



*Мавров Г.И.*

# Хламидийные инфекции

биология возбудителей, патогенез, клиника,  
диагностика, лечение, профилактика

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ  
ИНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ АКАДЕМИИ  
МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ

# **ХЛАМИДИЙНЫЕ ИНФЕКЦИИ:**

**биология возбудителей, патогенез, клиника,  
диагностика, лечение, профилактика**

МАВРОВ ГЕННАДИЙ ИВАНОВИЧ

Киев, 2006



УДК 616.9:579.882]-07-08

ББК 55.14

М12

**Мавров Г.І.**

**ХЛАМІДІЙНІ ІНФЕКЦІЇ: біологія збудників, патогенез, клініка, діагностика, лікування, профілактика. Монографія. – К., 2005. – 524 с. – Рос. мовою.**

В данной книге широко и подробно, с современных позиций, освещены различные аспекты, связанные с внутриклеточными бактериями хламидиями и заболеваниями, которые они вызывают. Это биологические свойства возбудителей, патогенез хламидиозов, иммунитет, вопросы диагностики, клиники, лечения хламидийных инфекций человека. Обсуждаются социальные проблемы и вопросы общественной и индивидуальной профилактики. Отдельная глава посвящена болезни Рейтера.

Книга предназначена для исследователей, изучающих хламидии и вызываемые ими заболевания, а также для практических врачей различных специальностей.

У даній книзі широко і докладно, із сучасних позицій, висвітлені різні аспекти, пов'язані з внутрішньоклітинними бактеріями хламідіями і захворюваннями, спричиненими ними. Це біологічні властивості збудників, патогенез хламідіозів, імунітет, питання діагностики, клініки, лікування хламідійних інфекцій людини. Обговорюються соціальні проблеми і питання суспільної та індивідуальної профілактики. Окрема глава присвячена хворобі Рейтера.

Книга призначена для дослідників, що вивчають хламідії і спричинені ними захворювання, а також для практичних лікарів різних спеціальностей.

#### **Рецензенты:**

**Скрипаль Иван Гаврилович**, член-корреспондент Национальной Академии Наук Украины, доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом микоплазмологии Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного Национальной Академии Наук Украины

**Проценко Татьяна Витальевна**, доктор медицинских наук, профессор кафедры кожных и венерических болезней факультета последипломного образования Донецкого государственного медицинского университета им. М. Горького Министерства Здравоохранения Украины

*Рекомендовано к изданию Институтом дерматологии и венерологии Академии Медицинских Наук Украины, протокол №3 от 17.03.2005 г.*

ISBN 5-8238-0832-1

© Мавров Г.И., 2005

## ОБ АВТОРЕ

МАВРОВ ГЕННАДИЙ ИВАНОВИЧ, доктор медицинских наук, профессор – известный в Украине врач-дерматовенеролог, научный сотрудник и педагог. Им опубликовано более 200 научных работ, 25 учебно-методических руководств, он автор 8 патентов.

Г.И. Мавров начал свою научную деятельность в 1980 году, когда работал в Студенческом Научном Обществе Харьковского медицинского института, под руководством профессора Б.А. Задорожного. В 1983 году Г.И. Мавров закончил с отличием Харьковский медицинский институт и был оставлен на кафедре дерматовенерологии для научно-педагогической работы. С 1983 по 1985 годы он обучался в клинической ординатуре. В 1985 году Г.И. Мавров избран на должность ассистента кафедры, где проработал до 1993 года. В 1988 году защитил кандидатскую диссертацию: «Выявление хламидийной инфекции с помощью твердофазного иммуноферментного анализа». В 1996 году защитил докторскую диссертацию «Репродуктивная функция у больных хламидиозом и микоплазмозом: оценка состояния, лечение и профилактика нарушений». С 1996 года Г.И. Мавров работает в должности заведующего отделением венерологии Института дерматологии и венерологии Академии Медицинских Наук Украины. Он активно занимается исследованиями в области инфекций, передаваемых половым путем. Г.И. Мавров постоянно участвует в подготовке и аттестации научных и научно-педагогических кадров: подготовил 8 кандидатов наук.

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В отечественной венерологии хламидии относятся к инфекциям нового поколения. Это означает, что ведущая роль хламидий в этиологии воспалительных заболеваний половых органов и в различной экстрагенитальной патологии осознана широким кругом практикующих врачей сравнительно недавно – к началу девяностых годов. Этому в значительной степени способствовала научная и просветительская деятельность ведущих исследователей хламидийных инфекций: профессора Анатолия Альбертовича Шаткина – заведующего лабораторией хламидийных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, вдохновителя и координатора исследований по хламидиям в СССР, и профессора Ивана Ивановича Маврова – директора Харьковского НИИ дерматологии и венерологии МЗ Украины, руководителя изучения проблемы урогенитальных хламидиозов. Написанная этими выдающимися учеными книга (Шаткин А.А., Мавров И.И. Урогенитальные хламидиозы. – К.: Здоров'я, 1983, 200с.) – первое фундаментальное отечественное исследование проблемы половых хламидийных инфекций. С момента опубликования этой книги прошло более двух десятилетий. Наука о хламидиях существенно продвинулась вперед: все больше исследователей стали заниматься этой проблемой. В мировой литературе значительно возросло количество публикаций о хламидиях и хламидиозах, а исследователи со всего мира регулярно собираются на конгрессы, посвященные этим вопросам (Болонья-1988, Стокгольм-1992, Вена-1996, Хельсинки-2000, Стамбул-2002, Будапешт-2004).

