетка должна прореагировать с двумя или с одной из этих клеток. В том случае, если стволовая клетка контактирует с макрофагом и антиген-активированным лимфоцитом и получает в результате взаимодействия антигенную информацию из макрофага и индуктор иммунопоэза из лимфоцита, она дифференцируется в антителообразующие или в сенсибилизированные клетки; если только с лимфоцитом, то под влиянием индуктора иммунопоэза она получает инструкцию лишь о направлении дифференцировки, в результате индуцированный иммунопоэз сопровождается синтезом неспецифических гамма-глобулинов. При взаимодействии стволовой клетки только с макрофагом и, следовательно, ассимиляции подготовленной в нем антигенной информации она адаптируется к антигену и в организме создается иммунологическая толерантность. Взаимодействие этих трех клеток зависит от состояния антигена и макроорганизма. Поэтому в связи с указанными ситуациями в организме иммунизация будет сопровождаться накоплением антителообразующих или сенсибилизированных клеток, клеток, синтезирующих неспецифические гамма-глобулины, или толерантных клеток.

Вследствие того что индуктор иммунопоэза аллотипически специфичен, он может передаваться активированным лимфоцитом и генетически чужеродной стволовой клетке (которая таким лимфоцитом не распознается как «чужая»), выполняя роль антимаболита и блокируя таким образом ее размножение и дифференцировку. Именно этим и объясняется, по мнению автора, феномен инактивации несингенных стволовых клеток антиген-активированными лимфоцитами.

В заключение следует отметить, что на сегодняшний день пока не существует решающих доказательств в пользу какой-либо из рассмотренных теорий.

Глава 17. ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ

К иммунологически компетентным клеткам относят плазматические клетки, лимфоциты, ретикулярные клетки и макрофаги.

Плазматические клетки впервые описаны Валдейером (1875), Кайял (1890), Унна (1891) и Маршалко (1895).

В процессе своей функциональной активности плазматическая клетка проходит ряд стадий или фаз развития. Они располагаются по степени ее зрелости: плазмобласт — незрелая (юная) плазматическая клетка — зрелая плазматическая клетка. Полагают, что плазматические (антителообразующие) клетки образуются в результате деления клеток-предшественников: под влиянием антигена клетки-предшественники дифференцируются в плазматические. Предполагают, что клетками-предшественниками могут быть лимфоциты и ретикулярная клетка. После антигенного воздействия малый лимфоцит и ретикулярная клетка, очевидно, дифференцируются в плазмобласт либо через стадию большого лимфоцита, либо непосредственно. Считают также, что в определенных случаях малый лимфоцит может сразу трансформироваться в зрелую плазматическую клетку.

Действительно, культивирование лимфоцитов *in vitro* позволило выявить трансформацию малых лимфоцитов в незрелые бластоидные и плазматические клетки. Внесение малых лимфоцитов в диффузионной камере в ауто- или гомологичного хозяина показало, что они превращались в клетки плазмоцитарного ряда, содержащие антитела, выявляемые методом Кунса. При исследовании возможности трансфор-

мации ретикулярной клетки в плазматическую удалось выявить изменения в ультраструктуре ретикулярных клеток, постепенно переходящих в плазматические. Промежуточными были «активированные ретикулярные клетки».

В цитоплазме плазматических клеток содержится большое количество рибонуклеиновой кислоты, что выявляется окраской метилгрюнпиронином. Отсюда и характерная для этих клеток пиронинофилия. *Плазмобласт* — крупная, слабо пиронинофильная клетка с диаметром 15—20 μ , большим рыхлым, бедным хроматином ядром, содержащим одно или несколько ядрышек. *Незрелая плазматическая клетка* меньшего размера (10—15 μ), имеет овальное эксцентрично расположенное ядро с выраженным хроматином и более пиронинофильную цитоплазму. *Зрелая плазматическая клетка* — еще меньшего размера, ядро богаче хроматином, смещено эксцентрично, около него зона просветления, цитоплазма резко пиронинофильна.

Цитоплазма плазматических клеток переполнена эргастоплазматическими мешочками, стенки которых усеяны многочисленными рибосомами, где, как известно, происходит синтез белка. Мешочки заполнены светлым гомогенным содержимым. Плазматическую клетку иногда называют одноклеточной белковой железой.

Имеются сообщения, что иммуноглобулин, синтезированный на рибосомах плазматической клетки, перемещается в аппарат Гольджи, где в мешочках к глобулину присоединяются углеводы, синтезируемые из простых сахаров.

Реакции на антиген. Антигенные вещества способствуют возникновению интенсивной пролиферации плазматических клеток. Различные хронические и острые инфекции сопровождаются накоплением плазматических клеток. Эти клетки часто располагаются скоплениями, в центре которых может находиться гемоцитобласт. Обычно в такой «колонии» находятся клетки, синтезирующие антитела одного вида.

При гипергаммаглобулинемии повышенная плазмоцитарная реакция сочетается с гиперпродукцией антител, наоборот, при гипо- или агаммаглобулинемии иммунизация вызывает слабое образование антител и плазмоцитарную реакцию, или таковые вообще отсутствуют. Сдвоенная ревакцинация или многократные инъекции антигена угнетают образование антител и плазмоцитарную реакцию.

Плазматические клетки являются основными продуцентами гуморальных антител. Антитела начинают синтезироваться уже в плазмобластах, характеризующихся также интенсивным синтезом РНК. Полагают, однако, что из плазмобластов антитела не секретируются или секретируются в небольших количествах. В юной и зрелой плазматических клетках происходит выраженный синтез иммуноглобулина. В зрелых клетках синтез РНК отсутствует (у некоторых животных и человека он происходит), а антитела быстро секретируются клеткой, в некоторых клетках они накапливаются. Антителообразующую способность плазматических клеток установили методом флуоресцирующего антитела, локального гемолиза в агаре, культивирования *in vitro*

и *in vivo* тканей и клеток, при помощи изолированных клеток, диффузионных камер и т. д. Появление и динамика плазматических клеток различны в условиях первичного и повторного антигенного стимула. При первичном иммунологическом ответе в регионарных лимфатических узлах антителообразующие клетки появляются на четвертый день после введения антигена. Через две недели они в основном отсутствуют. При повторном ответе уже через 48 часов регистрируют большое количество клеток, на четвертый день их максимальное количество; причем они могут составлять до 50% плазматических клеток, из которых 75% — незрелые клетки. Через неделю клеточная реакция значительно ослабевает. Количество образуемых плазматических клеток зависит от вида антигена, его количества, места введения, вида животного.

Гистогенез плазматической клетки, как уже говорилось, начинается с плазмобластов, появляющихся через несколько дней после иммунизации. Митотический цикл этих клеток составляет 8—12 часов. Предполагают, что они делятся 3—6 раз, давая 64 плазмобласта. Следующая стадия — юной плазматической клетки, которая длится, по-видимому, 18—24 часа, в течение которых совершается 2—4 митоза. Юные клетки далее трансформируются в зрелые; их жизненный цикл — около 8—48 часов; однако имеются сведения, что некоторые из них живут 2—10 дней и даже шесть месяцев. Клетки эти не делятся. Таким образом, зрелая плазматическая клетка образуется после 8—9 митозов предшествующих ей клеток, а одна клетка-предшественник может дать до 1000 потомков. По предположительным подсчетам, одна плазматическая клетка могла бы продуцировать 6×10^{-9} мг антител, выдавая в секунду около 1000—1500 молекул антител (некоторые допускают меньшие цифры), а 1 г лимфоидной ткани *in vivo* в сутки около 10 мг антител; одна зрелая плазматическая клетка содержит около $1,25 \times 10^{-13}$ антител.

Плазматические клетки выделяют иммунные гамма-глобулины тремя способами. При мерокриновом способе некоторые эргастоплазматические мешочки, содержащие антитела, на периферии цитоплазмы клетки вскрываются, а их содержимое изливается в межклеточную среду; при голокриновом клетки распадаются, эргастоплазматические мешочки рассеиваются в межклеточной среде и лопаются; при апокриновом распадается периферическая часть клетки, центральная ее часть с ядром сохраняется и, возможно, продолжает жить.

Вопрос о возможности синтеза плазматическими клетками (помимо иммунного) неиммунного («нормального», то есть вообще не антительного) гамма-глобулина является дискуссионным и нерешенным. Наряду с сообщениями о строгой корреляции между синтезом антител и плазматической реакцией имеются сведения об отсутствии такой корреляции. По этой причине тотальная реакция, по-видимому, не может быть абсолютным индикатором иммунологического процесса, хотя нельзя исключить возникновения аутоиммунных реакций при плазматизации, индуцируемой неантигенными веществами. В то же время доказано, что большая часть плазматических глобулинопроду-

цирующих клеток после иммунизации синтезирует гаммаглобулин, не являющийся антителами по отношению к использованному антигену. Однако он может обладать другой специфичностью.

В вопросе о клетках-предшественниках, который является чрезвычайно важным и сложным, несмотря на то, что уже накоплено значительное количество экспериментальных данных, пока приходится оперировать в основном предположениями.

В соответствии с современными представлениями кроветворная и лимфоидная ткань имеет общую стволовую клетку (S-клетку). Она дает начало всем дифференцировкам кроветворной и лимфоидной ткани. Эти клетки постоянно пополняют детерминированные пролиферативные пулы (совокупность определенных клеток). Кроме пула этих мультитипотентных стволовых клеток, в организме существует несколько других пулов «полустволовых клеток», чувствительных к различным индукторам (антигенам, эритропоэтину и т. д.), то есть детерминированных к определенному типу дифференцировки; в свою очередь, S-клетки «ощущают» лишь объем собственного пула клеток (Фриденштейн, Чертков). Стволовые клетки (S) в основном происходят из костного мозга. Ориентировочно их количество составляет одну клетку на 10 000 кариоцитов костного мозга. В селезенке и крови их меньше соответственно в 10 и 100 раз. Стволовые клетки подвержены постоянной миграции. Они выходят из костного мозга в кровотоки и колонизируют различные органы и ткани, широко распределяясь в организме и обеспечивая его кроветворную и иммунологическую функции. В последнем случае они колонизируют лимфоузлы. У мышей ежедневно в циркуляцию поступает около 200 стволовых клеток, а в сутки, следовательно, до 2% всего пула стволовых клеток костного мозга. Скорость миграции в кровотоки стволовых клеток может изменяться под влиянием различных факторов. Например, их количество значительно увеличивается после инокуляции животным эндотоксинов, вакцин, митогенетических веществ (фитогемагглютинина и др.). Оно также является очень высоким у мышей в ранний постнатальный период по сравнению с взрослыми особями.

S-клетки (возможно, малые лимфоциты костного мозга) под влиянием гормона тимуса (см. ниже) превращаются в полустволовую антигенчувствительную (некоммитированную) X-клетку, которая является общей для всех плазматических клеток и не имеет иммунологической специфичности. Полагают, что у взрослой мыши пул таких клеток может состоять из 10—700; с возрастом их количество уменьшается в четыре раза. Очевидно, пул X-клеток, с одной стороны, самоподдерживается, с другой — пополняется за счет S-клеток. Существует предположение, что S-клетки переходят в X-клетку через промежуточную стадию SS-клетки.

В конечном итоге из X-клеток под влиянием антигена возникает три типа клеток: Z_1 — плазматические клетки, образующие гуморальные антитела; Z_2 — клетки — малые лимфоциты, обладающие структурными антителами и осуществляющие трансплантационный иммунитет и замедленную гиперчувствительность; Y — малые лимфоциты —

клетки памяти. Эти (Y) коммитированные клетки являются в то же время клетками-предшественниками антителообразующих плазматических клеток или иммунных лимфоцитов (Z), возникающих после повторной встречи с антигеном. Количество Y-клеток нарастает в первые 10—20 дней после первичной иммунизации, несколько месяцев поддерживается на определенном уровне, а далее медленно уменьшается. Состояние иммунологической памяти может сохраняться очень длительное время. X- и Y-клетки не идентичны, последних в 10—100 раз больше. Предполагают, что в среднем на селезенку они могут составить 10^3 — 10^4 , созревают они, по-видимому, во вторичных фолликулах. Наиболее распространенная схема гистогенеза антителообразующей клетки следующая: X — Y — Z. Однако некоторые исследователи не исключают возможности наряду с трансформацией X-клетки в Y, ее трансформации в Z. Имеются также сведения, что потенциальным источником клеток памяти могут оказаться Z_2 -клетки. Если в течение определенного периода Z_2 -клетка не встречается со своим антигеном, который в таком случае вызывает ее «аллергическую» гибель, она превращается в Y-клетку.

Появляется все больше сведений, что представленная выше схема клеточных событий иммуногенеза S—SS—X—Y—Z осуществляется только в условиях взаимодействия различных типов клеток. Многими учеными существование взаимодействия в системах макрофаг — лимфоцит (см. ниже) и лимфоцит — стволовая клетка считается доказанным. Предполагают взаимодействие в системах: макрофаг — антиген-реактивный лимфоцит — лимфоцит, активированный антигеном, или макрофаг — лимфоцит, активированный антигеном, — стволовая клетка.

Лимфоциты составляют основную клеточную массу лимфоидных органов, а у человека и многих млекопитающих более 95% клеток лимфы. Происхождение лимфоцитов двойное — мезенхимальное и эпителиальное. Предполагают также, что некоторые ретикулярные клетки реутилизируют продукты распада лимфоцитов и, ассимилируя их ядерную кислоту, дифференцируются в лимфоциты, или такая трансформация ретикулярных клеток происходит под прямым влиянием антигена. Морфологически различают три типа лимфоцитов: 1) малые лимфоциты — диаметр 8μ и меньше, ядро с глыбками хроматина, иногда в виде спиц колеса, цитоплазма гомогенна, слабо пиронинофильна или пиронинонегативна, рибосом мало; 2) средние лимфоциты — диаметр 8—12 μ, в ядре плотный хроматин, но не в виде спиц колеса, пиронинофилия отсутствует или очень слабая, рибосом мало; 3) большие лимфоциты — светлое большое ядро с зернышками хроматина и ядрышками, более пиронинофильная цитоплазма, чем у предыдущих форм, рибосомы многочисленны (некоторые исследователи называют большой лимфоцит лимфобластом). Принято считать, что ретикулярные клетки могут трансформироваться в большой лимфоцит. Последний через стадию среднего дифференцируется в малый. Эргастоплазма у малого лимфоцита развита незначительно.

Реакция на антиген. Введение антигенов в организм также сопровождается значительной пролиферацией лимфоцитов.

Введение последних толерантным к белку животным могло разрушить толерантность или нормализовать иммуногенез у животных со значительным искусственным дефицитом лимфоцитов. Считается, что продукция лимфоцитами гуморальных антител по сравнению с плазматическими клетками незначительна. Это подтверждает уже упомянутое рудиментарное развитие у них эргастоплазмы.

Лимфоциты принимают основное участие в формировании трансплантационного иммунитета и реакции трансплантат против хозяина. Они осуществляют замедленную гиперчувствительность. Все эти состояния пассивно переносятся лимфоцитами. Они, вероятно, содержат клеточные (структурные) антитела, или «фактор переноса».

Лимфоциты постоянно рециркулируют в организме. Принимая в среднем продолжительность их жизни равной 100 дням (существуют короткоживущие — около 2 дней и долгоживущие — до нескольких лет) (Л. Н. Фонталин), можно легко рассчитать, что они рециркулируют из крови в органы и, наоборот, десятки и сотни раз на протяжении своей индивидуальной жизни. Направление рециркуляции таково: кровь — лимфоузлы — лимфа — кровь. Процесс миграции имеет большое иммунологическое значение в смысле осуществления иммунологической реакции при появлении антигенов «вдали» от лимфоузлов (трансплантат, опухоль, мутировавшие клетки); при репопуляции иммунокомпетентными клетками лимфоидных органов, трансформации их там в антителосинтезирующие и обеспечения таким образом генерализованного иммунного ответа; поддержания определенных клеточных соотношений в популяции и т. д. Помимо рециркуляции, лимфоциты постоянно создаются в организме, то есть популяция подвергается обновлению.

Полагают, что важнейшей функцией лимфоцитов является их трансформация в антителосинтезирующие клетки и длительное сохранение иммунологической памяти. Очевидно, малый лимфоцит является не только терминальной стадией клеточного цикла, но клеткой, обладающей мультипотентными свойствами. Можно предположить две возможности: а) либо лимфоцит мультипотентен и под влиянием различных факторов может трансформироваться в разные клетки; б) либо существует популяция малых лимфоцитов, которая мозаична, и каждый ее член дифференцируется в определенном направлении. Действительно, морфологически однородная популяция малых лимфоцитов может оказаться функционально неоднородной, поскольку часть лимфоцитов, по-видимому, имеет энтодермальное, а часть мезодермальное происхождение.

Считают, что долгоживущие малые лимфоциты составляют основу длительного иммунитета. В соответствии с этой гипотезой негенетические изменения, индуцированные антигеном, могут персистировать в этих клетках до вторичной иммунной реакции, и являются выражением эпигенетической наследственности. При ревакцинации лимфоциты превращаются в плазматические клетки.

Лимфоциты могут непосредственно взаимодействовать с антигеном. Прямой контакт малых лимфоцитов с чужеродной тканью вызы-

вает их превращение в бластоидную клетку, которая затем дает вновь малые лимфоциты, иммунные к тестируемой ткани. В настоящее время появились сообщения, свидетельствующие о взаимодействии в иммуногенезе лимфоцитов (контактировавших с антигеном) с клетками-предшественниками (стволовыми клетками). Лимфоциты, активированные антигеном, индуцировали кроветворные клетки-предшественники к дифференцировке в антителообразующие. Как полагают, такой способностью обладают так называемые антиген-реактивные лимфоциты, образующиеся под влиянием тимуса. Наконец, нельзя исключить трефоцитарную функцию лимфоцитов (trepho — я кормлю), представляющую собой реутилизацию продуктов их дегенерации различными клетками. Они специализированы на транспорт и синтез нуклеопротеина, который используется для формирования новых клеток.

Ретикулярные клетки составляют строму костного мозга, лимфатических узлов, селезенки. Происхождение их с достоверностью не установлено. Полагают, что они могут происходить из мезенхимных клеток эмбриона.

Ретикулярные клетки имеют многочисленные отростки, отчего в лимфатических органах образуют сетчатый остов. Однако истинной синцитиальной связи между ними не существует, так как клетки друг с другом не сливаются. Они лишь контактируют между собой. Как правило, форма клеток неправильная, с цитоплазматическими выступами. Сами клетки крупные, ядро большое (около $8 \times 5 \mu$), неправильной формы. Обычно после окрашивания цитоплазма и ядро довольно светлые. В цитоплазме немного эргастоплазматических мешочков. Имеются свободные рибосомы.

Реакции на антиген. Под влиянием антигенного раздражения ретикулярные клетки начинают пролиферировать и трансформироваться в другие клеточные типы. Предполагают, что ретикулярные клетки дифференцируются по линии: ретикулярная клетка — гемоцитобласт (плазмобласт) — юная плазматическая клетка — зрелая плазматическая клетка; или они трансформируются в большой лимфоцит. Кроме того, ретикулярные клетки могут дифференцироваться в гистициты и макрофаги.

Важнейшая функция ретикулярных клеток — фагоцитоз (и пиноцитоз). Причем (по мнению некоторых авторов) антиген может фагоцитироваться этими клетками, а затем в определенном виде передаваться плазматическим или лимфатическим клеткам, которые дифференцируются в плазматические, или ретикулярные клетки могут удалять избыток антигена, блокирующий функцию антителообразующих клеток.

Макрофаги — клетки, способные к фагоцитированию и деградации частиц, а также к пиноцитозу. Различают оседлые и свободные макрофаги. Оседлые макрофаги находятся в интенсивно кровоснабжаемых областях, в строме и капсуле органов и т. д. При воздействии различных стимулов или воспалении отмечают интенсивное локальное скопление свободных макрофагов. Свободные макрофаги возникают из адвентициальных клеток, моноцитов, оседлых макрофагов и,

возможно, из лимфоцитов. Последнее подтверждается трансформацией лимфоцитов в макрофаги при их культивировании в диффузионных камерах. Макрофаги таким образом достаточно быстро могут достичь до 40% всей культивируемой клеточной популяции. Форма оседлых макрофагов может быть вытянутой, округлой, неправильной. Размеры их непостоянны. Цитоплазма базофильна, богата клеточными органеллами, ядра небольшие, темные, варибельной формы. Свободные макрофаги — также неправильной формы, с эксцентрично расположенным ядром, вакуолизированной цитоплазмой. Их размеры подвержены значительным колебаниям.

Реакция на антиген. В ответ на антигенное воздействие или инфицирование микробами в макрофагах увеличивается синтез ДНК и содержание белка, сами клетки скапливаются в определенных областях, фагоцитируют антиген. Не вызывает сомнений важность факта фагоцитоза антигена как первого этапа антителогенеза. Под влиянием фагоцита происходит ассимиляция молекулы антигена и ее переработка. По-видимому, она расщепляется на фрагменты и информация в той или иной форме передается клеткам-предшественникам. В пользу этого предположения говорит образование в лимфоузлах, селезенке, тимусе, костном мозге, крови скоплений лимфоцитов и плазматических клеток вокруг макрофага и обнаруженные исследователями цитоплазматические мостики между макрофагом и клеткой, через которые, вероятно, может происходить обмен субстанцией. Лимфоциты контактируют с макрофагом своими отростками, которые проникают внутрь фагоцитирующей клетки. Контакт продолжается всего несколько десятков минут, после чего лимфоциты изолируются и в дальнейшем подвергаются трансформации. Способность к передаче информации от макрофага клеткам более чувствительна к радиации, чем фагоцитирование антигена.

Чрезвычайный интерес представляют следующие наблюдения. Было установлено, что внесение в культуру интактных лимфоидных клеток РНК макрофагов, кратковременно контактировавших с фагом, вызывает появление фаgoneйтрализующей активности. Оказалось, что после такого кратковременного контакта антигены (головки, хвоста; внутренние протенны) фага встраиваются в РНК макрофага. Комплексообразование антигенов с РНК установлено и в отношении гемоцианина и т. д. Каким образом индуцируется синтез антител, сейчас неизвестно, но, очевидно, присутствие антигена в РНК служит источником информации для этой индукции. Такие препараты РНК обладают большей иммуногенностью, чем то же количество исходного неизмененного антигена. При небольших иммунизирующих дозах исходного антигена препараты РНК (комплекс с антигеном) вызывают образование 19S антител, увеличение доз сопровождается синтезом и 7S антител. Приведенные данные прямо свидетельствуют о непосредственном участии макрофагов в иммуногенезе. Как далее ассимилируется антиген, сшитый с РНК макрофага? Возможно, он принимается лимфоцитами, которые, подвергаясь серии трансформаций, в конечном итоге дают плазматические клетки.

Эозинофилы. Относятся ли эозинофилы к группе иммунокомпетентных клеток, пока еще не ясно. Однако несомненно их участие в иммунологических реакциях организма. Эозинофилы представляют собой округлые клетки (диаметр около 9μ) с темным, как правило, двухсегментарным ядром и цитоплазмой, содержащей крупные зерна, окрашивающиеся кислыми красками. Зерна эозинофилов липидно-белковой природы, содержат железо и фосфор.

Реакция на антиген. Иммунизация различными растворимыми и корпускулярными антигенами, некоторые состояния аллергии, гомотрансплантация тканей, гельминтозы и микозные инфекции сопровождаются существенной эозинофилией. При инокуляции ряда антигенов эозинофилы скапливаются в регионарном лимфоузле, достигая максимума через 12 часов после иммунизации. С другой стороны, введение массивных доз кортизона и облучение, ингибирующие синтез антител, тормозят местную аккумуляцию эозинофилов после инъекции антигена. Некоторым исследователям удалось обнаружить в эозинофилах иммунизированных животных комплексы антиген — антитело или захватывание макрофагами эозинофилов, поглотивших антиген. Эти наблюдения позволили предположить возможное посредничество эозинофилов между введенными антигенами и макрофагами, поглощающими их, и, таким образом, участие эозинофилов в иммунологических реакциях. Однако иммунная функция эозинофилов в настоящее время неизвестна. Кроме того, эозинофилы считаются носителями гистамина, который они воспринимают и инактивируют после его высвобождения при конфликте антиген — антитело. Антигистаминные препараты блокируют эозинофилию, индуцированную антигеном.

Тучные клетки, по всей видимости, также не являются иммунологически компетентными клетками, однако в осуществлении аллергических реакций им косвенно принадлежит существенная роль. Возникают тучные клетки гомопластически, предполагают их гетеропластическое происхождение из лейкоцитов, макрофагов и др. Этих клеток много в матке, тимусе, языке, желудочно-кишечном тракте, по ходу мелких кровеносных и лимфатических сосудов. Данные клетки овальные или неправильной формы, размеры $22 \times 3,5-14 \mu$. Имеют небольшое овальное ядро, богатое хроматином. В цитоплазме содержатся гранулы, метахроматически окрашивающиеся анилиновыми красками.

Тучные клетки — один из главных резервуаров гистамина. В одной тучной клетке собаки находится 7 мкг (микромикрограммов) гистамина. При уменьшении количества тучных клеток снижается и содержание гистамина и, наоборот, в тучноклеточных опухолях его очень много.

Кроме гистамина, эти клетки содержат гепарин, серотонин, 5-окситриптамиин, ферменты и т. д.

Реакция на антиген. Важнейшее свойство тучных клеток — высвобождение активных веществ, в том числе гистамина, при соединении антиген — антитело. Отсюда ясна их роль в развитии аллергических реакций. По всей видимости, в сыворотке животных

с состоянием гиперчувствительности находятся антитела, сенсibiliзирующие тучные клетки и соединяющиеся с ними. Их удалось выявить при иммунизации альбуминами и глобулинами. Пассивная сенсibiliзация тучных клеток этими и другими различными антителами и добавление соответствующих антигенов вызывают дегрануляцию клеток и высвобождение гистамина. У сенсibiliзированных животных антитела тесно связаны с плазматической оболочкой тучных клеток, поскольку многократное отмывание не снимает с последних способности дегранулироваться и выделять гистамин при контакте с антигеном.

Тучные клетки играют важнейшую роль в развитии острого аллергического приступа. Выделяя при дегрануляции гистамин, они являются непосредственной причиной местного расширения сосудов, отека, зуда, констрикции гладких мышц, гипотонии и коллапса, наблюдаемых в тяжелых случаях анафилаксии. Введение препаратов, уменьшающих количество тучных клеток, могло полностью ингибировать развитие аллергической реакции. Высвобождение гистамина из тучных клеток происходит в результате сложной цепи ферментативных процессов, так как оно может предотвращаться ингибиторами ферментов. После выделения гистамина нужен весьма длительный срок для его восстановления. Например, период накопления половины количества гистамина в тучных клетках приблизительно равен 50 дням.

Наконец, при иммунизации некоторыми антигенами обнаружена в регионарных лимфоузлах пролиферация тучных клеток. Некоторые исследователи сообщают о большой роли тучных клеток в возникновении язвенного колита и паразитарных заболеваний. Описано появление тучных клеток, содержащих антиген, спустя длительное время после иммунизации.

Тимус (вилочковая железа) — лимфо-эпителиальный орган. Из всех лимфатических органов в нем раньше всего развивается лимфатическая ткань, от него зависит развитие лимфатической системы у новорожденных. Наибольшую функциональную активность железа проявляет в эмбриональном периоде и в молодом возрасте. С наступлением зрелости эта активность резко снижается, хотя у некоторых животных регистрируется долго.

Иммунологическая функция тимуса у новорожденных. Первое сообщение об участии тимуса в иммунологических процессах появилось около 30 лет назад. Всестороннее изучение роли тимуса началось только с 1961 г. (Миллер). При неонатальной тимэктомии у животных наблюдается потеря в весе, истощение, вялость, взъерошивание шерсти, диарея, истончение костей, атрофия лимфоидных органов с резким уменьшением количества лимфоцитов (особенно малых) в тканях и крови (на 60%). Характерно, что тимэктомированные мыши, например, резистентны к заражению вирусом лимфоцитарного хориоменингита при 100% восприимчивости в норме; вирус мышинного лейкоза Гросса также не вызывает у них заболевания.

Симптомы истощающего заболевания появляются через 20—25 дней после тимэктомии, через 1—2 и более месяцев животные погибают. Одновременно с этим у них значительно снижается резистентность к различным инфекциям и резко подавляется или полностью блокируется иммунологический ответ на бактериальные и небактериальные антигены, на пересадку тканей, замедленная гиперчувствительность, повышается восприимчивость к канцерогенным агентам за счет подавления реакции на противоопухолевые антигены. Если тимэктомию проводить в несколько более поздние сроки (на 3—5-й день), ингибирующий эффект ослабевает. Причины истощающего заболевания еще не установлены. Одно из предположений заключается в том, что у тимэктомированных животных лимфоидная ткань быстро истощается антигенным раздражением, вызванным банальной микрофлорой.

Неонатальная трансплантация ткани тимуса новорожденных тимэктомированным животным восстанавливает у них иммунологическую компетентность и предотвращает развитие патологических симптомов.

У птиц, кроме тимуса, имеется аналогичный лимфо-эпителиальный орган — фабрициева сумка. Считают, что именно она обеспечивает образование гуморальных антител, а тимус — трансплантационный иммунитет. Существуют сообщения, что у млекопитающих аналогом фабрициевой сумки могли бы быть миндалины, аппендикс, пейеровы бляшки и др. (Фриденштейн и Чертков, 1969).

Существует ряд гипотез о механизме кардинального влияния тимуса.

1. Тимоциты (лимфоциты тимуса) мигрируют и репопулируют продуцирующие антитела органы, где дифференцируются в иммунологически компетентные клетки.

2. В тимус мигрируют интактные клетки и подвергаются «обучению» по программе иммунологической компетенции, или мигрировавшие тимоциты осуществляют «обучение» лимфоцитов прямо на месте. Предполагают, что клетками, репопулирующими тимус и «обучающимися» иммунокомпетенции, являются мультипотентные стволовые костномозговые клетки.

3. В тимусе происходит формирование клонов лимфоидных клеток с различными иммунологическими функциями и даже элиминация или угнетение клонов лимфоидных клеток, способных реагировать против антигенов собственного тела. Отсюда, возможное участие тимуса в возникновении аутоиммунных заболеваний может состоять в образовании «запрещенных» клонов лимфоидных клеток, обладающих иммунологической реактивностью против собственных тканей. Эти клетки надежно защищены в тимусе от влияния антигенов, поскольку гематотимический барьер непроходим для них. Выходя из тимуса, они мигрируют в лимфоидные органы, где осуществляют свои функции.

4. Тимус способствует приобретению иммунологической компетентности клетками лимфоидных органов посредством выделения гуморального фактора, природа которого пока неизвестна. Образование гуморального фактора клетками тимуса доказано имплантацией его в диффузионных камерах неонатально тимэктомированным животным, у которых не развивалось патологических симптомов. Полагают, что этот фактор образуется эпителиально-ретикулярными элементами тимуса. Предполагают также, что ретикулярная строма тимуса обладает одновременно двойным эффектом: вызывает пролиферацию лимфоидных клеток и их трансформации, а в пределах самого тимуса препятствует иммунологическому реагированию компетентных клеток на антиген.

Иммунологическая функция тимуса у взрослых. По всей видимости, свое влияние на лимфоидную си-

стему и иммунологическую компетенцию клеток тимус осуществляет не только в самом раннем периоде, но и в течение взрослой жизни. Эффект тимэктомии взрослых сказывается не сразу, как у неонатально оперированных, а начинает проявляться через длительный интервал, порядка 9—18 месяцев.

У животных отмечают некоторое уменьшение количества лимфоцитов в крови, лимфатическом грудном протоке, лимфатических узлах и селезенке. В селезенке, например, регистрируется уменьшение герминальных центров, числа пиронинофильных митозирующих клеток. Антительный ответ подавляется не резко, с колеблющейся интенсивностью у различных животных. В одном из опытов на мышях, тимэктомированных в 6-недельном возрасте, через 18 месяцев 50% животных не реагировали на иммунизацию эритроцитами; у них же способность лимфоидных клеток давать реакцию трансплантат против хозяина позже 25 недель падала до 15% от контроля.

Тимэктомия зрелых животных препятствовала восстановлению реактивности после иммунологического паралича, а у толерантных появлению реактивности к соответствующему антигену. В селезенке тимэктомированных животных через девять месяцев уменьшалось количество антителообразующих клеток. Присутствие тимуса также необходимо для восстановления иммунологической реактивности после ее подавления облучением рентгеновскими лучами. Все это свидетельствует, что тимус и в период взрослой жизни оказывает стимулирующее влияние на продукцию иммунокомпетентных клеток и поддерживает их число в организме.

Предполагают, что лимфоидная ткань у взрослых не может долго сохраняться в отсутствие тимуса, а он выполняет роль места, где продуцируются иммунологически компетентные клетки, постоянно перемещающиеся в периферические органы. По этим причинам тимэктомия у взрослых не оказывает немедленного эффекта, так как адекватный пул компетентных клеток уже создан. И только когда пул обедняется вследствие лимитированности жизни этих клеток, иммунологические дефекты становятся очевидными при введении новых антигенов.

Глава 18. СОЕДИНЕНИЕ АНТИГЕНА С АНТИТЕЛОМ

Антигены и антитела взаимодействуют друг с другом, как целые молекулы, не утрачивая присущей антигенам шарообразной формы, а антителам — формы вытянутых эллипсоидов. Антитела не обволакивают антиген многослойной пленкой, как думали раньше. Точно установлено, что на одну молекулу антигена приходится значительное количество молекул антител и они создают не пленку, а слой толщиной до 30 Å. Реакция антиген — антитело не завершается их распадом или отщеплением каких-либо продуктов. Более того, весьма давно известно, что комплекс токсин — антитоксин разъединим и завершается он высвобождением неразрушенного токсина и активных антител. Неизмененные антитела выделялись и из других комплексов антиген — антитело. Антитела не проникают внутрь бактерий и животных клеток.

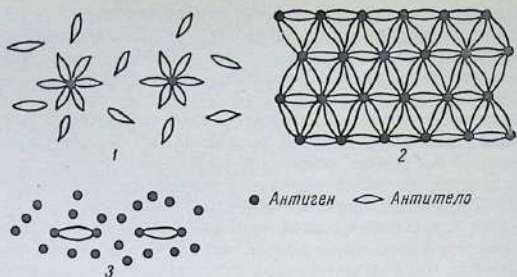


Рис. 66. Характер агрегатов (по Кузину):

1 — при избытке антитела; 2 — при оптимальном соотношении антигена и антитела; 3 — при избытке антигена.

Они вступают в реакцию с их поверхностными детерминантами. Связь эта хотя и прочна, тем не менее обратима.

В реакциях антиген — антитело *in vitro* по меньшей мере две фазы.

Первая фаза специфическая, невидимая, характеризуется адсорбцией антител на поверхности антигена или гаптена. При 37° она протекает довольно быстро, в течение нескольких минут; у криофильных антител — при $+5^\circ$. Вторая фаза неспецифическая, видимая, завершается феноменом агглютинации, преципитации или лизиса. В этой фазе часто необходимо присутствие электролитов (NaCl или MgCl_2), а в некоторых случаях и комплемента.

Реакция антиген — антитело. Антигены в большинстве случаев представляют собой объемные молекулы, антитела объемны все без исключения. Это обстоятельство дало основание Грабару (1963) высказать идею о реципрокной поливалентности антигенов и антител или о наличии у них многих комплементарных точек взаимной связи. В сущности, многовалентность антигенов и двухвалентность антител была установлена раньше.

Отсюда следовало, что взаимодействие антигена с антителом возможно в различных соотношениях, в любых пропорциях. Эксперименты показали, что это действительно так. Однако избыток или недостаток одного из компонентов реакции неизбежно ведет к ее слабому проявлению, к образованию предзон и постзон. В пункте между ними неизбежны эквивалентные отношения реагирующих молекул или корпускул антигена с антителом, и реакция в этой «центральной» зоне выражена особенно четко. Это явление хорошо понятно из рисунка 66, иллюстрирующего теорию «решетки» или «фермы», предложенную Мерреком, Полингом, Гейдельбергером, Гукером, Бойдом и в СССР А. М. Кузиным.

Рассуждения касаются реакции преципитации, в которой условно участвуют шестивалентный антиген и двухвалентные антитела. При

избытке антител (1) или антигена (3) макроагрегата из комплекса антиген — антитело не происходит, и реакция преципитации не визуальна или едва различима; при оптимальных концентрациях антигена и антител все их валентности поглощены, макроагрегат образовался, выпал в осадок и хорошо виден (2) в форме белкового преципитата. В случае одновалентных антител (условно одновалентных, см. выше) макроагрегата не получается. Для их выявления пользуются методикой Кумбса. Одновалентные антитела регистрируются довольно часто. Они найдены против многих бактерий, против эритроцитов и других клеток.

Реагирующими группами у антигена являются его детерминанты — концевые (полярные) химические группы, несущие определенный заряд и располагающиеся на поверхности антигена в форме определенного пространственного рисунка, скажем такого:

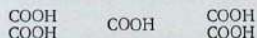


Антидетерминанты антитела, специфического к данному антигену, несут комплементарные N-концевые, противоположно заряженные группы тождественного пространственного рисунка:



При этих условиях рисунок детерминант (COOH) антигена точно совпадает с антидетерминантами антитела (NH₂) во всех пяти точках, а противоположные заряды обеспечат притяжение и сцепление их. Реакция будет высокоспецифичной, а комплекс антиген — антитело прочным.

Если детерминанты антигена имели такой рисунок



то соединение с антигеном произошло бы в одной центральной точке, реакция оказалась бы слабой, недостаточно специфичной, а комплекс непрочным. Следовательно, специфичность реакции антиген — антитело зависит не только от наличия детерминант у антигена и комплементарных антидетерминант у антитела (иммуноглобулина), но и от их тождественного пространственного рисунка.