Развитие молекулярной биологии позволило больше узнать о жизнедеятельности хламидий и их взаимодействии с клеткой и организмом, а также увидеть перспективу создания профилактических вакцин. Анализ генома привел к выделению новых видов хламидий. Разработка методов диагностики на основе амплификации нуклеиновых кислот, появление новых высокоэффективных антибактериальных средств и средств, стимулирующих защитные силы организма, сделали прорыв в диагностике и лечении хламидиозов.

В последние годы открылась новая роль хламидий в патологии человека, что расширило спектр болезней, связанных с этими возбудителями. Хламидиоз – типичный пример так называемой медленной бактериальной инфекции, основные отличительные черты которой были сформулированы Blaser M.J. и Parsonnet J.L. «Медленные» бактерии могут персистировать в организме хозяина в течение десятилетий или всей жизни, сохраняя патогенные свойства. Иными словами, имеет место третий вариант взаимодействия паразит-хозяин, когда не происходит ни гибели макроорганизма, ни элиминации микроба, а сохраняется равновесие между защитными силами и патогенным влиянием возбудителя. Однако хламидий не просто находятся в организме. Они включают сложный каскад воспалительных и иммунных реакций, которые приводят к постепенному развитию патологических проявлений в пораженных органах. Постоянное антигенное раздражение вызывает истощение или гиперреакцию со стороны иммунной системы. Способность хламидий персистировать в лейкоцитах и лимфоцитах позволяет им попадать в любые органы и ткани, где они могут вызвать самые разнообразные изменения. Многие исследователи связывают с хламидиями атеросклероз, некоторые формы рака, аутоиммунные заболевания. Все это усилило внимание к хламидиям со стороны гинекологов, педиатров, кардиологов, онкологов, невропатологов и других специалистов.



В данной книге освещены различные аспекты, связанные с хламидиями и заболеваниями, которые они вызывают. Это биологические свойства хламидий, патогенез хламидиозов, вопросы диагностики, клиники, лечения различных проявлений хламидийной инфекции человека. Обсуждаются социальные проблемы и вопросы профилактики. Приводятся данные мировой литературы, а также собственные исследования, выполненные в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины. Спорные положения сформулированы на основе консенсуса большинства авторитетных исследователей. Автор старался отразить разные точки зрения.

Раздел «Болезнь Рейтера» написан кандидатом медицинских наук, старшим научным сотрудником Бондаренко Глебом Михайловичем.

Автор выражает благодарность сотрудникам Института дерматологии и венерологии Академии Медицинских Наук Украины за помощь при проведении исследований и в подготовке рукописи.

## ГЛАВА 1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР ИЗУЧЕНИЯ ХЛАМИДИЙ

В нашу историческую эпоху наука развивается весьма стремительно. Результаты научных исследований становятся историей довольно быстро, пожалуй, много быстрее, чем политические события. Альфред Норт Уайтхед (1861-1947) – англо-американский математик, логик и философ, в свое время писал, что те, кто не знает историю, обречены на повторение ошибок предыдущих поколений. Это утверждение в полной мере относится и к науке. Для правильного представления о современном уровне таксономии, биологии хламидий, а также для понимания эпидемиологии и патогенеза заболеваний, вызываемых хламидиями, важно рассмотреть некоторые исторические аспекты данной проблемы. Исследователям и врачам, занимающимся хламидиями и хламидиозами, необходимо знать имена ученых, внесших существенный вклад в развитие науки о хламидиях. В настоящем разделе освещены основные этапы развития науки о хламидиях, начиная с прошлых столетий и кончая 80-ми годами XX века.

### 1.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Своеобразие хламидий, выражающееся в облигатном внутриклеточном энергозависимом паразитизме и уникальном цикле развития, определяет самостоятельное положение этих микроорганизмов в системе прокариотов. Первый представитель данной группы микроорганизмов – возбудитель трахомы, обнаруженный Halberstaedter и Prowazek в 1907 г., был определен как *Chlamydozoon* (*Chlamys* – мантия, *zoon* – животное), на основании представлений авторов о существовании структурной «мантии» клеточного происхождения, покрывающей частицы паразита. То же название было распространено и на морфологически сходные микроорганизмы, вскоре обнаруженные при уретритах, цервицитах и конъюнктивитах, объединенных в то время под общим наименованием «паратрахома». В 30-е годы, когда преобладали гипотезы о риккетсиальной, или вирусной, этиологии трахомы и паратрахоменных инфекций человека, Мошковский (1945) отнес эти агенты к группе цитотропных микробов – *Chlamydozoa*, обозначив их соответственно *Chlamydozoon trachomatis* и *Chlamydozoon oculogenitale*. Открытие возбудителей пситтакоза, венерической лимфогра-

нулемы, а также выявление других родственных этиологических агентов, вызывающих разнообразную патологию у птиц и млекопитающих, сопровождалось появлением у этих микроорганизмов множества эпонимических названий: бедсонии (Bedson), миягаванеллы (Miyagawa), колезии (Coles), рейкеи (Rake) и ряд других. На основании родства этих микроорганизмов по морфологическим показателям, содержанию общего комплементсвязывающего антигена и чувствительности к химиопрепаратам была определена группа так называемых атипичных крупных вирусов пситтакоза-орнитоза, венерической лимфогранулемы, трахомы – группа ПЛТ (пситтакоз, лимфогранулема, трахома) или ОПТ (орнитоз-пситтакоз, трахома) (Терских, 1957, 1979; Bedson, 1953). Акцентируя на различиях между риккетсиями и хламидиями, Jones, Rake и Steams (1945) впервые предложили таксономически обоснованное название *Chlamydia*. Изменение наименования рода *Chlamydozoon* на *Chlamydia* отражало несоответствие «*zoon*» сложившимся представлениям о природе этих микроорганизмов. В то же время старый корень «*chlamys*» в родовом и видовых наименованиях был сохранен (Jones, et al. 1945). Во избежание возникновения противоречий в решении этого вопроса и в память об исследованиях Bedson, Meyer в 1953 г. предложил обозначать возбудителей пситтакоза термином *Bedsonia*. С исторической точки зрения применение данного термина обоснованно, но предпочтение было отдано названию *Chlamydia*. В 7-ом издании Определителя бактерий Bergey (1957) эти микроорганизмы вместе с вирусами заняли положение в классе *Microtobiotetes*, порядке *Bickettsiales*, в семействе *Chlamydiaceae*, в родах *Chlamydia*, *Miyagawanella*, *Colesiota*, *Bicolesia*, *Colettsia*. Род *Chlamydia* объединял 2 вида: *Chlamydia trachomatis* (возбудитель трахомы) и *Chlamydia oculogenitale* (возбудитель паратрахомы – конъюнктивита с включениями, уретрита и цервицита). Возбудитель венерической лимфогранулемы представлял самостоятельный вид рода *Miyagawanella* – *M. lymphogranulomatosis*.