Соединение антигена с антителом обеспечивается силами: противоположных зарядов — силами ионной реакции, вандерваальсовыми силами и водородными мостиками или межатомными ковалентными связями. Хотя каждая из этих сил слабая, вместе они довольно прочно удерживают агрегат молекул антиген — антитело. Однако, как еще в 30-х годах указывал Ландштейнер, могут быть соединения антигена с антителами и без образования ковалентных связей. Бойд (1969) указывает, что в серологических реакциях некоторую роль играют следующие взаимодействия: диполь — диполь и диполь — ион по

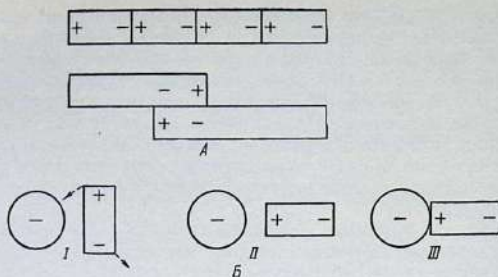
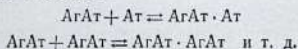


Рис. 67. Взаимодействия диполь — диполь (А) и диполь — ион (Б) и их роль при реакции антиген — антитело; I—III — этапы взаимодействия.

схеме (рис. 67). Что касается вандерваальсовых сил, то они ничтожно малы. И их сила с увеличением расстояния между молекулами уменьшается обратно пропорционально седьмой степени этого расстояния.

Водородные связи вступают в силу в тех случаях, когда атом водорода будет взаимодействовать с двумя другими атомами. Связи эти в большинстве случаев, особенно вскоре после образования комплекса, обратимы. Разъединение токсина с антитоксином наблюдают при разведении нейтрального комплекса изотоническим раствором NaCl в 100 раз. Получающийся продукт оказывается токсичным. Диссоциация достигается также применением концентрированных растворов солей, большого сдвига pH и другими методами. Тот факт, что для разведения комплекса антиген — антитело требуются разные условия и способы, в свою очередь, свидетельствует о том, что характер связей и химические группы, участвующие в процессе соединения антигена с антителом, разные.

Гейдельбергер и Кеиделл (1935—1937) нашли, что количественные отношения антигена (Ag) и антитела (At) в преципитате пропорциональны количеству реагирующих веществ в реакции: $Ag + At = AgAt$. Далее образующиеся комплексы антиген — антитело реагируют друг с другом и со свободными антителами, пока не образуется макроагрегат и он не выпадет в осадок:



Изложенные представления вызвали ряд существенных возражений со стороны иммунологов. Считают, в частности, что в образовании макроагрегата участвуют неспецифические факторы, что при избытке антител все детерминанты антигена будут заполнены антителами и у антигена не будет свободных связей для образования агрегата. Вместе с тем в реакции дифтерийный токсин — антитоксин взгляды Гейдельбергера получили подтверждение.

В последние годы найдены достоверные данные, свидетельствующие о преобладании антител в комплексах антиген — антитело.

Между полными и неполными антигенами, с одной стороны, полными и неполными антителами, с другой — возможны четыре варианта реакций.

1. Полный антиген + полное антитело → образование макроагрегата. Реакция визуальна.

2. Полный антиген + неполное (блокирующее) антитело → отсутствие образования макроагрегата. Реакция невидима. Валентности антигена блокированы одновалентными антителами, и поэтому антиген не может реагировать с полными антителами. Происшедшее соединение неполных антител с антигеном можно обнаружить косвенно непрямой реакцией Кумбса, с помощью антиглобулиновой сыворотки, полученной от животного, иммунизированного сывороткой (глобулинами) с одновалентными антителами. Против последних образуются двухвалентные антитела, они-то и сделают реакцию видимой (рис. 68).

Непрямая реакция Кумбса нашла широкое применение в серологической практике по обнаружению неполных антител и, в частности, при диагностике гемолитических анемий. Сущность реакции сводится к разведению сыворотки большого физиологическим раствором NaCl и к внесению в нее равного количества 5%-ной взвеси нечувствительных эритроцитов. Реакцию ставят в специальных маленьких пробирках. Смеси выдерживают при 37° в течение часа. Осевшие на дно, но не агглютинировавшиеся, эритроциты трижды отмывают физиологическим раствором и добавляют по капле в пробирку (или на предметное стекло) к капле разведенной антиглобулиновой сыворотки. Реакция наступает через 5—7 минут. Эритроциты, склеиваясь, образуют узорчатый осадок с зубчатым краем, видимый невооруженным глазом. Можно поставить и прямую реакцию Кумбса. Эритроциты большого троекратно отмывают от сыворотки физиологическим раствором NaCl, приготавливают 10—15%-ную взвесь их и вносят по одной капле в каплю разведенной антиглобулиновой сыворотки на предметное стекло. Остальное, как при непрямой реакции.

3. Неполный антиген + полное антитело → отсутствие образования макроагрегата. Реакция невидима. Блокированное антитело не реагирует с полным антигеном. И в этом случае возможно косвенное установление происшедшей реакции. Для этого следует неполный ан-

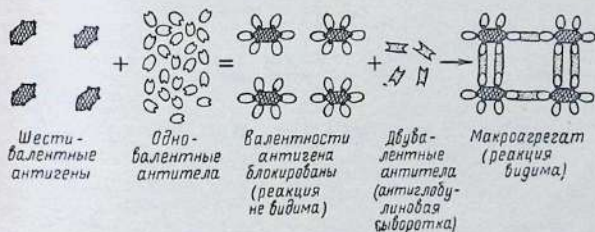


Рис. 68. Соединение полного антигена с неполным антителом и блокированного антигена с полным антителом.

тиген фиксировать (конъюгировать) на каком-либо носителе: эритроцитах, бактериях, частицах коллодия, латексе и др. После этого реакция агглютинации или «конъюгации» будет видимой (рис. 69).

4. Неполный антиген + неполное антитело → отсутствие образования макроагрегата. Но и здесь, применив методы 2 и 3 (тест Кумбса с конъюгированным антигеном), делают реакцию видимой (рис. 70).

Неполные антигены встречаются в природе довольно часто. Применяются и искусственные гаптены с различными исследовательскими целями. Неполные антитела обнаружены против эшерихий, бруцелл, сальмонелл и других микроорганизмов; против эритроцитов и иных клеток. Неполные антитела часто обладают высоким авидитетом. При наличии их в сыворотке больного, скажем, бруцеллезом и одновременно полных антител в ней, титр которых обычно выше титра неполных антител, возможен феномен зоны. В первых разведениях (в первых пробирках) неполные антитела в силу повышенной авидности блокируют антиген, и видимой реакции не будет — зона. В последующих разведениях неполные антитела исчезнут и реакция станет видимой за счет полных антител.

Видимость реакции агглютинации, преципитации или флокюляции, как правило, обязана образованию макроагрегата за счет комплексов антиген — антитело. Часто, или как правило, такой комплекс фикси-



Рис. 69. Соединение неполного антигена с полным антителом и конъюгированного антигена с полным антителом.



Рис. 70. Соединение неполного антигена с неполным антителом и конъюгированного антигена с антиглобулиновой сывороткой.

рует комплемент, что в ряде случаев ведет к лизису корпускул антигена — эритроцитов, бактерий, животных клеток. На этом основана диагностическая реакция связывания комплемента и другие феномены лизиса. Комплемент присоединяется к комплексу антиген — антитело, вероятно, с помощью электростатических сил.

Антигенные особенности комплекса антиген — антитело. Установлено, что в организме при взаимодействии антигена с антителом изменяется поверхностное строение обоих компонентов образующегося комплекса антиген — антитело. Этот последний становится для организма антигеном, и против него тоже вырабатываются антитела. Таким образом, при иммунизации возникают два рода антител: к неизменному антигену и против новых детерминантных групп антигена и антитела, составивших комплекс. Действительно, истощением сыворотки против комплекса антиген — антитело удалось доказать наличие антител, реагирующих только с антигеном, но не с комплексом антиген — антитело. Это первичные антитела, они образуются после однократного введения антигена. После трех инъекций антигена более 80% антител оказываются против комплекса и менее 20% — против антигена.

С помощью электрофореза удалось выделить фракцию антисыворотки, реагирующую только с комплексом. Поэтому образование антител против комплекса, наряду с антителами против неизменного антигена, следует считать доказанным. Далее было найдено, что среди антител против комплекса имеются антитела против антигенов, образованных с антигеном данный комплекс. Иначе говоря, появляются антиантитела, или аутологичные антиглобулиновые антитела. Из этой теории вытекает, что сами антитела и аутологичные комплексы также являются для организма антигенами и против них вырабатываются антитела.

Антисыворотка животного против аутологичных комплексов реагирует с данным комплексом и с изоэлогичным комплексом, содержащим тот же, но не другой антиген. Кроме того, в этих сыворотках содержалось значительное количество и анти-антител. Следовательно, при изменении аутологичного γ -глобулина он также становится антигеном для животного.

В итоге изменение поверхностной конфигурации антигена и антитела при образовании ими комплекса свидетельствует о неполной комплементарности антигена и антитела, иначе во вторичной и третичной структуре последнего изменений не было бы. Такая неполная комплементарность может создаваться за счет того, что антиген в организме подвергается фрагментации и комплексации. Образовавшиеся против него антитела будут к нему менее комплементарными. В результате образуются комплексы с измененной третичной структурой.

Так, при иммунизации кроликов и цыплят эритроцитами группы А образовывались антитела к этим эритроцитам и эритроцитам группы В и наоборот. Это потому, что в свете изложенного естественные изогемагглюлинины являются антителами к конформационным вариантам собственных мембранных антигенов клетки. Однако изучение комплекса из бычьего сывороточного альбумина (БСА) с кроличьей антисывороткой показало, что такой комплекс удаляется из циркулирующей крови быстрее обычного антигена (между 9—15-м днем). Вместе с тем при инъекции кролику избыточного количества БСА полученные комплексы удаляются не сразу. Выработанные антитела реагируют как со свободным антигеном, так и с ранее образованным комплексом антиген — антитело. В результате последнего появляются более крупные комплексы, возможно даже агрегаты. Как только они достигнут определенной величины, они начинают быстро удаляться из крови печенью, легкими и селезенкой, возможно, и фагоцитами крови.

Хенней с соавторами (1965) методом преципитации в геле доказали, что против комплекса бычий сывороточный альбумин — антитело образуются антитела только против комплекса в целом, но не против отдельных его компонентов — антигена и антитела.

Биологические эффекты реакции антиген — антитело могут быть для организма полезными, вредными и индифферентными.

Полезные эффекты. Гуморальные антитела против бактерий, вирусов и токсинов нейтрализуют возбудителей и их яды; агглютинируют бактерий, становящихся легкой добычей фагоцитов; преципитируют или флокулируют чужеродные белки и этим лишают их токсичности; с помощью комплемента лизируют трепонемы, лептоспиры*, животные клетки; нейтрализуют дифтерийный экзотоксин при реакции Шика и токсин стрептококков при реакции Диков; обеспечивают другие защитные феномены.

Вредные эффекты. Реакция антиген — антитело в инфицированном организме может стать причиной лихорадки, расстройства клеточной проницаемости, повреждения клеток, проницаемости сосудистых стенок, интоксикации, некроза ткани и т. д. Возможны также общие и местные повреждения организма, часто очень тяжелые. К последним относят гемолиз, наступающий при введении реципиенту несовместимых эритроцитов, анафилактический шок, реакцию типа крапивницы, сennую лихорадку, бронхиальную астму, аутоиммунные расстройства.

Из местных повреждений следует указать на отторжение несовместимого тканевого трансплантата организмом хозяина, феномен Артюса, кожные аллергические реакции замедленного типа, экземы и другие кожные аллергические процессы.

После анафилактической смерти комплексы антиген — антитело у морских свинок локализовались в интиме периартериальных и перибронхиальных венул; в некоторых случаях в венах и венулах альвеолярной паренхимы; в венулах артериальных и вальвулярных областей сердца, соединительнотканых структурах желудка, кишечника, печени, кожи, брюшной стенки, почечной лоханки. Их не было в клубочковых капиллярах почки. На месте осаждения комплексов образовывались очаги воспаления. Основная роль в последнем, как считают, принадлежит комплексу, адсорбирующемуся комплексу.

При ряде патологических состояний антитела появляются позже, чем формируется патология. Из этом основании Плецитый (1965) сделал вывод, что подобные антитела, образуя комплексы с аутоантигенами, не только не приносят вреда организму, но даже участвуют в автоматической регуляции патологических процессов: «образование в тканях антигенночуждых веществ вызывает продукцию антител. Нейтрализация, исчезновение их, приостанавливает процесс иммуногенеза».

В других исследованиях многие ученые находили нормальные естественные антитела к белкам и клеткам собственного организма, не приносящие ему вреда (и индифферентные эффекты). Холодовые агглютинины могли бы быть подобным примером. Однако при высоких титрах данных антител и при расширении диапазона оптимума температуры их действия они повреждают эритроциты, что ведет к тяжелому заболеванию. В ряде случаев, например, при различных заболеваниях печени обнаруживаемые аутоантитела оказывались не агрессивными, но их тщательное изучение показало их неспецифическое происхождение.

Глава 19. СТИМУЛЯЦИЯ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ И ИММУНИТЕТА

Стимуляторы и воздействия. Проблема неспецифической стимуляции иммунитета — один из интереснейших и важных научных аспектов современной иммунологии. Неспецифическими стимуляторами

* Лизис их происходит и без комплемента.

(адыювантами) являются вещества (в ряде случаев воздействия), которые вызывают усиление иммунологического ответа на антиген в нормальном здоровом организме или способствуют восстановлению поврежденного иммунологического ответа. Естественно, когда речь идет о воздействиях, их нельзя называть стимуляторами или адыювантами, а можно лишь говорить об их стимулирующем эффекте. Специфические адыюванты, которые обладали бы селективным стимулирующим эффектом по отношению к строго определенным антигенам, до настоящего времени еще не созданы. Все адыюванты неспецифичны, многогранны по механизму действия и неоднородны по интенсивности стимуляции, как при сравнении различных адыювантов, так и по действию их на различные антигены.

Наиболее интенсивно этот вопрос стал изучаться около 40 лет назад с того времени, как Рамон создал метод сорбированных антигенов. В качестве депонаторов применяли алюмокалиевые квасцы, хлористый кальций, фосфорнокислый алюминий, гидрат окиси алюминия, фосфат кальция, тапиоку, ланолин, холестерин, минеральное масло и т. д. Все эти вещества способствовали повышению образования антител в десятки, сотни и тысячи раз.

Адыюванты-комплексы. Наиболее сильный стимулятор антителиогенеза — адыювант Фройнда. Он состоит из арлацела А, парафинового масла и вакцины БЦЖ. Однако этот адыювант, обладая выраженным эффектом, не является безразличным для организма и в месте инокуляции вызывает настолько сильные морфологические изменения, что находит применение лишь в экспериментальной иммунологии. Все это ведет к изысканиям других подходящих стимуляторов. В частности, есть сообщения об использовании комплекса натрийальгината и кальцийглюконата. Правда, этот комплекс усиливал иммунологическую реакцию кроликов при иммунизации экстрактами пыльцы амброзии слабее, чем адыювант Фройнда, но зато он не обладал антигенными свойствами и не вызывал местной реакции при инъекции.

Предложен адыювант С-65. Он представляет собой стабильную эмульсию тех или иных антигенов в арахисовом масле, моностеарате алюминия и арлацела А. Как показали опыты на мышках, морских свинках, кроликах, обезьянах, С-65 менее токсичен, чем минеральное масло, и его применение безопасно. Введение С-65 не повышало кожной чувствительности вакцинированных к аллантоиновой жидкости куриных эмбрионов, а сыворотка не содержала комплементсвязывающих антител к ней.

Эндотоксины и полисахариды, выделенные из возбудителей чумы, бруцеллеза, шигелл, сальмонелл, эшерихий, риккетсий, стимулируют антителиогенез и иммуногенез в условиях первичного и повторного введения антигена. Так, полисахарид из *S. typhimurium* вызывал увеличение титра опсонинов и скорость фагоцитоза клетками РЭС, из *B. paracoli*, *S. abortus equi* — усиление пропердинообразования, титра лизоцима, функциональной активности РЭС.

В качестве стимулятора эффективным оказался зимозан. Одновременная иммунизация животных некоторыми антигенами вместе с этим препаратом сокращала индуктивный период антителиобразования, увеличивала циркуляцию антител в 2 раза, титры антител в 4 раза. Стимулирующим эффектом обладал и глюкан. Он вызывал гепато- и спленомегалию, ускорение элиминации из кровотока коллоидного красителя, резкое повышение образования антител к эритроцитам при первичном и повторном иммунологических ответах. Причем повышение фагоцитоза обуславливали цианистое, уксуснокислое, муравьинокислое производные глюкана.

Было обнаружено стимулирующий брюшнотифозные и дизентерийные агглютинины эффект хлебных дрожжей. При одновременном введении препарата из стенок дрожжевых клеток Restin и анатоксина отмечали сильную стимуляцию образования ботулинического антитоксина.

Предварительная инокуляция животным (до иммунизации тифозной вакциной) субстанции, полученной из чудесной палочки (продигиозан), стимулировала титры О- и Н-антител в 5 раз, а одновременное введение ее с человеческим гамма-глобулином — в 5—10 раз. Недавно создан препарат полидин Cantacuzino. Он состоит из

взвеси убитых нагреванием стрептококков, стафилококков, диплококков, пневмококков, кишечных бактерий (всего 13 штаммов) в изотоническом растворе с добавлением желчи и фенола и расщитан на усиление неспецифических защитных сил инфицированного организма. Препарат стимулирует титр агглютининов у брюшнотифозных и паратифозных бациллоносителей, повышает уровень пропердина; при иммунизации мышей коклюшной вакциной увеличивает образование антител, повышает опсонический индекс и фагоцитарную активность в отношении *V. pertussis*. Полидин не обладает пирогенными свойствами и хорошо переносится больными.

Полисахариды, выделенные из различных микроорганизмов, обладают еще одним свойством. При парентеральном профилактическом их введении у животных значительно усиливается неспецифическая антиинфекционная резистентность к широкому спектру патогенных микроорганизмов, которая сохраняется несколько дней, неспецифична и не зависит от антител.

Различные вакцины и микроорганизмы составляют целую группу неспецифических стимуляторов. В общем этот вопрос уже рассмотрен в главе 14 о механизме действия антигенов. Остается только добавить, что повышать образование антител могут и вирусные вакцины, например осенняя и др. Иммунизация вакциной БЦЖ мышей $\text{C} \times \text{C}57\text{B}1$ ускоряла режекцию кожных трансплантатов от самцов той же линии. Добавление бруцелл *in vitro* к культуре моноцитов в сыворотке «бежежированных» животных вызывало меньшую деструкцию клеток по сравнению с «неиммунными» — БЦЖ — моноцитами в нормальной сыворотке. Вакцина БЦЖ оказывала сильный канцеропротективный эффект по отношению к имплантированным, индуцированным, спонтанным опухолям. Комбинация различных анатоксинов (столбнячного и стафилококкового, дифтерийно-столбнячного, дифтерийно-столбнячно-дизентерийного) в определенных условиях вызывала повышенное образование соответствующих антигенов по сравнению с отдельной иммунизацией.

Кровопускания стимулируют образование нормальных и поствакцинальных антител, иммуногенез, факторы неспецифической антиинфекционной резистентности, плазмобластическую реакцию и увеличивают вес лимфоузлов у лабораторных животных.