Гипотеза о вирусной принадлежности хламидий была отвергнута на основе разработанных в 60-х годах критериев, определяющих вирусную природу микроорганизмов. В 1965 г. решением Комитета по номенклатуре вирусов микроорганизмы группы ПЛТ были исключены из рода *Vira*. Анализ биологического своеобразия рассматриваемых патогенных агентов позволил выделить их в системе микроорганизмов в самостоятельный порядок (Шаткин, 1965). Новый порядок был обозначен *Halprowiales* с учетом приоритета Halberstadter и Prowazek. Микроорганизмы были определены как гальпровии, а вызываемая ими патология – как гальпровииозы. Одновременно была разработана подробная классификация порядка до уровня видов. Возбудитель урогенитальной и сочетанной с ней глазной патологии определяли как вид *Halprowia paratrachomatis seu oculogenitale*, а возбудитель венерической лимфогранулемы – как вид *Miyagawanella lymphogranulomatosis* (Шаткин, Бароян, 1969). В 1966 г. Page выступил с предложением объединить всех представителей группы ПЛТ в единый род – *Chlamydia*, а в 1968 – отнести их к двум его видам: *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia psittaci*. В дальнейшем Storz (1971) поддержал предложение Page о выделении этих микроорганизмов в самостоятельный порядок, но обозначил его как *Chlamydiales*. Эти предложения о новом порядке, едином роде и двух видах были поддержаны Национальным таксономическим комитетом США, что нашло отражение в 8-ом издании Определителя бактерий Bergey (Bergey's Manual Determinative Bacteriology, 1974). Согласно решению Юридической комиссии Международной Ассоциации Микробиологических обществ, с 1 января 1980 г. название *Chlamydia* для рассматриваемых микроорганизмов стало обязательным.

## 1.2. ПАТОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Заболевания, вызываемые хламидиями, были известны в глубокой древности. В XV веке до нашей эры в древнеегипетских папирусах упоминается экссудативное заболевание глаз, по описанию напоминающее трахому. Дошедшие до наших дней древние рукописи свидетельствуют, что это заболевание имело место в Китае, Греции и Риме. В 60-е годы нашей эры врач с острова Сицилия Педаний Диаскаррид (*Pedanius Dioscorides*) впервые ввел термин «трахома», что обозначало «шероховатый». Позднее Гален подробно описал клиническую картину, выделив четыре стадии трахомы. В средние века трахома попала в Европу с Ближнего Востока – в результате крестовых походов. Известно, что возвращение армии Наполеона после похода в Египет вызвало новую эпидемию трахомы в Европе.

Robert Koch считал, что трахома вызывается бактерией *Haemophilus aegyptius*, которую он выделил от больных «египетской офтальмией» в 1883 г. Истинная этиология трахомы была установлена Halberstaedter и Prowazek в 1907 г., наблюдавшими цитоплазматические включения внутри конъюнктивального эпителия (тельца Гальбершtedтера-Провачека) у больных и экспериментально зараженных от них орангутангов. Эти авторы отметили также наличие сходных включений в конъюнктивальных мазках у детей с негонекокковой офтальмией (Halberstaedter, Prowazek, 1907, 1910). При изучении в световом микроскопе соскобов конъюнктивы больных трахомой, окрашенных по методу Романовского-Гимзы, в эпителиальных клетках были обнаружены цитоплазматические включения – колонии возбудителя. В этих тельцах содержалось два типа округлых частиц. Мелкие частицы (размером 0,25 мкм) окрашивались в фиолетово-красный, а более крупные частицы – в синий цвет. Оценив мелкие частицы как инфекционные элементарные тельца возбудителя трахомы, авторы полагали, что крупные формы представляют собой те же тельца, но укутанные подобно мантии (*Chlamys*) гипотетическим реактивным клеточным субстратом – пластином. Отсюда и возникло название *Chlamydia* (от греческого *chlamys* – мантия), для обозначения матрикса вокруг элементарных телец, наблюдаемых при окраске по Гимзе. Позднее Lindner (1909, 1910) обоснованно отверг гипотезу о наличии пластина и описал крупные формы микроорганизма как «инициальные» тельца, ошибочно приписывая им активную вирулентную функцию. Вскоре аналогичные цитоплазматические включения были обнаружены в соскобах слизистой оболочки при небактериальном поражении глаз, или «бленнорее с включениями» новорожденных, а также при цервиците у матерей этих новорожденных и уретрите негонорейной этиологии у мужчин (Neumann, 1910). В последующем тельца Гальбершtedтера-Провачека были определены и при других формах известных ныне инфекций хламидийной этиологии. Посредством инокуляции в конъюнктиву обезьян содержимого соскобов пораженных хламидиозом глаз у детей, соскобов из шейки матки их матерей и выделений из уретры их отцов, больных негонекокковыми уретритами (НГУ), было установлено наличие взаимосвязи между глазными и генитальными инфекциями, вызванными *C. trachomatis*. У обезьян развивалось специфическое поражение конъюнктивы с аналогичной клинической картиной независимо от того, от кого был взят материал (Fritsch et al., 1910). Таким образом, в первом десятилетии XX века были получены основные данные об эпидемиологии генитального хламидиоза – его роль в этиологии НГУ и поражениях глаз у новорожденных, а также возможность передаваться половым путем и при родах.



Дальнейшее изучение проблемы сдерживалось невозможностью культивирования *C. trachomatis* в лабораторных условиях. Было окончательно установлено, что хламидиоз поражает и глаза, и половые пути. Это подтверждалось при прямой передаче заболевания в конъюнктиву добровольцев и в результате случайного профессионального заражения. Описано попадание зараженной крови в глаза гинеколога во время производимого им выскабливания, что привело к развитию конъюнктивита с включениями. Было описано также развитие инфекционного поражения глаз у медицинской сестры, ухаживавшей за ребенком, страдавшим конъюнктивитом с включениями (Thygeson, Mengert, 1936). В основополагающем исследовании Thygeson и Stone (1942) была показана эпидемиология окулогенитальных хламидиозов. Авторы сообщили об обследовании 100 мужчин с уретритами, среди которых включения были найдены у 7 человек с гонореей и у 2 – с НГУ. Специфичность включений продемонстрирована экспериментальным исследованием – инокуляцией соскобов в конъюнктиву обезьян-бабуинов. В этой работе отмечена взаимосвязь появления конъюнктивитов с включениями у детей, у отцов которых наблюдались уретриты. В СССР была в свое время создана система эпидемиологического надзора за офтальмохламидиозами на эндемичных по трахоме территориях (Вайсблат, 1968; Вайсблат и соавт., 1982).

Патология суставов, клинически схожая с болезнью Рейтера, которая вызывается хламидиями, была известна еще врачам средневековья. Miehle (1983) считал, что первое описание того, что в настоящее время называется болезнью Рейтера, представил судовой врач Христофора Колумба после возвращения из второй экспедиции в 1496 г. В 1786 г. Hunter описал больного с артритом и уретритом. Болезни суставов, связанные с уретритами, описали Fournier (1868), Launois (1899). В 1900 году в «Русском архиве патологии, клинической медицины и бактериологии» (т. 9, с. 365) В. Станиславский привел первое в отечественной литературе описание данной болезни. Позднее в «Русском журнале кожных и венерических болезней» появились статьи Зеленева (1912, т. 24, с. 202) и Богрова (1916, т. 32, с. 108), которые были посвящены поражению суставов у больных с уретритами. До 1948 года было опубликовано 152 наблюдения данного заболевания. В 1948 году Raponen подробно проанализировал 344 случая уретро-окуло-синовиального синдрома в Финляндии. В дальнейшем количество публикаций стало возрастать. Ильин (1962) нашел в ранней литературе данные более чем о 1000 подобных случаев. Наиболее цитируемыми впоследствии оказались две статьи французских и немецких врачей, которые были признаны приоритетными без достаточных на то оснований, поскольку упомянутые ниже авторы не считали заболевание венерическим. В 1916 г., практически одновременно, Fiessinger и Leroy во Франции и Reiter в Германии детально описали сочетание уретрита, конъюнктивита и артрита. Reiter обнаружил в крови у наблюдавшегося им больного спиралевидный микроорганизм и назвал заболевание «артритический спирохетоз» (Amor, 1977). Интересно, что спустя 45 лет, в 1961 году, на X конгрессе ревматологов в Риме Reiter вновь вернулся к этому заболеванию и сделал программный доклад. Английский хирург Brodie в своей книге, вышедшей в 1918 г., привел описание нескольких больных с уретритом, артритом и конъюнктивитом, у которых заболевание имело хроническое, рецидивирующее течение. В 1954 году симпозиум по негонококковым уретритам в Монако предложил новый термин для этого заболевания – «уретро-окуло-синовиальный синдром». Тареев (1953) считал уретро-окуло-синовиальный синдром проявлением ревматоидного артрита, однако он не отрицал возможной ведущей роли инфекции в этиологии

этого заболевания и рекомендовал в комплекс лечения включать противомикробную терапию. Morton (1958), а затем Kosvara (1961) и Кольчинский (1964) предположили, что уретро-окуло-синовиальный синдром имеет венерическое происхождение. Порудоминский (1963) также рассматривал указанный синдром как осложнение венерического негонеококкового уретрита. О венерической этиологии уретро-окуло-синовиального синдрома свидетельствовала редкость его регистрации у детей. Шахова (1961), а также Батюнина и Концевая (1962) описали 4 случая болезни Рейтера у детей.

Предположение Reiter об этиологической роли найденной им спирохеты при уретро-окуло-синовиальном синдроме не подтвердилось. Dunham, Rock, Belt (1947) выделили из уретры и конъюнктивы больного с данным синдромом фильтрующий «вирус», патогенный для мышей. Некоторые клиницисты у больных с этим синдромом находили в соскобах со стенок уретры или конъюнктивы цитоплазматические включения, морфологически идентичные включениям, образуемым организмом *Chlamydozoon oculogenitale*. В пятидесятые годы среди возможных причин уретро-окуло-синовиального синдрома внимание стали привлекать так называемые перипневмониеподобные организмы (ПППО). Многие авторы (Dines, 1948; Oates, Whittington, Wilkinson, 1959; Weinberger и соавт., 1962) обнаруживали ПППО при уретро-окуло-синовиальном синдроме. Кричевский с соавторами (1954) и Шахова (1961) считали данный синдром самостоятельным заболеванием – астеромикозом, вызываемым бактериями, которых авторы вырастили на искусственных питательных средах (мартемовский бульон) и назвали *Asteromyces hominis*. Однако последующие исследования опровергли это утверждение. Овчинников и Лурье (1958) считали выделенных Кричевским и сотрудниками «возбудителей» L-формами гонококка и сопутствующей флоры уретры. Истинная этиология уретро-окуло-синовиального синдрома была окончательно установлена Siboulet и Galistin (1962), которые смогли выделить из уретры больных с этим синдромом хламидии и культивировать их в куриных эмбрионах. Жодзишский (1966) описал несколько случаев болезни Рейтера, однако выделить хламидии путем заражения куриных эмбрионов материалом, полученным из уретры больных, ему не удалось.