Гормоны. СТГ и ДОКА вызывали выраженную плазмоцитарную реакцию, а при инъекции их животным, ранее подготовленным антигеном, — плазматизацию и повышение титров соответствующих антител. У животных, получивших гормоны, а затем иммунизированных, плазматизация и титры антител также были выше, чем у животных, только иммунизированных. Пролан и фолликулин усиливали иммуногенез при введении столбнячного анатоксина, а тироксин — образование дифтерийного антитоксина.

Витамины. Сочетание иммунизации с введением витаминов E и B_2 , пантотеновой кислоты, никотиновой кислоты, фолиевой кислоты, гидразида изоникотиновой кислоты способствовало стимуляции образования различных антител. В частности, витамин B_{12} стимулировал синтез противостолбнячных и противоскарисидозных антител и повышал резистентность животных к заражению аскаридозом.

Микроэлементы, вероятно, являются компонентом иммунологических процессов, но эта проблема в настоящее время недостаточно изучена. Есть сообщения, что введение животным сернокислого или хлористого кобальта, цинка повышало их устойчивость к легочным заболеваниям и туберкулезу, заражению брюшнотифозными бактериями, вызывало стимуляцию образования антител. Инокуляция комплексных соединений кобальта (коамид, Co, витамин B_{12}), железа (феррамид I, феррамид II), меди (медьглутамид) и иммунизация животных стафилококками стимулировали образование антител и повышали фагоцитарную активность лейкоцитов. Соединения кобальта усиливали антителогенез и у облученных животных. Комплексные соединения кобальта (Co-25, Co-35, Co-44) и марганца (Mn -36) повышали фагоцитоз, титр компонента и брюшнотифозных O-агглютининов.

Стимулирующий фактор иммуноид сыворотки. Сакакибара (Япония) в крови ревакцинированных кроликов обнаружил SK-фактор — вещество с максимумом поглощения ультрафиолетовых лучей с длиной волны 249 м μ . Он весьма эффективно стимулировал антителогенез у необлученных и облученных животных. По спектру поглощения SK-фактор оказался близким к цистину и цистину. Применение последнего также вызывало стимуляцию антителогенеза.

Нуклеиновые кислоты. Иммунизация различными антигенами с добавлением гомологичных или гетерологичных ДНК и РНК сопровождается значительным усилением иммунологического ответа. Сокращается индуктивная фаза антителиобразования. Дегрирование нуклеиновых кислот до олигонуклеотидов и нуклеотидов еще больше усиливает стимуляцию. Адьювантный эффект нуклеиновых кислот более выражен при дробном введении антигена с ДНК, чем при однократном суммарном. Обнаружено, что профилактическое введение интактным мышам стандартной дрожжевой РНК усиливает у них неспецифическую антиинфекционную резистентность. Если таким образом обрабатываются мыши с уже имеющимся вакцинальным иммунитетом, их антиинфекционная устойчивость повышается еще больше.

Работами ряда исследователей показано, что инокуляция в соответствующие клеточные системы *in vitro* или в организм животных нуклеиновых кислот различного происхождения (из животных, растений, вирусов, бактерий) вызывает усиленное интерферонообразование и повышает антивирусную резистентность. Например, эффективными оказываются дрожжевая РНК, РНК из печени и легких мышей, ДНК тимуса теленка, репликативная форма РНК вируса кори и т. д. Многократная обработка этими препаратами эффективнее однократной. В ряде случаев имеет значение аппликация препаратов. Например, при гриппозной инфекции наиболее эффективен интраназальный путь введения.

Кроме нативных нуклеиновых кислот, эффективными оказались дрожжевая РНК, дегрированная до мононуклеотидов, двуспиральный сополимер полиаденил-уридилевая кислота (поли-АУ), поли-УЦ и др. Профилактическое введение высокополимерных РНК и ДНК значительно повышало радиорезистентность животных. Кроме того, радиозащитным эффектом обладали дегрированные и денатурированные (ДНК) нуклеиновые кислоты, а также цитозин, 2-амино-4-метил-5,6,5', 6'-оксидиазолпиримидин и т. д. Нативные и дегрированные нуклеиновые кислоты, внесенные в культуру облученных клеток, способствовали их восстановлению.

Нейротропные вещества как стимуляторы иммунитета. Введение по определенным схемам пилокарпина, стрихнина, протоанемонина, ацетилхолина повышало образование различных антител. Если иммунизация соответствующим образом сочеталась с инъекциями кофеина, инфекционный процесс у таких животных (по сравнению только с иммунизированными) протекал легче, превентивные свойства сывороток были выше.

Другие вещества. Различные фармакологические вещества, применяемые в клиниках как лечебные препараты, и другие соединения одновременно являются иммунологическими стимуляторами.

Дибазол повышает образование антител, фагоцитарную активность лейкоцитов, активирует РЭС. Профилактическое введение дибазола могло снизить вдвое заболеваемость гриппом, облегчить протекающее заболевание и уменьшить осложнения.

Пентоксил стимулирует синтез тифозных, бруцеллезных, дизентерийных, противостафилококковых, протейных и других антител, повышает фагоцитарную активность лейкоцитов в комбинации с лекарственными препаратами, быстрее купирует заболевание, оказывает подобный благоприятный эффект и в облученном организме.

Новоэмбин в определенных случаях стимулирует образование агглютининов и преципитинов.

Фурацилин, фурадонин, фуразолидон активизируют фагоцитоз, повышают специфическую резистентность животных к заражению культурой вирулентного микроба.

Изониазид повышает титр агглютининов; при сочетании с иммунизацией животных БЦЖ значительно усиливает устойчивость к последующему заражению туберкулезом.

Фитонцидин при внутривенном введении кроликам стимулирует титр комплемента, гемолизинов и агглютининов.

Нивалин стимулирует у животных комплементарную активность сыворотки, титр лизоцима и агглютининов.

Метацирон при иммунизации умеренными дозами бруцеллезной и тифозной вакцин усиливает иммунную реакцию, приводя к очень высокому титру агглютининов.

Четыреххлористый углерод при инокуляции животным в определенных условиях вызывает стимуляцию образования гемолизинов, преципитинов, пролиферацию

ретикулоэндотелиальных и плазматических клеток. Аналогичный эффект обнаружен у *аллилового спирта*.

Диоксида кремния при внутривенном введении способствует сильному пролонгированному повышению синтеза антител.

Фитогеммаглоулинин (ФГА) трансформирует лимфоциты в бластоидные клетки. В зависимости от препарата ФГА, при соответствующей схеме эксперимента некоторым исследователям удалось усилить антителогенез у животных. Ряд авторов демонстрировали, что инкубация *in vitro* сенсibilизированных лимфоцитов или фрагментов иммунной селезенки с ФГА вызывала даже большее антителообразование, чем со специфическим антигеном.

Физические факторы. Оказалось, что температура, при которой находятся иммунизированные животные, может весьма существенно воздействовать на формирование иммунитета. Если мыши содержались при температуре $+35^{\circ}$, у них образование столбнячного антитоксина повышалось по сравнению с животными, находившимися при более низких температурах. У кроликов наблюдалось обратное. Содержание животных при низкой температуре (от -5° до $+6^{\circ}$) способствовало более интенсивному нарастанию титра антител, фагоцитарного индекса, увеличению количества лейкоцитов и общего веса тела, в отличие от животных, находящихся в условиях температуры $+16,5^{\circ}$ до $+18,5^{\circ}$. Животные, длительно находящиеся при пониженном барометрическом давлении (высота 16 000 футов), также продуцировали больше гемолитинов, чем при обычном.

При определенных условиях некоторым авторам удалось выявить стимулирующий эффект магнитного поля на образование столбнячного антитоксина. Ионизирующая радиация в малых дозах также могла способствовать увеличению продукции антител. Например, при ежедневном 7-кратном введении кроликам яичного альбумина и облучении 50 р (рентгенами), накануне второй инъекции титр антител повысился на 200—600% по сравнению с необлученными. Облучение на других этапах иммунизации было «неэффективным» или даже оказывало угнетающее действие.

Механизм стимуляции. Многие адьюванты вызывают локальное воспаление. В месте введения адьювантов с антигенами возникали абсцессы, некрозы, олеогранулемы. Считается, что воспалению принадлежит большая роль в стимуляции антителообразования. С одной стороны, из воспалительной гранулемы антиген замедленно резорбируется, с другой, в ней скапливается большое количество лейкоцитов, плазматических клеток, фагоцитов, ферментов, антиген подвергается значительным изменениям и более полно подготавливается к «ассимиляции» соответствующими клетками.

Другой важнейшей стороной действия адьювантов является сорбция антигенов на сорбентах. Она вызывает его дробление на мелкие частицы с созданием стойких физико-химических связей между антигеном и сорбентом. В таком виде антиген легче распределяется в организме, включаясь и в отдаленные лимфоузлы, и дольше в нем сохраняется. Пролонгирование сохранения антигена в организме сопровождается суммацией антигенных раздражителей. Сорбирование растворимых антигенов на сорбентах вызывает их корпускулирование, что способствует более полному фагоцитозу антигена.

Обнаружение адьювантного действия нуклеиновых кислот позволяет полагать, что они также участвуют в стимуляции антителообразования. Высвобождение нуклеиновых кислот при клеточном распаде может происходить в случае введения в организм эндотоксинов, повреждающих лейкоциты и макрофаги, при цитотоксическом действии гормонов типа кортизона, которые выделяются при стресс реакции,

а также от действия С-реактивного протеина и конфликте антиген — антитело. Последняя возможность хорошо документирована в экспериментах, в которых инкубация *in vitro* клеток иммунной селезенки с соответствующим антигеном (эритроциты барана) сопровождалась появлением продуктов разрушения ДНК. Эти продукты стимулировали иммунный ответ животных к гомологичным и гетерологичным антигенам. Подобные результаты получены при использовании растворимых антигенов. Иными словами, иммунологическая реакция сама нередко является причиной высвобождения эндогенных нуклеиновых кислот. Механизм их стимулирующего действия до конца не ясен. На микробных тест-системах показано, что олигодезоксирибонуклеотиды усиливают синтез ДНК бактерий. При этом сами олигомеры в синтезируемую ДНК не включаются, а повышают уровень специфических киназ, участвующих в синтезе ДНК. Механизм стимуляции антителообразования также, вероятно, осуществляется через стимуляцию киназной активности. Уровень киназ повышают полимеры полиА и полиУ. Существует мнение, что сущность повышения киназной активности состоит в дерепрессии, осуществляемой через взаимодействие репрессора и олигомера.

Помимо описанного механизма представляется возможным допустить усиление иммуногенности молекул антигена за счет образования молекулярного комплекса антиген + РНК. В пользу этого предположения свидетельствуют существующие в естественных условиях в организме комплексы нуклеопротеида, а также наблюдения, в которых показано образование комплексов РНК (из клеток перитонеального экссудата) и поли- γ -Д-глутаминовой кислоты. Полагают, что он образуется между дивалентными катионами и анионными группами взаимодействующих компонентов.

Одним из механизмов действия адьювантов эндотоксинов считают также повышение уровня нормальных антител в сыворотке животных. В основе этого явления лежит способность эндотоксинов вступать в иммунологическую реакцию с клетками, содержащими антитела к ним. Предполагается существование двух типов антител: реагирующих специфически с эндотоксином и реагирующих с соответствующим антигеном или патогенным микробом. При лизисе клеток высвобождаются предсуществующие антитела против общих антигенов, входящих в различные микроорганизмы, что и обеспечивает повышение антиинфекционной резистентности животных.

Сообщают и об активировании лизосом клеток, в частности макрофагов. Такой эффект вызывают кремний, витамин А, ФГА, эндотоксины и др. Активирование лизосом нередко совпадает с изменением адьювантом клеточной мембраны.

Требования, предъявляемые к стимуляторам. Стимуляторы должны быть эффективными, то есть способными стимулировать образование антител против небольших доз белкового, липидного, полисахаридного антигенов, а также против их комплекса. Они должны стимулировать иммуногенные качества вакцин, иначе говоря, способствовать образованию иммунитета и резко сократить число инъекций прививочного

препарата. Стимуляторы не должны обладать потенциальной опухолеродностью, аллергическими и антигенными свойствами, реактогенностью, пирогенностью, токсичностью.

Глава 20. ИОНИЗИРУЮЩАЯ РАДИАЦИЯ И ИММУНИТЕТ

Облучение животного организма ионизирующей радиацией вызывает развитие специфической «лучевой болезни». Состояние естественного и искусственного иммунитета в этих условиях подвергается существенным изменениям.

Естественный иммунитет. Проницаемость тканей, кожные и слизистые барьеры, сегрегационная функция РЭС. Облучение организма вызывает увеличение проницаемости кожи и подкожной клетчатки, легочного, гематоэнцефалического и гематоофтальмического барьеров, сосудов, кишечника по отношению к различным микроорганизмам, веществам, продуктам распада аутоклеток и т. д. Это способствует развитию инфекционных осложнений. С другой стороны, продукты распада тканей облученного организма проникают в кровь, а вещества, находящиеся в крови или попавшие в нее, усиленно переходят в различные ткани. Нарушение проницаемости начинается в первые часы после лучевого воздействия при дозах 100 р и больше и достигает максимума через 1—2 суток, сохраняясь в течение всего периода разгара лучевой болезни. Оно приводит к аутоинфекции. Перед смертью отмечается второе усиление проницаемости.

В развитии аутоинфекционных осложнений основную роль играет увеличение проницаемости желудочно-кишечного тракта и лимфатического кольца Валдейера. Оно происходит в результате различных факторов, один из которых, как считают, состоит в прямой и опосредованной деполимеризации радиацией гиалуроновой кислоты и влияния на систему гиалуроновая кислота — гиалуронидаза. Эти факторы также могут облегчать проникновение в клетки микробных токсинов и вирусов.

После облучения летальными и сублетальными дозами резко угнетается, иногда до полного подавления, бактерицидное действие кожи, особенно в области живота на 3—5-й день после облучения. Нарушается также бактерицидность слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, мерцательная и секреторная функция эпителия слизистых оболочек дыхательных путей.

В течение первых суток после облучения усиливаются адсорбционные свойства тканей, затем эта способность нормализуется, а перед смертью в ряде случаев повышается вновь.

При облучении резко подавляется барьерная функция лимфатических узлов, селезенки, пейеровых бляшек и солитарных фолликулов тонкого кишечника. При дозе 900 р через 24 часа барьерная функция аксиллярных лимфатических узлов к введению бреславльской палочки снизилась в 18 раз. Сегрегационная и переваривающая функция печени, а также активность клеток РЭС и селезенки к патогенным и сап-

рофитным микробам подавляется не сразу, а через определенный период. После облучения регистрируют длительное «сохранение» сегрегационной функции РЭС, однако оно не является нормальным, а свидетельствует о существенных повреждениях в организме, поскольку обуславливается взаимоотношением трех компонентов — увеличенной проницаемостью, адсорбционной способностью тканей и подавленным фагоцитозом.

Воспалительная реакция и фагоцитоз. В организме с развивающейся лучевой болезнью значительно ослабляется течение воспалительного процесса, а некротические изменения в тканях и геморрагии становятся преобладающими. Эти данные свидетельствуют и об извращении самого характера воспаления и об утрате способности воспалительного очага ограничивать и локализовать инфекцию. Блокирование воспалительной реакции в облученном организме коррелирует с лейкопенией. Обеднение воспалительного очага лейкоцитами уменьшает воспалительную реакцию. Это, а также повреждение фагоцитоза снижает защитную роль воспаления и фагоцитов.

Установлено, что в первые часы после воздействия радиации в ряде случаев отмечают некоторое усиление фагоцитоза, но затем он последовательно угнетается и остается сниженным в течение выраженной лучевой болезни и несколько позже. При облучении животных большими дозами фагоцитарная активность в терминальную фазу может практически исчезнуть. Нормализуется фагоцитарная активность у выживших животных после 20-го дня. У кроликов, получивших 600 р, она восстанавливалась только через 40 дней.

Между дозой облучения и степенью подавления фагоцитарной активности существует корреляция. Дозы 10—75 р усиливают фагоцитарную активность микрофагов, а 350—600 р резко ее угнетают. Снижается и процент завершенности фагоцитоза. В то же время имеются сообщения о неоднозначности изменения переваривающей функции фагоцитов по отношению к различным микроорганизмам.

Угнетение фагоцитоза в облученном организме происходит вследствие функциональной неполноценности микрофагов (полинуклеарных лейкоцитов). Повреждения гуморальных факторов фагоцитоза (опсонины, комплемент) не происходит. Токсические вещества, накапливающиеся в крови, также подавляют фагоцитоз и ускоряют разрушение фагоцитов. В 3—4 раза снижается миграционная способность фагоцитов. Все это сочетается с уменьшением абсолютного количества микрофагов, почему и интегральный фагоцитоз в крови оказывается сильно подавленным.

Количество макрофагов после облучения сначала несколько повышается, а затем их число уменьшается в тканях в 3 и более раз; нормализация наступает через 20—30 дней. Как и в отношении микрофагов, облучение снижает у макрофагов степень внутриклеточного переваривания. Зарегистрировано угнетение функции и дегенерация легочных фагоцитов и макрофагов в кишечной стенке. Здесь также наблюдается незавершенный фагоцитоз микробов.

Гуморальные факторы естественного иммунитета изменяются под влиянием облучения. Бактерицидность кожи и слизистых, бактериостатический эффект экстракта из лейкоцитов снижаются. Бактерицидность сыворотки крови при тотальном облучении, начав уменьшаться, со 2—4-х суток прогрессирует и к 7—14-му дню достигает максимума. Если животные погибают после облучения смертельными дозами радиации, бактерицидность крови полностью исчезает незадолго перед летальным исходом (в претерминальный период). У облученных отмечена четкая корреляция падения бактерицидности крови и лейкопении.

Бактерицидность крови в значительной степени связана с комплементом и пропердином. При воздействии сублетальных и летальных доз ионизирующей радиации количество пропердина в крови уменьшается в 6—40 раз. После облучения с летальным исходом пропердин почти целиком исчезает из крови. По всей видимости, происходит связывание его с мукополисахаридами, количество которых нарастает после облучения. В ряде случаев введением пропердина облученным животным удалось повысить их выживаемость и предупредить у них аутоинфекцию. Однако имеются сообщения об отсутствии лечебного действия пропердина при лучевой болезни.

Система комплемента оказывается более стабильной и устойчивой у облученных животных и не изменяется при нанесении сублетальных доз радиации. При воздействии летальных доз количество комплемента уменьшается лишь в претерминальный период.

Ионизирующая радиация снижает концентрацию лизоцима в тканях и жидкостях организма и подавляет образование интерферона.

Естественная резистентность к инфицированию различными микроорганизмами. Резистентность к инфицированию патогенными микроорганизмами. Снижение активности всех факторов естественного иммунитета в организме в результате воздействия ионизирующей радиации изменяет устойчивость животных к заражению различными микроорганизмами. Эта устойчивость значительно ослабляется, а инфекционный процесс может даже получить своеобразное течение.