История изучения зоонозной хламидийной инфекции начинается с конца XIX века, когда в 1876 г. Jurgenson описал два случая атипичной пневмонии в результате контакта с попугаями. Семейная вспышка сходного заболевания была описана Ritter (1879) в Швейцарии под диагнозом «пневмотиф» в доме, где были больные попугаи. Аналогичное заболевание отметил Finkler (1882). В 1893 г. Haedke описал это заболевание как эпидемическую пневмонию, а Leichtenstein (1899) – как альвеолярную пневмонию с тифозными симптомами. Роль попугаев в распространении пситтакоза была окончательно установлена в 1892 г. во время вспышки в Париже, когда заболели 70 человек, из них умерли 24. Источником инфекции были попугаи, завезенные из Буэнос-Айреса. Заболевания, связанные с попугаями, наблюдались до 1896 г. (Движков, 1935). Nocar (1893), изучая этиологию этих заболеваний, выделил микроб из костного мозга погибшего попугая и назвал его *Bacillus psittacosis*, но этот микроорганизм оказался *Salmonella typhimurium*. Morang (1895) предложил наименование болезни «пситтакоз» (*psittacus* – попугай). В результате на долгие годы сохранилось представление о том, что только попугаи могут быть источником этой инфекции. В 1909 г. была вспышка пситтакоза в Цюрихе, связанная с волнистыми попугаями (*Melapsittacus undulatus*) из местного питомника (Haagen, 1939). Самая крупная эпидемия пситтакоза, которую называют пандемией,

вспыхнула в 1929-1930 гг., когда заболевание было зарегистрировано в 34 городах Европы и Америки. Большинство авторов считали, что инфекция распространялась попугаями, завезенными из Южной Америки. В Европе заболевания регистрировались в портовых городах – по пути следования торговцев птицами (Varros, 1939). Эпидемия пситтакоза (орнитоза) 1929-1930 гг. охватила 12 стран Европы и Америки. Очевидно, распространение инфекции, произошло к этому времени среди разных видов птиц в местных питомниках, птичниках и зоомагазинах. Эта же инфекция была выявлена у чижей, зябликов, снегирей, дроздов, канареек, голубей и многих других видов птиц. В 1938 г. впервые была доказана роль птиц непопугайных пород в инфицировании человека орнитозом – при изучении природы атипичной пневмонии, вспышки которой наблюдались ежегодно осенью (с 1933 по 1938 г.) среди жителей Фарерских островов. Источником инфекции оказались птенцы североатлантического глупыша (*Fulmarus glacialis*), мясо которого местные жители заготавливали как продукт питания. Заболевания сопровождались высокой летальностью, особенно среди беременных женщин. Штаммы возбудителя, выделенные из секционного материала больных и из органов птиц, были идентифицированы как штаммы пситтакоза (Rasmussen-Ejde, 1938; Naagen, Mayer, 1938). В 1940 г. впервые возбудитель был изолирован от домашних голубей (Pinkerton, Swank, 1940; Coles, 1940). В 1941 г. была впервые описана семейная вспышка орнитоза в результате заражения от домашних голубей, 1 из 6 заболевших умер. Тяжелые формы болезни с высокой температурой чаще отмечались при инфицировании людей от индек (Rosen, 1955), от белой цапли (Olsen, Larsen, 1944; Rubin Kissling, Chamberton, 1951), от иволги (Grimm, 1953), а в отдельных случаях – и от домашних голубей (Meyer, 1941). Было предложено применять единое наименование орнитоз, считая пситтакоз лишь частным случаем орнитоза (Терских, 1957, 1964). В настоящее время известно, что источником этой инфекции могут быть более 132 видов птиц 28 семейств из 19 отрядов, включая морских птиц, гнездящихся в Арктике и Антарктике (Терских, 1979; Смирнов и соавт., 1971). Попугаи составляют лишь один отряд с весьма ограниченным ареалом.

В 1930 г. Bedson, Western и Simpson фильтратом взвеси органов павшего попугая впервые воспроизвели инфекцию у здоровых птиц и на этом основании стали считать возбудителем пситтакоза фильтрующийся вирус. В том же году, одновременно и независимо друг от друга, трое исследователей описали морфологию возбудителя пситтакоза: в Германии Levinthal (1930) обнаружил в мазках из органов и серозного экссудата предсердия больного попугая плеоморфные коккоподобные тельца и назвал их *Microbacterium multiforme psittacosis*. В Англии Coles (1930) описал «тонкобациллярные тельца», обнаруженные в органах птиц и зараженных животных, определив их как корпускулы, сходные с риккетсиями. В Америке Lillie (1930) обнаружил внутриклеточные включения при исследовании секционного материала погибших людей и в тканях экспериментально зараженных животных. Эти включения автор назвал *Rickettsia psittaci*. В 1934 году Bedson и Bland установили этиологическую роль хламидий в возникновении пситтакоза – антропозоонозной инфекции, передающейся людям от птиц. Было показано сходство в жизненных циклах хламидий, выделенных от человека и от животных. В 1935 году Meyer и Eddie назвали возбудитель пситтакоза «LCL-тельцами» (по начальным буквам фамилий трех вышеназванных авторов – Levinthal, Coles, Lillie), современное название возбудителя – *Chlamydoxyla psittaci*. Krumwide, McQrath и Oldenbush (1930), а также Gordon (1930) установили высокую восприимчивость к пситтакозу белых мышей, а Rivers и Barri (1935) впервые использовали белых мышей для



выделения возбудителя из мокроты и крови больных. Bedson и Bland (1932) описали морфогенез и цикл развития возбудителя *in vivo*, а Bland и Canti экспериментально – в культуре ткани (1935).

В Советском Союзе орнитозом серьезно занялись после вспышки атипичной пневмонии на Братцевской птицефабрике в 1948 г. Возбудитель был изолирован от больных людей и от внешне здоровых уток. Были изолированы возбудители от голубей, попугаев и от диких птиц, главным образом водного и околородного комплекса. Впервые были установлены вторичные очаги орнитоза в результате занесения инфекции в птицеводства дикими птицами (Терских, 1957, 1962). Клиническое проявление орнитоза у человека было подробно описано Курашовой (1951), а затем Ратнер, Брушлинской, Майорчук и Комоловой (1955), Рейнберг, Розенталь, Каплуновой-Сергеевой (1955), Зейтленок и Галушкиным (1964). Наиболее детальные исследования были проведены Ильинским (1961, 1974) и Казанцевым (1964, 1973), Маликовой (1969, 1971). Этими авторами были четко выделены и описаны острые, хронически рецидивирующие и латентные формы орнитоза, а также осложнения; отрабатана этиологическая диагностика орнитоза с применением: метода выделения в куриных эмбрионах, внутрикожной пробы и реакции связывания комплемента.

### 1.3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Важнейшим этапом в изучении хламидий стало выделение возбудителя трахомы Tang и соавторами в 1957 году. Для его культивирования применили развивающиеся куриные эмбрионы, которых заражали в желточный мешок соскобным материалом от больных трахомой. В первых опытах защиту эмбрионов от сопутствующей инфекции осуществляли пенициллином, но вскоре было отмечено, что он неблагоприятно действует на хламидии. В этой же работе сообщается о наличии у *C. trachomatis* чувствительности к тетрациклину и резистентности к аминогликозидам. Данные Tang и его сотрудников вскоре подтвердили и другие исследователи, в частности Collier и Sowa (1958) выявили серологическую взаимосвязь между изолятами из желточных мешков куриных эмбрионов и микроорганизмами из группы трахомы. В своих последующих работах тот же Collier вместе с Duke-Elder и Jones (1958) установили, что передача возбудителя от человека к человеку вызывает трахому при экспериментальном заражении.

Впервые из урогенитального тракта мужчин *C. trachomatis* выделили Jones, Collier и Smith (1959). Серия клинических исследований была проведена научными группами в Институте офтальмологии в Лондоне (Jones et al., 1964; Dunlop et al., 1964; Al-Hussaini et al., 1964). *C. trachomatis* была выделена из шейки матки матерей и уретры отцов детей, у которых наблюдались конъюнктивиты с включениями. Возбудителя находили в выделениях из уретры мужчин при конъюнктивитах с включениями, а также у мужчин, имевших половой контакт с женщинами, страдавшими такими конъюнктивитами. При исследовании НГУ применялся метод культивирования на желточных мешках куриных эмбрионов. В Англии Dunlop, Harper, Al-Hussaini (1966) получили изоляты *C. trachomatis* у 4 из 10 обследованных мужчин, а в США Holt и соавт. (1967) выделили хламидии у 5 (15%) из 33 больных с воспалительными проявлениями со стороны мочеполовых органов. Авторы определили наличие хламидий в соскобах у 6 (42%) из 42 женщин, посещавших клинику венерических болезней. Dunlop и соавт. (1967) впервые выделили возбудителя в соскобах шейки матки у 14 (35%) из 40 обследованных женщин.

Таким образом, с помощью культивирования хламидий на куриных эмбрионах вновь были подтверждены основные эпидемиологические факты, относящиеся к хламидиозу: связь с негонококковыми воспалительными заболеваниями половых органов (ВЗПО), передача половым путем, взаимосвязь ВЗПО у взрослых и глазных поражений у детей.

Методика культивирования возбудителя на желточных мешках куриных эмбрионов была дорогостоящей, сложной и не исключала возможности ложного выделения возбудителя в результате перекрестной контаминации исследуемого материала. Хотя ее применение позволило добиться существенных успехов, для крупномасштабных исследований она была непригодна. Метод был длительный, дающий ответ не ранее чем на 7-й день. Чтобы поднять чувствительность, необходимо было провести серию из 2-3 слепых пассажей, что увеличивало время исследования до 3-4 недель и усиливало вероятность микробного загрязнения. Значительное влияние на чувствительность метода оказывали и сезонные колебания восприимчивости эмбрионов к инфекции (Jawetz, 1962).