Установлено снижение резистентности облученных животных к возбудителям кишечных инфекций. Это происходит как при инфицировании естественным путем, так и путями, несвойственными данному возбудителю. У облученных мышей и обезьян повышается чувствительность к пероральному введению возбудителя паратифа, а у кроликов и мышей — к парентеральному введению дизентерийного микроба. То же самое отмечают и в отношении *S. enteritidis*, *S. breslau*, *S. typhimurium*, *S. typhi*. Лучевые повреждения, вызванные введенными радиоактивными изотопами (фосфор, йод, полоний, торий и др.), также приводят к существенному повышению чувствительности к патогенным микробам. Тотальное облучение организма снижает резистентность к заражению пиогенными стафилококками, возбудителями холеры, туляремии, туберкулеза, псевдотуберкулеза. Очаговая коклюшная инфекция генерализуется, а чувствительность к ней облученного

организма существенно повышается. У облученных кроликов кожная инфекция, вызванная гемолитическими стрептококками и стафилококками, протекает с преобладанием некрозов и увеличением размеров кожных поражений. Заражение облученных животных маловирулентными возбудителями сибирской язвы и авирулентными пастереллами чумы выявило сильное снижение резистентности животных к названным микроорганизмам. Причем ослабление резистентности происходило не вследствие изменения вирулентных свойств микробов, а по причине повышенной чувствительности к ним животных. Резко ослабленная резистентность облученных животных выявлена и по отношению к анаэробным микроорганизмам, в том числе и к столбнячной палочке.

Характерной особенностью инфекционного процесса у облученных животных является то, что утяжеляется заболевание, удлиняются сроки очищения зараженного организма от микробов, укорачивается длительность инфекции, а нередко возникает ее генерализация, значительно повышается летальность. Если возбудитель в здоровом организме вызывает несмертельную или латентную инфекцию, то у облученных животных — летальную или обострение латентного заболевания. В общем чувствительность облученных животных к заражению микроорганизмами повышается примерно в 3—5 раз по сравнению с необлученными.

Ионизирующая радиация повышает чувствительность к инфицированию риккетсиями Провачека, Музера и вирусами, ускоряет размножение риккетсий. Установлена более значительная восприимчивость облученных животных к вирусам энцефаломиелиита, клещевого энцефалита, бешенства, гриппа, Коксаки и др. При этом в тканях облученных и зараженных животных увеличивается количество вирусных частиц и усиливается их репродукция. Максимально эти изменения регистрируют в период разгара лучевой болезни. Отмечают снижение резистентности к заражению малярийными плазмодиями и трипаносомами, грибами *Candida albicans*, *Trichophyton*, *Blastomyces dermatitidis* и др.

В общем повышенная чувствительность животных к инфицированию различными микроорганизмами наступает через трое суток после облучения, а ее длительность зависит от дозы радиации, характера инфекции, вида животного. С учетом всех этих факторов она продолжается в течение 2—6 недель и больше.

Резистентность к инфицированию условнопатогенными микроорганизмами. При облучении значительно снижается резистентность к условнопатогенным микробам. Кишечная палочка, протей, инокулированные облученным животным различными способами, увеличивали их смертность после заражения. Протей, не вызывающий гибели необлученных мышей, убивал 100% животных, облученных 400—550 рентгенами; микробов вводили через три дня после облучения. Если у необлученных мышей имелась тенденция к очищению крови от микробов, у облученных, наоборот, происходило их нарастание. Повышение чувствительности организма, пораженного ионизирующей радиацией, выявлено и по отношению к синегнойной палочке, пневмо-

коккам III типа (апатогенны для кролика), сарцинам, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Резистентность к бактериальным токсинам при облучении животных также снижается. Особенно это заметно в период разгара лучевой болезни (5—7-й день). Степень чувствительности к токсинам зависит от дозы радиации и периода лучевой болезни. Увеличение дозы облучения не может повысить чувствительность к экзотоксинам более чем в 4 раза. С наступлением стадии выздоровления чувствительность постепенно снижается, вплоть до нормализации. В зависимости от дозы облучения и вида животного нормализация чувствительности к экзотоксинам происходит через 20—30 дней, а к эндотоксинам — еще позже. Существует соответствие степени нормализации чувствительности организма к токсинам со степенью его лучевого поражения.

Снижение резистентности после облучения отмечено в отношении экзотоксинов *Cl. septicum*, *tetani*, *Cl. perfringens*, *Cl. botulinum*, *Corynebacterium diphtheriae*, стафилококка, *Sh. dysenteriae* Shiga и эндотоксинов микробов. Однако чувствительность к эндотоксинам повышается значительно больше (в 15—20 раз). Механизм повышения чувствительности облученного организма к бактериальным токсинам весьма сложен. Способность сыворотки облученного животного разрушать токсины снижается, а в его крови и органах содержится токсина больше, чем у необлученного. Например, через пять дней после введения токсина в крови необлученных и облученных животных в одном опыте разница в его содержании составила 26,6 раза, а в печени и селезенке — 4,3 и 10 раз. Определение токсина в моче позволило установить, что у облученных животных его выводится даже больше, чем у интактных. Вероятно, в облученном организме нарушаются процессы детоксикации. Определенная роль в этом, помимо других факторов, принадлежит поврежденной ретикулоэндотелиальной системе и снижению количества пропердина после облучения. Детоксикация может быть связана также со степенью окислительных процессов и функцией щитовидной железы, гормоны которой влияют на клеточный механизм разрушения токсинов; нарушение детоксикации, по всей видимости, также зависит от повреждения функции гипофиза и надпочечников.

Видовая невосприимчивость животных отличается высокой стабильностью к влиянию ионизирующих излучений. При облучении у таких животных не развиваются несвойственные данному виду инфекции. Подобное наблюдают при заражении облученных морских свинок вирусом желтой лихорадки; морских свинок, хорьков, кроликов, крыс — вирусом полиомиелита, крыс — культурой II сибиреязвенной вакцины и т. д.; все эти животные остались невосприимчивыми.

Эндогенная инфекция. Представители нормальной аутомикрофлоры, обитающие в естественных полостях (кишечник, дыхательные пути и т. д.), или микробы, находящиеся в различных очагах инфекции в организме (если таковые имеются), мигрируют из мест своего обитания и распространяются по органам, тканям или в крови. В ряде случаев аутоинфекция является причиной гибели облученного организма.

У различных животных, облученных летальными и сублетальными дозами ионизирующей радиации, из крови и органов высеивали микробов из группы *paracoli*, *coli*, *proteus*, *pseudomonas*, *alcaligenes*, α -*Streptococcus*, стафилококки, анаэробы, энтерококки, синегнойную палочку, пневмококки и т. д., то есть нормальных обитателей кишечника и дыхательных путей.

Кроме естественного аутоинфицирования облученного организма возможно аутоинфицирование при искусственном введении микробов. Животным скармливали представителей нормальной флоры или вводили их перорально и интратрахеально. Вскоре эти микробы появлялись в крови и тканях. Инокуляция микробов в кожу также вызывала их распространение из этого очага в организме облученных животных. Особую важность приобретает установление в кишечнике облученных животных изменения качественного состава нормальной аутомикрофлоры. Так, у крыс резко сокращается количество молочнокислых бактерий в кишечнике и возрастает содержание кишечной и синегнойной палочек. Как правило, при нанесении летальных и сублетальных доз радиации бактериальная инвазия возникает на 2—4-е сутки после облучения и продолжается в течение всего периода до смерти животного. Если наступает выздоровление — длится 3—4 недели. Максимальную обсемененность организма регистрируют перед смертью.

Большое значение имеет вопрос о роли эндогенной инфекции в исходе лучевой болезни. Если дозы ионизирующей радиации превышают абсолютно летальные и продолжительность жизни пораженного организма составляет 3—5 суток, то аутоинфицирование не играет существенной роли. Если облучение производится среднелетальными дозами и длительность жизни 50—70% облученных животных увеличивается до 11 суток, эндогенная инфекция становится существенным дополнительным фактором в осложнении основного патологического процесса. В таких случаях терапевтическое применение антибиотиков и химиотерапевтических препаратов значительно снижает смертность облученных животных.

Естественный иммунитет при хронической лучевой болезни. Пролонгированное воздействие небольших доз радиации вызывает развитие хронической лучевой болезни. Повреждения иммунитета при ней в общем однотипны повреждениям при острой лучевой болезни. Обнаружено четкое уменьшение сегрегационной функции ретикулоэндотелиальной системы, фагоцитарной и переваривающей способности нейтрофилов. В ряде случаев фагоцитарный индекс уменьшается в 3 раза, а завершенность фагоцитоза — в 5 раз. Бактерицидность крови динамична. После некоторого усиления в начале лучевой болезни происходит закономерное ее уменьшение. Ежедневное облучение животных в дозе 4,3 р. в течение полугода приводило к падению бактерицидности крови до нуля. Уменьшается содержание пропердина в крови, а комплемента — лишь в претерминальном периоде.

Значительное нарушение естественного иммунитета происходит, если облучение проводят при внутриутробном развитии организма

или вскоре после его рождения. В этом случае даже от небольших суммарных доз (120, 200 р) резко снижается резистентность к заражению патогенными микробами (она может уменьшиться в 20 раз). Животные погибают в основном от хронической аутоинфекции.

Приобретенный иммунитет. Активный иммунитет. Облучение летальными и сублетальными дозами до иммунизации животных вызывает у них на 1—2-е сутки резкое подавление биосинтеза антител, которое удерживается неделю и более. Подавление антителообразования сочетается со значительным удлинением индуктивной фазы антителогенеза до 11—18 (и более) дней, вместо 2—3 дней у необлученных животных. Максимальную продукцию антител можно регистрировать через 40—50 дней после облучения. Однако полной ингибиции образования антител никогда не происходит, она лишь резко угнетается. С увеличением дозы облучения усиливается и повреждение иммунитета. Способность образовывать антитела восстанавливается лишь к началу нормализации состояния облученных животных, то есть в среднем через 1—2 месяца после облучения. Облучение в различной степени подавляет образование антител к разным антигенам и их комплексам к одному антигену. С другой стороны, установлена различная интенсивность угнетения гемолизина, агглютининов, преципитинов и т. д.

Если облучают после иммунизации, образование антител или не изменяется, или несколько замедляется. Замедление антителообразования происходит в том случае, если облучение проводят в первые трое суток после иммунизации.

Диксон и др. выявили две фазы антителогенеза: первая — радиочувствительная, длится 1—3 дня; вторая — радиорезистентная, составляющая остальной период времени, когда облучение не способно существенно повредить образованию антител. В радиочувствительную фазу антителогенез значительно повреждается понижающими излучениями.

Изменения иммуногенеза у облученных отличаются от изменений антителогенеза после облучения, поскольку титр гуморальных антител еще полностью не отражает общего иммунитета и, в частности, резистентности к заражению гомологичными микробами. Например, в одном опыте прививали мышам брюшнотифозной вакциной через 3, 24 часа и трое суток после облучения. Никакого иммунитета к заражению не образовалось. Иммунизация на 7—21-е сутки создала значительный иммунитет, прививка через 30 дней привела к образованию иммунитета, в 3 раза менее выраженного, чем у необлученных животных. Облучение, нанесенное после иммунизации через 3 и 24 часа, 3 и 7 дней, полностью подавляет образование иммунитета, а через 9—10 дней подавляет его незначительно. Троекратная вакцинация, проведенная через семь дней после облучения, создает достаточно напряженный иммунитет.

Ревакцинация оказывается эффективной при первичной иммунизации до облучения. Резистентность иммунизированных и облученных животных к заражению выше, чем просто облученных без иммунизации.

Облучение влияет на изменение иммунологической реактивности, индуцированной первичной антигенной стимуляцией. Если первичный антигенный стимул наносится в ранние сроки (около двух дней) после облучения в летальных и сублетальных дозах, то на вторичное введение антигена организм реагирует резко подавленным и замедленным иммунным ответом. Облучение мышей 650 р до первичного стимула анатоксином за шесть и 24 часа уменьшило образование антитоксина после вторичной иммунизации в 5000 раз, за семь суток — в 160 раз, за 14 дней — в 4 раза и т. д. С другой стороны, облучение, нанесенное в ранние сроки после первичной иммунизации, не изменяет иммунологический ответ на вторичный антигенный стимул. Повторный иммунологический ответ оказывается более радиорезистентным, чем первичный.

Облучение иммунизированного организма, произведенное на высоте антителообразования, может кратковременно в несколько раз уменьшить количество циркулирующих антител, однако через сутки (реже через двое) оно восстанавливается до первоначальных величин.

Описанные выше нарушения антителообразования связаны с повреждением иммунологически компетентных клеток. Максимальное угнетение и замедленное накопление антителообразующих клеток, как и при подавлении антителообразования, у животных отмечают при иммунизации их в первые сутки после облучения. Те же закономерности сохраняются и при облучении самих клеток. Если клетки лимфоузлов облучали перед добавлением антигена, происходило значительное подавление синтеза антител, подавление ослаблялось при облучении после контакта с антигеном и тем сильнее, чем больше был интервал между антигенным стимулом и облучением. Полагают, что подавление антителообразования облучением связано с гибелью иммунокомпетентных клеток, нарушением их митоза и дифференцировки.

Хроническое облучение в той же дозе, что и «острое» однократное, нанесенное до иммунизации, значительно в меньшей степени повреждает иммунитет. В ряде случаев для получения одинакового эффекта его суммарная доза может превосходить однократную «острую» дозу более чем в 4 раза. Повреждающее действие еще больше ослабляется, если происходит увеличение интервала между последней дозой хронического воздействия и иммунизацией.

Трансплантационный иммунитет. Ионизирующая радиация вызывает угнетение трансплантационного иммунитета. Чем ближе облучение наносится к моменту трансплантации, тем сильнее происходит повреждение трансплантационного иммунитета, осуществляемого организмом реципиента. С удлинением этого интервала угнетающий эффект ослабляется. В одном случае облучение за пять часов до трансплантации удлиняло продолжительность существования кожных трансплантатов до $22 \pm 4,8$ дня, облучение за 13 дней — до $15,4 \pm 2,9$ дня. У необлученных животных этот период составлял $12,6 \pm 0,8$ дня. Нередко продолжительность жизни гетеротрансплантата после облучения животных могла увеличиваться в 3 раза. Нормализация трансплантационной реакции организма наступает, как

правило, через 30 дней после облучения. При посадке опухолей облучение содействует приживлению, увеличивает процент положительных посадок. Оказалось, что чем больше генетические различия между донором и реципиентом, тем большие дозы радиации требуются для подавления трансплантационного иммунитета.

Ионизирующая радиация изменяет также трансплантационную активность клеток. Облучение селезеночных клеток *in vitro* подавляло их гомотрансплантационную активность. С другой стороны, облучение доноров замедляло развитие вторичной гомологической болезни или даже способствовало выживанию некоторых реципиентов после трансплантации интактных клеток.

Облучение вызывает повреждение вторичного иммунологического ответа (вторичные гомо- и гетеротрансплантаты) в меньшей степени, чем это происходит в отношении первичного (первичные трансплантаты). Вследствие этих причин вторичные трансплантаты у облученных отторгаются значительно быстрее, чем первичные. Чем больше генетическая гетерогенность между донором и реципиентом, тем более радиорезистентна вторичная иммунологическая реакция. Способность организма отторгать гомотрансплантат более радиорезистентна, чем способность образовывать гуморальные антитела. Облучение в сублетальных и летальных дозах не вызывает абсолютного подавления трансплантационного иммунитета и, как сообщалось выше, удлиняет латентный период иммунологического реагирования.

Иммунологическая толерантность. Ионизирующая радиация резко подавляет иммунологическую систему реципиента, значительно удлиняя период иммунологической инертности. При посадке различных гомо- и гетерологичных трансплантатов и при очень сильном облучении животные гибнут раньше, чем происходит режекция (отторжение) большинства трансплантатов, но при трансплантировании кроветворных тканей — селезенки, костного мозга, лимфатических узлов животные не гибнут. Трансплантированные донорские клетки интенсивно пролиферируют вследствие угнетенного иммуногенеза реципиента и в течение периода иммунологической инертности, вызванной облучением, замещают разрушенную кроветворную ткань реципиента. Возникает организм-химера. Так как кроветворная ткань в таком организме является тканью донора, она индуцирует у реципиента специфическую толерантность к тканям донора. С другой стороны, она приживляется ввиду подавления иммунной реакции реципиента. Все это приводит к пролонгированному приживлению донорской ткани (кроветворной) и возможности трансплантировать другие ткани донора.

Существует предположение, что создание толерантности у взрослого организма происходит благодаря вызреванию лимфоидных клеток в присутствии антигена. Именно эти клетки и индуцируют толерантность. Облучение убивает зрелые лимфоидные клетки, а размножающиеся после облучения молодые незрелые клетки непрерывно контактируют с введенным после радиации антигеном, вызревают и осуществляют к нему толерантность. Время для создания толерантности в облу-

ченном организме, таким образом, ускоряется, так как резко уменьшается период замены зрелых лимфоидных клеток вызревающими молодыми, необходимый для индукции толерантности.

Имунологическую толерантность можно индуцировать и облучением сверхлетальными дозами. Но при этом необходимо, чтобы облучение сильно ингибировало иммунитет, чтобы время трансплантации клеток после облучения было оптимальным (высокая эффективность в первые 48 часов) и чтобы количество трансплантированных клеток было также оптимальным. При уменьшении дозы радиации необходимо увеличить количество трансплантируемых клеток. Облегчение индукции толерантности при сублетальном облучении можно получить, комбинируя с радиацией ингибиторы иммуногенеза. Толерантность удалось создать при введении реципиентам после облучения препаратов, содержащих трансплантационные антигены.

Ионизирующая радиация способна также разрушить толерантность, что наблюдается у различных животных. Причем радиация скорее всего разрушает лишь неполную толерантность, полная же — радиорезистентна.

П а с с и в н ы й и м м у н и т е т. Облучение не изменяет сроков элиминации из крови пассивно введенных различных антител. Однако терапевтическая ценность их резко падает. В частности, для серопротекции газовой гангрены, ботулизма и столбняка облученным животным следует вводить сыворотки в 1,5—3—5 раз, а при дифтерийной интоксикации — в 8,5 раза больше по сравнению с необлученными животными. Максимальное угнетение пассивного иммунитета отмечают в период разгара лучевой болезни, оно зависит от дозы облучения и интервала между ним и введением сыворотки.

Для лечения интоксикаций облученного организма иногда требуется сыворотки в 1070 раз больше, чем для необлученных животных. При экранировании в момент облучения селезенки животных или введении им живых клеток костного мозга интактных доноров потребность в сыворотке уменьшалась. В ряде случаев это позволяло повысить эффективность серопротекции в 3 раза. Пассивный иммунитет животных снижается вследствие повреждения облучением всей системы гуморальных и клеточных естественных защитных факторов.

Аутоиммунные осложнения. Исследования показали, что облучение изменяет антигенный состав тканей животных, что связано с исчезновением некоторых нормальных антигенов, то есть с упрощением антигенной структуры тканей и с появлением новых антигенов. Это наблюдают при тотальном и локальном облучении животных и в опытах с облучением клеток культуры тканей. На видовую антигенную специфичность облучение не влияет; изменениям подвержена органная и органоидная антигенная специфичность. Появление аутоантигенов в облученном организме неспецифично по отношению к лучевому фактору. Деструкцию тканей и появление аутоантигенов отмечают уже через несколько часов после облучения. Несмотря на резкое подавление иммунологической системы облученного организма, аутоиммунизация его появляющимися аутоантигенами происходит. Очевидно, аутоанти-

тела появляются через несколько недель после облучения; в ряде случаев циркуляция их достигала 4—5 лет.

Описанные изменения появляются в результате нарушения биосинтеза белка, наступающего достаточно скоро после облучения, перераспределения тканевых антигенов, проникновения в кровотоки экзоантигенов из-за увеличения тканевой проницаемости, прямой денатурации белков под влиянием облучения и т. д.

Глава 21. ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЙ ИММУНИТЕТ И РЕАКЦИЯ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»

Трансплантационный иммунитет. В этом разделе следует остановиться на сущности феномена, индуцирующих факторах и органах, обеспечивающих трансплантационный иммунитет и на его механизме. Все эти сведения обобщены Р. Петровым и Ю. Зарецкой (1965, 1970) и А. Фриденштейном и И. Чертковым (1969).

Давно было известно, что пересадка кожи и органов от одного однойцевого близнеца другому или аналогичное перемещение тканей внутри одного и того же индивида (аутологичные пересадки) оканчивается успешно: ткань приживает и впоследствии не отторгается. Прямо противоположное явление наблюдается при гетеро- и гомотрансплантациях — ткани и органы отторгаются. В зависимости от принадлежности доноров трансплантатов к биологическим видам они делятся на: аллогенные (тот же вид), ксеногенные (другой биологический вид), сингенные (генетически идентичные близнецы или животные одной инбредной линии).

Процесс режекции аллогенного трансплантата имеет следующую смену фазных явлений. В течение первых 4—5 дней кусочек кожи донора васкуляризируется и срастается с тканями реципиента. Однако к 6—7-му дню кровоснабжение трансплантата резко ухудшается вплоть до остановки кровотока, появляются геморрагии, отек, инфильтрация мононуклеарными клетками и прежде всего лимфоцитами. Перечисленные явления нарастают, и к 10—11-му дню трансплантат погибает. Он сух, тверд, края завернуты, эпителий и волосяные фолликулы перерождены. Его возвратная пересадка донору оказывается негативной. Повторная трансплантация кусочка кожи того же донора прежнему реципиенту приводит в среднем к более быстрому (в 2 раза) отторжению пересаженной ткани, что получило название феномена *second-set*. Это отторжение идет или с очень быстрой сменой описанных фаз, или без предшествующей васкуляризации, отека и грануляции. В последнем случае трансплантат представляется тонким, белым, плотным — белым трансплантатом.

Описанное явление строго специфично и получило название *феномена трансплантационного иммунитета*. Скорость отторжения трансплантата находится в прямой зависимости от его чужеродности и повторности пересадки. Ксеногенные, а также вторичные трансплантаты отторгаются быстрее и полнее, чем аллогенные и первичные. Белый трансплантат свидетельствует о максимальной напряженности транс-

плантационного иммунитета. Факторы, снижающие иммунологическую реактивность реципиента, подавляют и напряженность трансплантационного иммунитета. Например, у больных с агаммаглобулинемией трансплантат живет дольше.

Факторы, индуцирующие трансплантационный иммунитет, — это антигенность и чужеродность трансплантата. Изоантигены, обуславливающие трансплантационный иммунитет, получили название *трансплантационных антигенов*. Они обнаружены не только в форменных элементах крови, но также и в тканях. Они и являются причиной тканевой несовместимости при аллогенной трансплантации и реакции отторжения реципиента, у которого подобные изоантигены отсутствуют. Вопрос о соответствии эритроцитарных изоантигенов трансплантационным в настоящее время окончательно не решен, однако выявлена корреляция между антигенами лейкоцитов крови и продолжительностью приживания трансплантатов.

Установлена связь образования трансплантационных антигенов у животных с определенными генетическими структурами, получившими название локусов гистосовместимости, или H-локусов. У мышей их 14, подробно изучены следующие: H-1 (локализуется в I хромосоме), H-2 (в IX), H-3 (в V), H-4, локус Y-хромосомы. Локус H-2 контролирует синтез около 20 сильных трансплантационных антигенов, играющих наиболее важную роль в индукции трансплантационного иммунитета; остальные локусы обеспечивают контроль за образованием слабых антигенов. По этой причине локус H-2 является сильным, а остальные (H-1, H-3 и др.) — слабыми. Антигены, подконтрольные H-2 локусу, имеются во многих тканях здорового организма и больше всего в органах, содержащих ретикулоэндотелиальную систему. Эти антигены индуцируют образование гуморальных антител и клеточную реакцию, что в совокупности и ведет к отторжению трансплантата.

Оказалось, что у самцов мышей линии A и C57BL имеется еще один локус гистосовместимости, локализованный в Y-хромосоме. Он контролирует образование так называемого Sex-антигена. Антиген этот у большинства линий животных относится к числу слабых. Содержащая его ткань отторгается самками реципиентами. Локусы гистосовместимости обнаружены у крыс линии BN и Lewis, у беспородных кроликов, у инбредных морских свинок, у сирийских хомячков, у кур леггорнов, у некоторых холоднокровных. Химический состав трансплантационных антигенов пока не выяснен.

Органы, обеспечивающие трансплантационный иммунитет. После трансплантации аллогенных и ксеногенных трансплантатов в лимфоидной системе реципиента происходят существенные изменения. Наиболее полно исследована реакция селезенки, лимфатических узлов, а также тимуса, являющихся основными органами в формировании трансплантационного иммунитета. Цитологические изменения в регионарном лимфоузле после первой аллогенной трансплантации начинаются через 4—7 дней. Лимфоузлы гипертрофируются, увеличивается их вес. Уже с 3—4-го дня в корковой зоне появляются большие пиронинфильные лимфоидные клетки, именуемые иммунобластами. Они содер-

жат свободные рибосомы, локализуемые в виде розеток. В ткани узла формируются центры размножения. Полагают, что иммунобласты дифференцируются далее в основном в иммунные лимфоциты. Описанные компоненты удерживаются не более одной недели. При вторичной трансплантации указанные клеточные сдвиги появляются уже на второй день и продолжаются длительное время.

Как и в случае антителообразования, удаление регионарных лимфоузлов и селезенки значительно снижает образование трансплантационного иммунитета, что проявляется в удлинении выживаемости трансплантата. Участие тимуса в трансплантационном иммунитете в основном аналогично таковому в антителогенезе (см. главу 17). Также неонатальная тимэктомия животных сопровождается подавлением трансплантационного иммунитета. Существует корреляция между степенью тимэктомической лимфопении и продолжительностью жизни трансплантата. Роль фабрициевой сумки окончательно не выяснена.

Механизм трансплантационного иммунитета осуществляется при наличии двух факторов: клеточного и гуморального. Первый из них (клеточный) имеет ряд феноменологических проявлений (Р. Петров и Ю. Зарецкая, 1970).

Клеточные феномены. Установлено, что лимфоидная ткань, изъятая из организма с индуцированным трансплантационным иммунитетом и трансплантированная реципиенту, продолжает выполнять свои иммунологические потенции, а реципиент начинает отторгать аллогенные и ксеногенные трансплантаты. Такого рода воспринятый иммунитет получил название *адоптивного иммунитета*. Он создается сразу же у реципиента после переноса лимфоидных клеток, а последние сохраняют свои функции длительное время после иммунизации донора. Адоптивный иммунитет создается и после переноса лимфоцитов, иммунизированных *in vitro*. Явление адоптивного иммунитета, вероятно, универсально, так как оно было получено не только по отношению к различным трансплантатам, но и к инфекционным и аллергогенным агентам. Механизм адоптивного иммунитета изучен не полностью.

Трансфер-реакция (реакция переноса адоптивного иммунитета лимфоцитами) является по сути дела проявлением адоптивного иммунитета, с той лишь разницей, что характеризуется иммунологической реакцией лимфоцитов, сенсibilизированных против тканей реципиента. Она возникает при внутрикожном введении донору живых лимфоидных клеток реципиента, сенсibilизированного к тканям донора, и проявляется характерной клеточной реакцией, подобной туберкулиновой. Трансфер-реакция показана на различных животных и на человеке, она может осуществляться также и неиммунизированными аллогенными лимфоцитами. В последнем случае она будет, по-видимому, проявлением генетической реакции лимфоцитов на чужеродные антигены, в соответствии с чем ее выраженность коррелирует со степенью несовместимости. Трансфер-реакция протекает в два этапа с максимальной выраженностью на первые и 5—6-е сутки, которые, как полагают, осуществляются самими перенесенными клетками и их

потомками. Существенно отметить, что трансфер-реакция реализуется при непосредственном участии и клеток реципиента.

Бласттрансформация. При культивировании *in vitro* лейкоцитов генетически различных доноров клетки приобретают способность делиться и трансформироваться в бластоидные клетки с выраженным синтезом ДНК. Как оказалось, такой способностью обладают в основном малые лимфоциты; реакция эта получила название бласттрансформации. Последняя осуществляется не только при контактировании аллогенных лимфоцитов, она индуцируется различными антигенами (фитогемагглютинины, туберкулин и др.).

Феномен цитопатогенного действия лимфоцитов. Если в культуру различных клеток (опухолевых, почек, эпителиальных, фибробластов и т. д.) добавить лимфоциты от доноров, иммунизированных соответствующими аллогенными и ксеногенными тканями, иммунные лимфоциты убивают эти клетки. Описанные реакции осуществляются лимфоцитами, возможно, вследствие наличия у них структурных антител, обладающих множественной валентностью по отношению к трансплантационным антигенам убиваемых клеток.

Феномен аллогенного ингибирования заключается в том, что в условиях сингенного взаимодействия клетки размножаются предпочтительно по сравнению с аллогенным, когда их размножение тормозится. Этот феномен четко проявляется при трансплантации клеток родителей-доноров на F_1 -гибриды, где их размножение замедляется, в отличие от такового у сингенных реципиентов; в условиях культур фибробластов, опухолевых и других клеток. Ингибирующим эффектом обладают лимфоциты, тимоциты, опухолевые клетки, а также убитые клетки и их гомогенаты. Имуран, кортизон не изменяют эффекта.

Феномен инактивации несингенных стволовых клеток. Если реципиенту трансплантируют клетки лимфоидных органов животных различных генотипов, происходит ингибирование стволовых клеток. Ингибировали несингенные стволовые клетки (которые могли дифференцироваться по гемопоэтическому или антилеообразующему направлению), лимфоциты. Возможно, ингибирующее действие лимфоциты могут оказывать и на другие несингенные клетки, например раковые. Для осуществления феномена инактивации необходимы живые лимфоциты. Убитые клетки, эритроциты или иные антигены эффектом не обладали.

Гуморальные факторы. В настоящее время в трансплантационном иммунитете окончательно установлена роль гуморальных антител, и прежде всего полных и неполных гемагглютининов, лейкоагглютининов и цитотоксинов. Роль названных антител установлена в отношении аллогенных и ксеногенных трансплантатов лимфоидной и нелимфоидной ткани. Как и в случае иммунного ответа на антигены, образуются тяжелые (19S) и легкие (7S) гуморальные антитела против трансплантатов с характерной сменой 19S на 7S антитела. Вместе с тем выяснилось и другое: гуморальные антитела могли способствовать усилению (убыстрению) роста опухолевых и нормальных трансплантатов у различных животных. Данный феномен специ-

фичен. Для получения сывороток, усиливающих рост опухолей, необходимо, чтобы трансплантационные антигены нормальной и опухолевой ткани имели одинаковую H-2-специфичность. Однако механизм феномена усиления роста до конца еще не ясен. Предполагают, что он связан с недостаточным количеством в организме реципиента соответствующих гуморальных антител и комплемента. Если их количества увеличивали, феномен усиления роста сменялся режекцией трансплантата.

Следовательно, гуморальные антитела могут участвовать не только в отторжении трансплантата, но при определенных условиях в усилении роста опухолевых и нормальных пересаженных тканей. От чего это зависит, вопрос пока не решен.

Отторжение трансплантата. Остановимся на морфологических проявлениях, возникающих в месте приживления трансплантата. На раннем этапе вокруг трансплантата и в стенках (!) сосудов скапливается большое количество лимфоцитов, макрофагов и плазматических клеток, позднее — на втором этапе — отмечают инфильтрацию трансплантата клетками и гибель его в результате закупорки сосудов и ишемии. Некроз трансплантата наблюдали и в случаях без тромбоза сосудов. Макрофаги осуществляют фагоцитоз клеток трансплантата или становятся сенсibilизированными к нему в результате адсорбции соответствующих антител, плазматические клетки вырабатывают антитела против трансплантационных антигенов, поступающие в кровь, а лимфоциты частично могут дифференцироваться в плазмциты и гистиоциты, другая часть лимфоцитов несет на своей поверхности «клеточные антитела» к антигенам трансплантата, присоединяется к клеткам последнего, убивает его и погибает сама. Аналогичными «антителами» и в силу этого цитотоксичными функциями, возможно, наделены и другие лимфоидные клетки.

Таким образом, некроз и деструкция трансплантата осуществляются при взаимодействии обоих факторов — гуморальных антител и лимфоидных клеток. В условиях первичного трансплантата клеточная реакция развивается быстро, а антитела не успевают накопиться в значительных количествах, то есть режекция в основном происходит за счет клеточной агрессии реципиента. Однако при повторной подсадке трансплантата в крови реципиента имеется уже достаточное количество антител и они начинают реагировать с трансплантурированными тканями. В этом случае антителам принадлежит существенная роль в режекции трансплантата.

Реакция «трансплантат против хозяина». Сущность феномена, формы проявления реакции «трансплантат против хозяина» и механизм ее составят содержание настоящего раздела (материалы позаимствованы из монографии Р. Петрова и Ю. Зарецкой, 1970).

Сущность феномена. Внутривенная или внутрибрюшинная инъекция иммунологически компетентных — неродственных клеток взрослых животных эмбрионам теплокровных или новорожденным животным вызывает у них б о л е з н ь р а н т, а у куриных эмбрионов или

вылупившихся цыплят в равных условиях эксперимента — феномен Симонсена (см. ниже). Происхождение обоих феноменов у реципиентов обязано вводимым иммунологически компетентным клеткам взрослых доноров. Эти клетки под влиянием антигенных раздражений тканей эмбриона размножаются и продуцируют антитела, в том числе антиэритроцитарные, обуславливающие анемию.

Реакция «трансплантат против хозяина» возможна при условии ареактивности организма реципиента в отношении донорского материала и наличия в последнем зрелых иммунологически компетентных клеток. Иммунологическая инертность реципиентов наблюдается в следующих случаях:

1) у эмбрионов и новорожденных животных, не достигших иммунологической зрелости;

2) у гибридов первого поколения (F_1), получивших донорский материал от одного из своих родителей; в этом случае гибрид содержит все антигены, имеющиеся в трансплантате, но трансплантат не имеет всех антигенов гибрида и поэтому реагирует на их избыток иммунологической реакцией;

3) у хозяина, толерантного к донорской кроветворной ткани; последняя содержит иммунологически компетентные клетки и образует реакцию против антигенов реципиента;

4) у облученного животного, у которого все клетки, ответственные за иммунологическую реакцию, убиты.

Формы проявления реакции «трансплантат против хозяина». Болезнь рант, или карликовая болезнь, наблюдается у новорожденных млекопитающих и характеризуется отставанием в росте, весе, исхуданием, атрофией лимфоидной системы, анемией, дерматитами. В лимфоидных фолликулах вначале исчезают лимфоциты и пролиферируют другие клетки — ретикулярные и бластонидные, затем наступает атрофия и фиброз. Спленомегалия в фазе пролиферации лимфоидной ткани, гемолитическая анемия, некрозы в печени и дерматиты дополняют картину болезни рант. Различают «бледную» и «красную» формы болезни рант. При бледной форме наблюдают гемолитическую анемию, морфологический состав красной крови изменяется за счет появления анизоцитов, полихроматофилов и эритроцитов с тельцами Жоли. Красная форма характеризуется сгущением крови, образованием в селезенке очагов экстрамедуллярного кроветворения, гиперплазией костного мозга. Со стороны белой крови при обеих формах может наблюдаться лейкоцитоз или лейкопения. Тяжесть болезни рант зависит от дозы трансплантируемых клеток: варьируя ими, у реципиентов можно вызвать очень легкую и крайне тяжелую со смертельным исходом форму болезни рант.

Феномен Симонсена характеризуется отставанием в весе, росте, исхуданием, увеличением селезеночного индекса (отношение веса селезенки в миллиграммах к весу тела животного в граммах). Однако часто этим феноменом обозначают спленомегалию, возникающую у иммунологически незрелого реципиента после трансплантации ему зрелых иммунокомпетентных клеток.

Ф. Бернет (с сотр.) модифицировали названный феномен: при переносе донорских кроветворных клеток на хориоаллантоисную оболочку куриных эмбрионов 12-дневной инкубации на ней через 4—7 дней образуются пролиферирующие фокусы поражения диаметром 2—4 мм. Они состоят из популяции донорских лимфоидных клеток, опоясанных клетками реципиента. Считают, что лимфоидные клетки образуются из донорских лейкоцитов (лимфоцитов). Модификация феномена на эмбриона приобрела широкое распространение. Реакция «трансплантат против хозяина» на хориоаллантоисной мембране выражена тем сильнее, чем менее родственны донор и реципиент.

Гомологическая болезнь у взрослых животных подобна болезни рант. Отставание в развитии и росте у сформировавшихся животных, разумеется, не наблюдается, однако истощение неизменно.

Гомологическая болезнь у гибридов F_1 . При инъекции гибридам F_1 клеток одного из родителей у животных возникает процесс, напоминающий болезнь рант: взъерошенность шерсти, сгорбленность, отек морды, исхудание, спленомегалия, гемолитическая анемия, лейкопения, тромбоцитопения, извращение электрограммы плазмы.

Гомологическая болезнь у взрослых толерантных животных протекает в два этапа. Вначале у животных в неонатальном периоде создается толерантность к кожному трансплантату после инъекции клеток кроветворной ткани, затем введение тождественных клеток повторяется, что и обуславливает наступление реакции «трансплантат против хозяина». Реакция сопровождается типичными признаками, дерматитами и полиартритом.

Гомологическая болезнь взрослых облученных животных. После обработки летальными дозами ионизирующей радиации, убивающими кроветворную ткань, животным в целях сохранения их жизни вводили аналогичную ткань от гетероили гомо-доноров. Через 20—30 дней после облучения у выживших животных развивался процесс, сходный с болезнью рант, от которого они и погибали. Описанный феномен получил название *вторичной болезни*.

Механизм реакции «трансплантат против хозяина». Определяющую роль в реакции «трансплантат против хозяина» играют различия в геномах донора и реципиента. Реакция выражена в случаях различия донора и реципиента по H-локусу гистосовместимости и прежде всего по H-2-локусу и его аллелям. Одни и те же аллели H-2-локуса у донора и реципиента исключают описываемую реакцию. Реакция «трансплантат против хозяина» зависит также и от характера донорской ткани. В порядке убывающей эффективности вызывать реакцию против реципиента донорскую ткань можно распределить следующим образом: лимфатические узлы, селезенка, тимус, костный мозг, эмбриональная печень.

Непосредственно реакцию «трансплантат против хозяина» обеспечивают главным образом малые лимфоциты. Окончательно роль в этом процессе гуморальных антител не установлена.