Большим достижением явилось внедрение Gordon и Quan (1965) метода культивирования *C. trachomatis* на монослойных культурах клеток, включающего окраску клеток для демонстрации включений. Относительная простота методики позволяла исследовать большое число клинических образцов, и вскоре было отмечено, что она значительно более чувствительна, чем ранее применявшаяся методика культивирования в желточных мешках куриных эмбрионов. Dunlop с соавторами (1969) установили, что метод можно использовать для выделения хламидий из генитального тракта, прямой кишки, глаз и из других органов. Они еще раз продемонстрировали наличие взаимосвязи глазных и генитальных поражений и показали, что возбудитель выделяется у мужчин с НГУ и у женщин, с которыми они находились в половом контакте. На Симпозиуме по трахоме и сопутствующим болезням, проходившем в Бостоне в 1970 г., Gordon и Quan представили обзор штаммов *C. trachomatis* (выделенных из генитального тракта людей), в котором были обобщены результаты работ пяти лабораторий. С использованием метода тканевых культур возбудитель обнаруживали у лиц с НГУ в 12-42% случаев. Выделение хламидий проводилось с помощью метода культивирования клеток (Hella-229, L-929). Несмотря на такие достоинства этого метода, как 100% специфичность и очень высокая чувствительность, и у него имелись недостатки (Шаткин и соавт., 1981). Чувствительность метода не была абсолютной. Например, выделить хламидии из шейки матки удавалось не более чем у 90% матерей новорожденных, заболевших хламидийным конъюнктивитом или пневмонией (Шаткин, Мавров, 1983). Данные серологии и двукратного исследования на выделение хламидий в культуре клеток показывают, что метод не выявляет хламидийной инфекции в 10-15% при уретрите у мужчин и в 20-25% при цервиците у женщин, хотя специфичность метода, несомненно, 100% (Ripa, Mardh, 1977). При выделении хламидий в культурах клеток с целью диагностики урогенитальных хламидиозов имела значение выживаемость хламидий в образцах, если не было возможности сразу осуществить заражение культуры. Хранение клинических образцов от +4 до -7°С даже в течение 1 суток снижало выявляемость хламидий на 60-80% (Reeve et al., 1975). Слабостью этого метода являлась его продолжительность и трудоемкость. Результаты получались не раньше чем через 2-3 дня. Другим недостатком являлось ограниченное число обследований, одновременно проводимых в лаборатории. Все это служило препятствием для широкого применения этого метода в лабораториях лечебно-профилактических учреждений.

Трудности, возникающие при культивировании *C. trachomatis* в лабораторных условиях, привели к необходимости поиска серологических методов. Первоначально применялся лишь метод комплементфиксации с групповым (родоспецифическим) антигеном пситтакоза или венерической лимфогранулемы, который в отечественной литературе получил название РСК – реакция связывания комплемента (Попович, 1978). Он применялся для диагностики венерической лимфогранулемы, возбудитель которой обладает сильной иммуногенностью, и при системных хламидиозах, вызванных урогенитальными штаммами *Chlamydia trachomatis*, когда антигенное раздражение значительно. Однако РСК с групповым антигеном не могла служить для этиологической диагностики большинства форм урогенитального хламидиоза, а применялась только для диагностики орнитоза и хламидиоза зоонозной природы (Терских, 1979; Гнутов, Ерохина, 1980). Тест обладал недостаточной чувствительностью для диагностики конъюнктивита с включениями или НГУ.

Применялась также реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Впервые возможность использования РНГА при орнитозе была показана в 1958 году Benedict и O'Brien. Однако эти работы не получили развития в силу трудоемкости предложенной методики. Аналогичные исследования были выполнены в 1964 году Terper и Gordon при трахоме. При этом в качестве диагностикума авторы использовали эритроциты, сенсibilизированные антигенным комплексом, содержащим как групповой, так и узкоспецифический компонент (Ориэл, Риджуэй, 1984). В 1973 году Belden и McKercher использовали РНГА при диагностике абортос крупного рогатого скота хламидийной этиологии. Различные варианты этого метода разрабатывались в 1970-х годах в Пермском институте вакцин и сывороток Горовиц и Тимашевой (1976, 1978). Авторы показали, что реакция непрямой гемагглютинации с фосфолипидным антигеном возбудителя орнитоза характеризуется достаточной чувствительностью и специфичностью и что тест может быть использован для серологической диагностики орнитоза и для выявления антигенов возбудителя.

Большим шагом вперед стало применение принципа иммунофлуоресценции для диагностики хламидиозов. Наибольшие преимущества имел метод микроиммунофлуоресценции (МИФ), разработанный Wang (1971) и позволивший осуществить серотипирование штаммов *C. trachomatis*. Для изучения антител в сыворотке, слезах, отделяемом из полового тракта применялся специфический антиген. Dwyer, Treharne и соавт. (1972) продемонстрировали специфичность метода МИФ, возможность дифференциации *C. psittaci* и *C. trachomatis*, а также определили антитела к отдельным серотипам в сыворотке инфицированных больных. Реакция микроиммунофлуоресценции (МИФ) была применена для дифференциации возбудителей трахомы *in vitro*. Затем, S.P. Wang и J.T. Grayston (1974) применили непрямой ее вариант для изучения перекрестных реакций различных представителей вида *Chlamydia trachomatis*, а в дальнейшем использовали для изучения серологии инфекций, вызванных *Chlamydia trachomatis* у людей. Метод оказался высокочувствительным и специфичным и позволил отдифференцировать 15 иммунотипов (серотипов) *Chlamydia trachomatis*. Значительным неудобством являлось то, что антиген для МИФ надо было готовить *ex tempore*. Это вызывало необходимость поддерживать культуру клеток или хранить антиген при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Позже Hanna и Keshyshian (1980) предложили использовать формализированную суспензию, приготовленную путем дифференциального центрифугирования, которую можно было длительно хранить при  $+4^{\circ}\text{C}$  и использовать по мере надобности. Однако, несмотря на упрощения МИФ, трудности получения и стандартизации антигена продолжали оставаться основным



недостатком метода. Имелись попытки применить для выявления антител к хламидиям другие иммунологические методы: гемолиз в геле, реакция нейтрализации клеток, меченных флуорохромом, встречный иммуноэлектрофорез, иммунная адгезивная гемопреципитация, иммунофлуоресцентная реакция микроагглютинации (Горовиц, Тимашева, 1978, 1981). Gerloff, Wastson (1967) применили для диагностики орнитоза радиоиммунопреципитацию. Этот метод, как и все радиоиммунные методы, отличался очень высокой чувствительностью. Тем не менее он не мог широко применяться из-за сложности работы с радионуклидами.