Глубокий анализ трансплантационного иммунитета и стремление преодолеть тканевую несовместимость привели к созданию средств его подавления или устранения, получивших название *иммунодепрессоров*.

Иммунодепрессоры. В настоящее время их можно разделить на ионизирующие излучения, алкилирующие агенты, антимаболиты, антилимфоцитарные сыворотки и др.

Алкилирующие препараты (уретан, азотиприт, триэтиленмеламин, цитоксан, хлорамбуцил, дипин, сарколизин, ТиоТЭФ) — органические соединения, которые интенсивно реагируют с нуклеиновыми кислотами и белками в клетке, в результате чего происходит присоединение углеродсодержащей части их молекулы к указанным веществам. По своему эффекту они сходны с ионизирующими излучениями, обладают мутационным и канцерогенным действием, повреждают хромосомы и нуклеиновые кислоты. Наиболее эффективны они в условиях многократного введения до антигена — в этом случае резко подавляют или блокируют образование антителосинтезирующих клеток и вторичный иммунологический ответ, слабо влияют на формирование иммунологической памяти.

К антимаболитам относят аналоги пуриновых оснований: 6-тиогуанин, 8-азагуанин, 6-меркаптопурин, и их производные (имуран, гуаноран); аналоги пиримидиновых оснований: 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-флюоро-2-дезоксисуридин; аналоги аминокислот: азасерин, диазодоксинорейцин; аналоги фолевой кислоты: аметоптерин. Иммунодепрессивным действием обладают также актиномицин, рибонуклеаза, колхицин, винкалейкобластин, подофиллотоксин и т. д. Механизм действия антимаболитов состоит в их реакции с ферментом, осуществляющим включение нормального метаболита в синтез нуклеиновых кислот. Соединяясь с ферментом, антимаболит тем самым блокирует его, останавливая синтез. С другой стороны, антимаболит включается в нуклеиновую кислоту вместо нормального метаболита и изменяет ее свойства. Именно поэтому наиболее эффективно антимаболиты действуют в условиях интенсивного синтеза нуклеиновых кислот и подавляют пролиферацию и дифференцировку иммунокомпетентных клеток. Максимальный эффект они оказывают в течение 1—2 дней после введения антигена, но слабо влияют на формирование иммунологической памяти.

Вещества указанных двух групп более выражено угнетают антителообразование и слабее действуют на трансплантационный иммунитет. Существенно отметить, что различные животные неодинаково чувствительны к антимаболитам, а последние в определенных условиях могут создавать избирательную толерантность у животных к соответствующим антигенам.

В действии алкилирующих препаратов и антимаболитов имеются различия; полагают, что антимаболиты более избирательно поражают антителогенез и иначе подавляют различные типы кроветворения.

Как уже сообщалось, антилимфоцитарная сыворотка также обладает иммунодепрессорным действием. Она максимально эффективна при инокуляции до антигена, ингибирует формирование иммуноло-

гической памяти и трансплантационный иммунитет, слабо повреждает вторичный иммунологический ответ. Предполагают, что она воздействует на антиген-чувствительные лимфоциты.

Еще одним путем создания иммунологической ареактивности является индукция толерантности (см. главу 14). Она может быть вызвана инокуляцией антигенов эмбриону или новорожденному животному, а у взрослых — введением соответствующего антигена и иммунодепрессора или толерогенной фракции антигена по Дрессеру *in vitro*, или путем «биологической фильтрации» по Фрею (введение животным антигена через некоторое время сопровождается накоплением в их крови его толерогенной фракции).

Глава 22. АЛЛЕРГИЯ

Аллергия — специфическая патологическая реакция организма на аллерген (антиген) или гаптен, а не сверхчувствительная, как принято думать. Райка считает, что выражение «сверхчувствительность» непригодно, так как организм в большинстве случаев реагирует на аллерген количественно не сильнее, не «сверхчувствительно», а «иначе чувствительно». Однако выражения «повышенная чувствительность», «гиперчувствительность» общеприняты. Мы ими тоже будем пользоваться. Термин аллергия (алло — другой, эргон — действие) впервые применил Пирке.

Реакция организма (и клеток) на аллерген может быть немедленной, замедленной и смешанной.

Немедленные реакции возникают в первые 15—30 минут после повторного введения аллергена в сенсibilизированный организм, замедленные — через 6—24—48 или 72 часа. Пусковым механизмом аллергии является первичное воздействие на организм аллергенов или гаптен и их последующее взаимодействие с антителами. Часто затем присоединяются патологофизиологические механизмы и патологоморфологические изменения, составляющие клиническое выражение аллергии. Аллергены и гаптены способны сенсibilизировать (повышать чувствительность) и десенсibilизировать (погашать чувствительность) организм.

В организм аллергены попадают контактным, пероральным, ингаляционным и парэнтеральным путями. Отсюда и соответствующие названия аллергенов. Контактными аллергенами и гаптенами могут быть продукты химической промышленности, медикаменты; пероральными — пищевые вещества и лекарственные средства; ингаляционными — пыль, пыльца и запахи растений, эфирные масла, различные пахучие вещества, а для человека — запах конюшен, цветов, красок, кофейная пыль, дым и пыль табака, молочный и яичный порошки и многое другое. Медикаменты, чужеродные сыворотки и гамма-глобулины, вакцины, вытяжки из органов и растений, яды насекомых, пресмыкающихся и растений, внесенные укусами и уколами, чужеродные клетки — составляют неполный перечень парэнтеральных антигенов.

Реакции немедленного типа. К этим реакциям относят экспериментальную анафилаксию у животных, сывороточную болезнь у животных и человека, бронхиальную астму, септическую лихорадку — у человека. Термин анафилаксия (ана — наоборот, филакси — охранение) принадлежит Рише.

Экспериментальная анафилаксия у морских свинок. Двукратное (с интервалом в 8—10—20 дней) введение морским свинкам даже $\frac{1}{20}$ гаммы чужеродного белка приводит к шоку. Первая доза белка названа с е н с и б и л и з и р у ю щ е й — она может быть ничтожно малой, вводят ее подкожно; вторая — р а з р е ш а ю щ е й, завершающейся шоком. Она должна быть большей, порядка 0,01 или 0,1 мл. Инъецируют ее в ток крови — внутрисердечно или в вену. Анафилаксия строго специфична, так как вызывается антигенами и образованными на них антителами. Однако сенсибилизация возможна только антигенами (аллергенами), а шоковую реакцию воспроизводят и гаптены.

Достаточно легко морские свинки сенсибилизируются 0,01—0,1 мл лошадиной сыворотки. При второй внутрисердечной инъекции той же сыворотки (на 8—20-й день) они реагируют шоком. Через 1—5 минут у животного наступает беспокойство, оно чешет лапками нос, чихает, шерсть взъерошена, температура и кровяное давление падают. Вскоре появляются судороги, редкое дыхание, непроизвольное отделение мочи и кала. Через 5—10 минут свинка может погибнуть от асфиксии. На вскрытии отмечают эмфизему легких, кровоизлияния в слизистую желудочно-кишечного тракта. Свертываемость крови понижена, комплемент в ней уменьшен.

Клиническая картина шока у животных разных видов варьирует. Это зависит от степени развития гладкой мускулатуры сосудов, кишечника, других органов, так как в момент шока происходит их спазм. У кроликов преобладают сердечно-сосудистые симптомы: падение артериального давления в большом кругу кровообращения, расширение правого желудочка сердца вследствие расстройств легочного кровообращения от спазма концевых артерий малого круга. Смерть наступает от остановки дыхания. У собак наиболее сильно развита мускулатура печеночных вен, тонкого кишечника. Наблюдается их спазм, образуется застойная печень и геморрагический энтерит. Животные погибают от коллапса. У овец, коз и крупного рогатого скота после повторного введения противосибиреязвенной лошадиной сыворотки регистрировали шоковые явления различной степени, вплоть до смерти отдельных животных. Описана анафилактическая реакция на чужеродную сыворотку у свиней и лошадей. У части свиней она проявлялась крапивницей, у других — в форме легкого шока.

Возникшая сенсибилизация удерживается у морских свинок до четырех лет, у человека — до 6—8 месяцев.

Пассивная анафилаксия. Возникает после парентеральной инъекции сыворотки крови сенсибилизированных животных. При внутривенном введении сенсибилизация наступает немедленно, при внутрибрюшинном — через 12 часов, при подкожном — через 4 часа, удержи-

вается 2—3 недели, иногда несколько дольше. Зависит это от периода полного распада гетерологичного гамма-глобулина.

Феномен Шульца — Дейля. Это анафилаксия *in vitro*. Она может быть активной и пассивной. Активный феномен Шульца — Дейля моделируется следующим образом: отрезок тонкой кишки (можно рога матки, трахею, бронхи) сенсibilизированного животного (кролика, морской свинки) отмывают в растворе Тироды для удаления нефиксированных антител, помещают в ту же жидкость, содержащую специфический аллерген. Происходит спазм гладкой мускулатуры, степень которого записывают на кинограмму. Эта реакция чисто гистаминного типа, она предупреждается антигистаминными препаратами — гистаминазой, димедролом, пипольфеном, деданолом и др.

Пассивный феномен Шульца — Дейля моделируется на отрезке тонкой кишки здорового кролика или морской свинки. Перед опытом препарат выдерживают в растворе сыворотки сенсibilизированного животного, с тем чтобы адсорбировались антитела. А далее поступают, как в первом случае. Степень анафилактической реакции сравнивают с реакцией кишечника на раствор гистамина в жидкости Тироды.

Механизм анафилаксии. Описанная анафилаксия вызывается искусственно. Антитела при ней фиксированы на эндотелии сосудов, на клетках гладкомышечных органов. Имеются и циркулирующие антитела. Возможно, что у ряда животных они играют большую роль, чем фиксированные антитела. Антиген циркулирующий соединяется с антителами на клеточных поверхностях, образующийся комплекс антиген-антитело вызывает сосудистые расстройства, нарушение функции рецепторов сосудов, метаболизма клеток. Наркотики и ганглиоблокирующие средства предупреждают местные и общие шок-овые явления, и это свидетельствует о том, что в процесс действительно вовлекается нервный аппарат сосудов.

Нарушение метаболизма клеток ведет к выделению ими биологически активных веществ: гистамина, гепарина, аминов (печень); гистаминоподобных веществ; серотонина (клетки мезенхимы); ацетилхолина (нервные клетки). Эти вещества, и прежде всего гистамин и ацетилхолин, участвуют в воспалении, расширении и проницаемости сосудов, обеспечивают местные явления и являются одной из причин шока. Клетки гладкой мускулатуры сенсibilизированы, и на присоединение антигена к фиксированным на них антителам бурно реагируют, что приводит к спазму органа.

На фоне общей анафилактической реакции организма различают существование «шоковых» тканей. Они создают местную симптоматику. Если встреча аллергена с фиксированным антителом происходит в коже, то выступает сыпь; на слизистой глаз — конъюнктивит, носа — ринит, бронхов — астма, в крови — шок и т. д. Картина дополняется местной (очаговой) полиморфноядерной клеточной инфильтрацией. В коже, в ряде случаев, отмечают увеличение числа тучных клеток — датчиков гистамина, в крови, особенно при гельминтозах, эозинофилию.

Десенсибилизация (антианафилаксия) — утрата повышенной чувствительности. Наблюдается она после благополучно перенесенного шока, после инъекции подпороговой (не вызывающей шока) дозы аллергена, после десенсибилизации по Безредке: в этом случае животному вводят 1—2 раза небольшие дозы чужеродной сыворотки, она блокирует фиксированные и циркулирующие антитела, после чего инъецируют всю остальную дозу препарата. Не встречая антител, чужеродная сыворотка переносится без последствий. Десенсибилизация по Безредке показана при введении лошадиных лечебных сывороток овцам, козам, крупному рогатому скоту, свиньям. Во всех этих случаях следует руководствоваться указаниями инструкций.

Состояние десенсибилизации удерживается организмом 2—3 недели, после чего повышенная чувствительность восстанавливается.

Основные критерии реакции немедленного типа. 1. Антитела, как правило фиксированы, но могут быть и циркулирующие. Аллерген циркулирующий.

2. Наблюдается пролиферация плазматических клеток продукторов антител.

3. Пассивная передача осуществляется сывороткой. Лейкоцитолитиз, под влиянием аллергена, отсутствует.

4. Реакции аллерген-антитело протекают в «шоковых» тканях.

5. Вызывается белком.

6. Сенсibilизация короткая, десенсибилизация легкая.

7. Основным симптомом — спазм органов с гладкой мускулатурой.

8. Индивидуальная чувствительность не имеет большого значения.

Реакции замедленного типа наблюдаются почти у всех млекопитающих, многих птиц и некоторых рыб. У человека и животных их регистрируют при инфекционной (микробной) аллергии, после инъекции вакцин, при трансплантационном и противоопухолевом иммунитете, гомологичной болезни; у человека — при контактной экземе и заболеваниях, вызванных растительными аллергенами. Степень выраженности этой реакции зависит от сенсibilизирующей дозы аллергена (чем она больше, до известного предела, тем сильнее реакция) и от вида животного. Лошади при заражении бруцеллезом дают отчетливые кожные пробы, ослы — нет; кошки не сенсibilизируются при инфицировании возбудителем туляремии.

Инфекционная аллергия. При многих бактериальных, спирохетозных, грибковых, протозойных, риккетсиозных и вирусных инфекциях, а также при гельминтозах образуется аллергия замедленного типа. Колеблясь в сторону усиления и ослабления, она может продолжаться в течение всего срока болезни и длительное время после клинического выздоровления. При сипе, туберкулезе, бруцеллезе ее регистрировали 8—10 лет подряд.

Аллергия, как и анафилаксия, строго специфична, и ее используют в диагностике многих инфекций. Люди и животные в ответ на накожное, внутрикожное, подкожное или внутриконтинктивальное введение аллергена реагируют четкой реакцией, возникающей через несколько часов или 1—3 суток. При накожном и внутрикожном

введении аллергена образуется очаговое покраснение, отек, болезненность, при подкожной инъекции — отек, при нанесении на конъюнктиву — конъюнктивит, гной, при инъекции маллеина в толщу века — отек его. Кроме местной, иногда возникает общая и очаговая реакции на аллерген. У больных туберкулезом и сапом повышается температура, наступает слабость, депрессия, обостряются местные очаги инфекции.

Диагностические аллергические реакции хорошо изучены при туберкулезе, лепре, сапе, бруцеллезе, туляремии, трихофитии, эпизоотическом лимфангите лошадей, актиномикозе, сифилисе, дерматомикозах, токсоплазмозе и многих других заболеваниях. Для диагностики туберкулеза используются аллергические препараты — туберкулин, для диагностики сапа — маллеин, бруцеллеза — абортин, бруцеллизат, бруцеллогидролизат (в медицинской практике — мелитин), туляремии — тулярин, токсоплазмоза — токсоплазмин и т. д. Недостаток аллергической диагностики — ее положительные показания у привитых вакцинами и у выздоровевших много лет назад. Здоровые животные и люди на аллергены не реагируют.

Механизм замедленной аллергии. Замедленные аллергии наблюдаются при естественных заболеваниях и воспроизводятся экспериментально. Циркулирующие антитела, принимающие участие в аллергии, отсутствуют. Это типичный клеточный феномен, в котором клетками-эффекторами являются лимфоциты лимфатических узлов, грудного протока, перитонеальной жидкости и периферической крови. Полагают, что на поверхности лимфоцитов имеются антитела, которые взаимодействуют с аллергенами, а в случае трансплантационного иммунитета — с клетками-мишенями. В результате лимфоциты и клетки-мишени погибают. Однако такое представление разделяется далеко не всеми учеными, и вопрос о механизме действия лимфоцитов в развитии аллергии замедленного типа окончательно не решен.

Аллергены фиксированы. Часто это гаптены, быстро проникающие во внутреннюю среду организма и уже на месте преобразующиеся в полные антигены. На это уходит несколько часов или суток, что и обуславливает замедленность реакции. В ней принимают участие лимфоциты, моноциты, иногда нейтрофилы, а на поздних этапах развития болезни — плазматические клетки. Первые три вида клеток составляют основу местной реакции на введение туберкулина; из них же и других клеток состоит и бугорок. Однако очаговая инфильтрация лимфоидными и гистиоцитарными клетками мест фиксации аллергена, в каких бы органах и тканях он не находился, типична для всех реакций замедленной аллергии.

Медиаторами реакций замедленного типа являются полипептиды, вызывающие повышенную проницаемость сосудов, и в некоторой степени гистамин, выполняющий ту же роль.

Пассивная передача осуществляется, как правило, лимфоцитами, реже альвеолярными макрофагами легких, клетками печени, селезенки, почек. Перенос возможен и с помощью продуктов разрушения клеток, ответственных за замедленную аллергию. Возникает она сразу, без латентного периода. У морских свинок, получивших лейкоциты

больных туберкулезом, удерживается 2—3 месяца. За это время могут исчезнуть и введенные лимфоциты и связанный с ними фактор передачи. Из этого следует, что природа фактора переноса не ясна. Фактор переноса, связанный с лимфоцитами, лишен видовой специфичности и может быть передан от одного вида животного другому и от человека животным.

Для реакций замедленного типа типичен лейкоцитоллиз — разрушение лейкоцитов при контакте со специфическим аллергеном. Реакцию лейкоцитоллиза с диагностическими целями ставят *in vitro*. Она чувствительна и высокоспецифична. В возникновении замедленной аллергии определенную роль играет индивидуальная чувствительность.

Основные критерии реакции замедленного типа. 1. Аллерген фиксирован, циркулирующие антитела, ответственные за аллергию замедленного типа, отсутствуют. Возникновение аллергии связано с лимфоцитами.

2. Пассивная передача осуществляется лимфоцитами.

3. Реакция аллерген-лимфоциты происходит во всех органах и тканях, в которых имеется аллерген.

4. Вызывается часто не белком.

5. Сенсибилизация длительная, десенсибилизация затруднительна.

6. Основные симптомы: клеточная инфильтрация, гиперемия и набухание тканей.

7. Индивидуальная чувствительность выражена.

8. Лейкоцитоллиз *in vivo* и *in vitro* при контакте с аллергеном.

Реакции смешанного типа. Отдельные ученые считают, что большинство аллергических форм болезней смешаны. Чистая немедленная реакция встречается в группе астма — сенная лихорадка, замедленная — при контактной экземе. К смешанным реакциям относят феномен Артюса, аллергию, вызванную медикаментами, паразитами, насекомыми, и такие заболевания человека, как ревматоидный артрит, некоторые формы пурпуры и поражения нервной системы. Липополисахариды бактерий чаще вызывают реакцию немедленного типа, белки — замедленную аллергию. Экспериментально можно получить замедленную, немедленную или обе реакции одновременно и даже на один антиген. У больных стрептококковыми и стафилококковыми поражениями кожи, тонзиллитом наблюдались вначале немедленные кожные реакции, а после их угасания — замедленные (Н. Д. Беклемишев).

Смена реакций хорошо изучена при феномене Артюса, который обычно причисляется к немедленным реакциям. Сущность феномена заключается в том, что если кроликам сделать несколько подкожных инъекций лошадиной сыворотки с интервалом в шесть дней, то после пятого или седьмого введения образуется местный инфильтрат и некроз кожи. В этом процессе отчетливо видны три фазы.

1. Местное сосудистое расстройство, выпотевание экссудата, скопление многоядерных лейкоцитов. В этой фазе возможен пассивный перенос местной анафилаксии циркулирующими антителами.

2. В течение последующих трех дней регистрируется пролиферация одноядерных клеток, являющихся критерием замедленной реакции; падение титра антител.

3. С четвертого дня наблюдают переход мононуклеаров в плазматические клетки.

Аллергия и иммунитет. Вопрос об отношении инфекционной аллергии к антиинфекционному иммунитету, несмотря на исключительную актуальность, не решен в каком-то одном направлении. Аллергию и антиинфекционный иммунитет относят к единому защитному явлению; аллергии приписывают дополнительную, помимо иммунитета, защитную функцию в инфекционном процессе; аллергию рассматривают как вредный фактор инфекционного процесса.

Н. А. Гайский утверждает, что выраженная аллергия при туляремии является бесспорным показателем напряженного иммунитета; Эндере с соавторами нашел прямую корреляцию между аллергией и иммунитетом у лиц, перенесших свинку, другие авторы отметили то же у переболевших чумой. Об антиинфекционной аллергии свидетельствует и феномен Коха: повторное инфицирование больной туберкулезом морской свинки, с выраженной кожной аллергической реакцией, микобактериями приводит к их быстрой элиминации из очага инфекции.

У экспериментально инфицированных туберкулезом животных наблюдали прекращение развития инфекции с появлением аллергии. И наоборот: угасание аллергии вело к диссеминации возбудителя, к обострению болезни. В течение многих десятилетий иммунизация против туберкулеза вакциной БЦЖ свидетельствует о защитной роли аллергии. Как только кожно-аллергическая проба у привитых угасает, так одновременно исчезает и иммунитет к туберкулезу, что является сигналом к повторной прививке. На этом же принципе основана иммунизация живыми вакцинами против туляремии и бруцеллеза. Таким образом, наличие аллергии препятствует суперинфекции, и, следовательно, аллергия, в данных примерах, тождественна иммунитету.

Однако имеются и иные данные. Нитти утверждает, что между иммунитетом к туберкулезу и аллергией нет ничего общего. Иммунитет приводит к разрушению бактерий туберкулеза, а продукты распада — к аллергии. Следовательно, аллергия не причина, а следствие иммунитета к туберкулезу. Об этом свидетельствует и десенсибилизация к туберкулезной аллергии. Ее устранение не снимает иммунитета к туберкулезу. Точно установлено, что естественное угасание кожных реакций к туберкулину и продуктам распада микобактерий не приводит к исчезновению иммунитета, вызванного вакциной БЦЖ. Другие авторы, наоборот, нашли снижение резистентности к туберкулезу у десенсибилизированных морских свинок.

Эксперименты с заражением бруцеллами морских свинок показали: у здоровых животных возбудители быстро продвигаются по лимфатическим сосудам в лимфоузлы, а к шестым суткам прорываются во внутренние органы. У иммунизированных свинок бруцеллы долго задерживались на месте введения, и со значительным запозданием, по сравнению с неиммунизированными, проникали в лимфатические узлы и внутренние органы. Н. Д. Беклемишевым с сотрудниками в опытах с антигенами, извлеченными из бруцелл, и мечеными радиоак-

тивным фосфором и серой установлена фиксация антигена бруцелл в очаге аллергического воспаления. В аналогичных исследованиях у иммунных к бруцеллезу крыс без аллергии фиксации возбудителя в месте его инъекции не было. Следовательно, аллергия и иммунитет могут существовать раздельно и аллергия самостоятельно, без иммунитета способна повышать антиинфекционную резистентность к бруцеллезу, то есть она полезна.

В то же время хорошо и давно известно, что тяжелые бруцеллезные энцефалиты, менингиты, артриты, поражения печени, сердца, костей обязаны своим происхождением аллергии и что ее ослабление вакцинотерапией приводит к выздоровлению. Значит, аллергия вредна и ее устранение десенсибилизацией件 полезно. Н. Д. Беклемишев, анализируя литературу и собственные исследования в вопросе о пользе и вреде аллергии при бруцеллезе, приходит к противоречивому выводу: «В данном случае аллергическая перестройка и полезна и вредна». Трудно более четко определить научный уровень наших знаний по затрагиваемой проблеме. Единство мнений существует разве в представлениях о роли замедленной аллергии в трансплантационном иммунитете. Понятия эти тождественны.

Принципы лечения и профилактики аллергий. Профилактика и лечение аллергии немедленного типа осуществляется много легче аллергии замедленного и особенно смешанного типов. Должно быть правилом при инъекциях чужеродной лечебной сыворотки и гамма-глобулинов, особенно мелким животным, прибегать к десенсибилизации по Безредке. Целесообразно использовать антигистаминные препараты — гистаминазу, димедрол, пипольфен, супрастин и др. Хорошо зарекомендовали себя кортикостероидные гормоны — кортизон, преднизолон. Они снимают или сильно ослабляют анафилаксию. Обладает определенным терапевтическим эффектом хлористый кальций.

Рекомендуют применять иммунодепрессоры (см. «Трансплантационный иммунитет»). Они блокируют пролиферацию кроветворных клеток, биосинтез белка и нуклеиновых кислот. Колхицин наиболее универсальный препарат. Он задерживает пролиферацию клеток, в том числе иммунокомпетентных, и поэтому показан при всех типах аллергий. Его существенные недостатки: ингибирование размножения всех кроветворных, а не только иммунокомпетентных клеток, высокая токсичность, эффекторная доза близка смертельной. Пуроминцин тормозит синтез белка, в том числе иммунных глобулинов; хлорамфеникол угнетает образование РНК.

Общий недостаток иммунодепрессоров — неспецифичность действия. Они блокируют продукцию не определенных, а всех белков и антител, как и в примере с колхицином их терапевтические дозы приближаются к летальным. Тем не менее применение иммунодепрессоров вполне обосновано.

При аллергиях и при пересадке чужеродных органов и тканей большое значение будет иметь профилактическое применение антилимфоцитарной сыворотки. Ее получают от гипериммунных лошадей. Механизм действия этой сыворотки изучен недостаточно. Она снижает

число малых лимфоцитов, лишает их способности реагировать на вещества, стимулирующие трансформацию в другие клетки, ингибирует механизм распознавания антигенов иммунными лимфоцитами, снижает аллергическую воспалительную реакцию, надежно предупреждает отторжение трансплантатов.

Для подавления аллергии замедленного типа применяют рентгеновское облучение, вакцинотерапию. При аллергиях смешанного типа и спонтанных аллергиях реакция аллерген-антитело недостаточно специфична, так как имеются доминантные и второстепенные аллергены. Десенсибилизация в этих случаях затруднительна и не является радикальной.

Аллергия при различных заболеваниях. Рожь свиней. Животные, перенесшие рожу и привитые вакциной, дают отчетливую кожную реакцию на аллерген.

Листериозы. Кролики, зараженные листериями, реагируют на внутрикожное введение полисахаридного аллергена.

Пастереллез. По аналогии с больными пастереллезом людьми, годами реагирующими на внутрикожное введение аллергена, можно ожидать соответствующие реакции и у больных животных.

Туляремия. Имеются единичные сообщения о положительных кожных пробах на тулярии у больных животных. В медицинской практике аллергическая диагностика туляремии является ведущей.

Бруцеллез. Аллергическая диагностика бруцеллеза широко применяется как в ветеринарной, так и в медицинской практике. Из предложенных препаратов наиболее чувствительными и специфичными оказались бруцеллолизат и бруцеллизат. Овцам препараты вводят внутрикожно в область подхвостовой складки или локтевого сустава. Реакцию учитывают через 24—48 часов.

Сап. Аллергическая диагностика сапа у лошадей применяется с конца прошлого века. Она оказалась крайне чувствительной и высоко специфичной. При нанесении маллена на конъюнктиву глаза реакция в форме гнойного конъюнктивита образуется уже через 6—8 часов. Подкожное введение маллена сопровождается лихорадкой через 6—8 часов, местным болезненным, горячим отеком, развивающимся в течение 24—36 часов и удерживающимся до трех суток.

Для диагностики сапа у человека маллен наносят на кожу.

Туберкулез. В ветеринарной практике готовятся туберкулины отдельно из бычьих и птичьих штаммов возбудителей. Крупному рогатому скоту туберкулин вводят внутрикожно, подкожно и в конъюнктивальный мешок. Наиболее чувствительна внутрикожная проба. Реакция проявляется в форме ограниченного воспалительного отека и учитывается через 48—72 часа.

Паратуберкулезный энтерит крупного рогатого скота. Для аллергической диагностики используют паратуберкулин и птичий туберкулин. Большой скот на первый препарат реагирует в 94% случаев, на второй — в 80%. Оба туберкулина инъецируют внутрикожно. При положительной пробе кожная складка утолщена. Ее измеряют специальным циркулем.

Актиномикоз. В ветеринарной практике аллергическая диагностика актиномикоза не разработана, в медицинской применяется широко.

Энизоотический лимфангит. Предложенный в 1948 г. аллерген из культур криптококка зарекомендовал себя с хорошей стороны (97% положительных проб у переболевших животных), как и другой препарат — гистоплазмин.

Лентоспироз. Животные, экспериментально инфицированные *L. icterohaemorrhagiae* и *L. romona*, давали отчетливую высокоспецифическую дифференцированную кожную реакцию замедленного типа.

Инфекционная плевропневмония (перипневмония) рогатого скота. Имеется сообщение о том, что перипневмонийный аллерген может явиться ценным диагностическим препаратом при кожно-аллергической пробе у хронически больных животных.

Аллергическая диагностика может оказаться перспективной при стрептококковых и стафилококковых заболеваниях у животных, при энцефаломielите у лошадей, при многих гельминтозах.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ЧАСТЬ I. ОСНОВЫ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ

<i>Глава 1. Анатомия бактерий</i> (М. В. Земсков)	3
Структура бактериальной клетки	3
Стенка (3). Цитоплазматическая мембрана (6). Цитоплазма с зернистостью и включениями (7). Мезосомы (8). Нуклеоид (9). Протопласты (10). Сферопласты (10). L-формы (11). Жгутики (11). Капсула (14).	
Споры и спорогенез у бактерий	16
Структура (17). Химический состав и антигены (18). Стадии спорогенеза (19). Прорастание спор (19). Превращение ядерного вещества по Красильникову (20). Биологическая роль спор (20).	
<i>Глава 2. Химический состав, ферменты и витамины бактерий</i> (М. В. Земсков)	21
Вода	21
Минеральные вещества	22
Белки	23
Углеводы	25
Липиды	26
Ферменты	27
Оксидоредуктазы (31). Трансферазы (31). Гидролазы (32). Лиазы (34). Изомеразы (34). Лигазы или синтетазы (34).	
Витамины	34
<i>Глава 3. Метаболизм микроорганизмов</i> (М. В. Земсков)	36
Классификация микроорганизмов по способу питания	36
Автотрофы (37). Гетеротрофы (39). Прототрофы (41)	
Механизм обмена веществ	41
Углеводный обмен (42). Белковый обмен (45). Усвоение бактериями минеральных веществ (49).	
Дыхание и брожение	49
Деление бактерий по типу дыхания (49). Типы биологического окисления (51). Выделение и использование бактериями энергии в процессе окисления-восстановления (54).	
<i>Глава 4. Рост и размножение бактерий</i> (М. В. Земсков)	54
Рост (54). Размножение (55). Размножение бактерий в популяции (57). Рост колоний (60)	
<i>Глава 5. Генетическая регуляция метаболизма бактерий</i> (М. И. Соколов, А. Б. Германов)	61
Нуклеиновые кислоты и их роль в метаболизме бактерий	61
Генетическая регуляция биосинтеза бактериальных ферментов	66
Ретроингибирование, как генетический механизм регуляции активности бактериальных ферментов	67
<i>Глава 6. Генетика бактерий</i> (М. В. Земсков)	68
Материальная основа генетической информации, передача ее и изменения	69
Эволюция взглядов на изменчивость бактерий	70
Мутации	70
Методы обнаружения мутантных клеток в популяции (71). Частота мутаций (72). Проявление мутаций (73).	
Мутагены и молекулярный механизм мутагенеза (75). Молекулярный механизм мутаций (76).	
Типы мутантов	80

Мутанты, устойчивые к стрептомицину и пенициллину (80). Ауксотрофные мутанты (80). Ферментативные мутанты (81). Морфологические мутанты (81). Мутации, изменяющие форму колоний (81). Мутанты с измененной антигенностью (82). Мутанты с измененной вирулентностью (82).

Модификации	83
Генетический обмен	83
Трансформация (84). Трансдукция (87). Конъюгация (94). Эпизомы (99).	

ЧАСТЬ II. ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ВИРУСОЛОГИИ

<i>Глава 7. Строение и химический состав вирусов</i> (М. И. Соколов)	104
Морфология и структура вирусов (104). Химический состав и биохимические свойства вирусов (111). Устойчивость вирусов к физическим факторам (117). Устойчивость вирусов к химическим веществам (118).	
<i>Глава 8. Репродукция вирусов позвоночных</i> (М. И. Соколов)	118
Адсорбция вирусов на клетке (119). Проникновение вирусов в клетку (121). Синтез компонентов вирусов (122). Формирование вирионов (127). Дефектные формы вирусов (128). Выход вирусов из клетки (129). Биосинтез компонентов вирусов в бесклеточной системе (129). Цитопатогенное действие вирусов (131). Подавители репродукции вирусов и пути химиотерапии вирусных инфекций (133).	
<i>Глава 9. Культивирование вирусов</i> (М. И. Соколов)	135
<i>Глава 10. Селекция вирусов</i> (М. И. Соколов)	141
Генетические признаки вирусов (141). Фенотипическое проявление генетических признаков у вирусов (144). Обозначение генетических признаков у вирусов (145). Взаимосвязь генетических признаков у вирусов (146). Методы селекции вирусов (148).	
<i>Глава 11. Изменчивость вирусов</i> (М. И. Соколов)	153
Мутации у вирусов	154
Спонтанные мутации (155). Индуцированные мутации (156). Проявление мутаций (162).	
Изменчивость вирусов при пассажах	163
Генетические и негенетические взаимодействия вирусов	167
Методы получения живых противовирусных вакцин	176
<i>Глава 12. Природа, эволюция и классификация вирусов</i> (М. И. Соколов)	177
<i>Глава 13. Противовирусный иммунитет</i> (М. И. Соколов)	182
Специфические факторы иммунитета	182
Неспецифические факторы иммунитета	184
Интерферон (185). Вирусные ингибиторы (192).	

ЧАСТЬ III. ОСНОВЫ ОБЩЕЙ ИММУНОЛОГИИ

<i>Глава 14. Антигены</i> (М. В. Земсков)	195
Вещества с антигенными свойствами (195). Животные антигены (196). Антигены бактерий (198). Протективные (защитные) антигены (202). Синтетические антигены (203). Антигенность (203). Специфичность (204). Механизм действия антигенов (207). Принцип действия ассоциированных антигенов (209).	
<i>Глава 15. Антитела</i> (М. В. Земсков, В. М. Земсков)	209
Реакция преципитации в геле (211). Меченые антитела (213). Природа и свойства антител (214). Структура антител (217). Специфичность антител (221). Индукция биосинтеза антител (222). Биосинтез антител (224). Метаболизм иммунных глобулинов (226). Группы γ -глобулинов (227).	
<i>Глава 16. Современные теории образования антител</i> (В. М. Земсков)	227
Теория прямой матрицы Гауровиц — Полинга (227). Теория непрямо́й матрицы, или инструктивная теория Бернета — Фенера (228). Теория естественной селекции Йерне (228). Клонально-селекционная теория Бернета (228). Теория снятия торможения Сццларда (230). Матрично-генетическая концепция иммуногенеза и его нейрогуморальная регуляция (231).	

<i>Глава 17. Иммунокомпетентные клетки</i> (В. М. Земсков)	234
Плазматические клетки (234). Лимфоциты (238). Ретикулярные клетки (240). Макрофаги (240). Эозинофилы (242). Тучные клетки (242). Тимус (вилочковая железа) (243).	
<i>Глава 18. Соединение антигена с антителом</i> (М. В. Земсков)	245
Реакция антиген — антитело (246). Антигенные особенности комплекса антиген — антитело (251). Биологические эффекты реакции антиген — антитело (252).	
<i>Глава 19. Стимуляция антителообразования и иммунитета</i> (В. М. Земсков)	252
Стимуляторы и воздействия (252). Механизм стимуляции (256). Требования, предъявляемые к стимуляторам (257).	
<i>Глава 20. Ионизирующая радиация и иммунитет</i> (В. М. Земсков)	258
Естественный иммунитет (258). Видовая невосприимчивость (262). Эндогенная инфекция (262). Естественный иммунитет при хронической лучевой болезни (263). Приобретенный иммунитет (264). Аутоиммунные осложнения (267).	
<i>Глава 21. Трансплантационный иммунитет и реакция «трансплантат против хозяина»</i> (В. М. Земсков)	268
Трансплантационный иммунитет (268). Факторы, индуцирующие трансплантационный иммунитет (269). Органы, обеспечивающие трансплантационный иммунитет (269). Механизм трансплантационного иммунитета (270). Отторжение трансплантата (272). Реакция «трансплантат против хозяина» (272). Сущность феномена (272). Формы проявления реакции «трансплантат против хозяина» (273). Механизм реакции «трансплантат против хозяина» (274). Иммунодепрессоры (275).	
<i>Глава 22. Аллергия</i> (М. В. Земсков)	276
Реакция немедленного типа (277). Экспериментальная анафилаксия у морских свинок (277). Пассивная анафилаксия (277). Феномен Шульца — Дейля (278). Механизм анафилаксии (278). Десенсибилизация (антианафилаксия) (279). Основные критерии реакции немедленного типа (279). Реакции замедленного типа (279). Инфекционная аллергия (279). Механизм замедленной аллергии (280). Основные критерии реакции замедленного типа (281). Реакции смешанного типа (281). Аллергия и иммунитет (282). Принципы лечения и профилактики аллергий (283). Аллергия при различных заболеваниях (284).	

Земсков Михаил Васильевич и др.
ОСНОВЫ ОБЩЕЙ МИКРОБИОЛОГИИ,
ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ. М.,
«Колос», 1972.

287 с. с илл.

Перед загл. авт.: М. В. Земсков,
М. И. Соколов, В. М. Земсков.

УДК 576.8+576.858+576.8.097.3](075.8)

Редактор Н. Емельянова.
Художественный редактор М. Северина.
Технический редактор Л. Володченко.
Корректор А. Швецова.

Сдано в набор 19/V 1971 г. Подписано к печати
22/X 1971 г. Т16925 Формат 60×90¹/₁₆. Бумага
тип. № 2. Печ. л. 18. Уч.-изд. л. 20,78. Изд.
№ 192. Т. п. 1972 г. № 243. Тираж 15 000 экз.
Заказ № 1765. Цена 94 коп.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство «Колос», Москва, К-31,
ул. Держинского, д. 1/19.

Ордена Трудового Красного Знамени Ленин-
градская типография № 1 «Печатный Двор»
им. А. М. Горького Главполиграфпрома Коми-
тета по печати при Совете Министров СССР,
г. Ленинград, Гатчинская ул., 26.

94к.