При урогенитальном хламидиозе серодиагностика оказалась неэффективной, поскольку уровень антител не всегда коррелировал с наличием активной инфекции. Для обнаружения цитоплазматических включений хламидий в клетках мочевого тракта применялись различные методы окраски – по методу Романовского-Гимза, раствором Люголя, выявлявшим содержащийся во включениях *Chlamydia trachomatis* гликоген, окраска метиленовым зеленым и нейтральным красным (Woodland et al., 1982). Общим недостатком всех методов окраски включений была недостаточная чувствительность. Специфичность, а также чувствительность, сильно зависела от умения и навыков лаборанта и качества взятия материала. Отличие включений от артефактов требовало напряжения внимания исследователя, поэтому и пропускная способность этих методов была невелика (Hipp, 1987). Метод флуоресцирующих антител (МФА) для выявления антигенов хламидий был разработан в прямой и непрямой модификациях (ПИФ и НИФ). Различные варианты ПИФ на основе овечьей антисыворотки, меченной флуоресцеином, предложены НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР (Шаткин и соавт., 1974, 1976). По сравнению с методами окраски, выявляющими включения хламидий в клетках, МФА был гораздо чувствительнее. Кроме того, он мог выявлять внеклеточно расположенные хламидии, что не позволяло сделать другие методы окраски. Недостатком МФА на основе поликлональных антисывороток являлась неспецифическая флуоресценция, которая затрудняла оценку внеклеточно расположенного антигена. Метод требовал наличия хламидийной антисыворотки, был сложен в постановке и требовал специального иммунологического контроля (Наппа, 1977). Существенно повысилась чувствительность и специфичность МФА для выявления антигенов хламидий в материале от больных при применении моноклональных антител. После того как Stephens в 1982 году были получены первые клоны мышиных гибридов, вырабатывающих антитела к *Chlamydia trachomatis*, появились диагностические наборы выявляли антигены хламидий, расположенные как внутри эпителиальных клеток, так и в секретах. В 1980-х годах было проведено много исследований диагностической ценности этих тест-систем. При диагностике различных форм урогенитального хламидиоза специфичность оценивается в 79-90% и более, а чувствительность – как близкая к 100% (Stamm, Holms, 1984; Tam et al., 1984; Thomas et al., 1984; Гомберг и соавт., 1986).

Значительным шагом вперед стало применение иммуноферментного анализа (ИФА) для диагностики хламидиозов в конце 70-х – начале 80-х годов. Этот метод позволял выявлять как антитела в сыворотке крови, так и антигены в очагах поражения. Для выявления антигенов хламидий ИФА был впервые применен группой исследователей под руководством А.А. Шаткина в НИИЭМ им. Гамалеи АМН СССР в 1974 году. Это был прямой иммунопероксидазный метод (Шаткин и соавт., 1976; Панкратова, 1980). Он обладал рядом преимуществ по сравнению с методом флуоресцирующих антител: простотой выполнения, использованием световой микроскопии, длительно сохраняющимися препаратами, возможностью индикации антигенов хламидий

как внеклеточной, так и внутриклеточной локализации. Позже этот метод был усовершенствован Hsu и соавторами (1981), а применение Duggan и соавторами (1986) системы «авидин-биотин» и моноклональных антител позволило существенно увеличить его чувствительность и специфичность.

Первое сообщение о применении твердофазного ИФА для выявления антител к хламидиям сделали Lewis и соавт. в 1977 году. В качестве антигена авторы использовали элементарные тельца (ЭТ) *C. psittaci*, выделенные от попугая. Авторы исследовали сыворотки от больных пситтакозом, венерической лимфогранулемой и контрольную группу. Результаты хорошо коррелировали с РСК. ИФА в этом случае был в 4-5 раз чувствительнее РСК. Skaug с соавт. (1982) определили с помощью ИФА хламидийные антитела в сыворотке крови больных острым сальпингитом. В качестве твердой фазы использовались плоскодонные планшеты, антигеном служили ЭТ *Chlamydia trachomatis* L-2, полученные из зараженной культуры с помощью разрушения клеток ультразвуком с последующим ультрацентрифугированием. Из 34 больных острым сальпингитом у 29 (85%) были выявлены IgG-антитела к *Chlamydia trachomatis* в титрах 1:8 и выше. 16 парных сывороток дали 4-кратное и более повышение титров. В отличие от вышеописанных работ, Evans и Taylor-Robinson (1982) использовали антиген, полученный из желточных мешков куриных эмбрионов, зараженных *Chlamydia trachomatis* SA2(f). С помощью ИФА авторы выявляли IgG- и IgM-антитела к *Chlamydia trachomatis* в сыворотке крови больных урогенитальными хламидиозами людей и экспериментально зараженных обезьян. Levy с соавт. (1983), используя в качестве антигена ЭТ *Chlamydia trachomatis* L-2, добились большой чувствительности за счет более тщательной очистки антигена. ИФА оказался более чувствительным, чем РСК, и показал примерно одинаковую чувствительность с МИФ.

В приведенных выше работах определялись в основном антитела к *Chlamydia trachomatis*, принадлежащие к G-классу иммуноглобулинов. Sevenini и соавт. в 1984 впервые исследовали сыворотку на IgG- и IgA-антитела к *Chlamydia trachomatis*, применив твердофазный ИФА для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Авторы использовали ЭТ *Chlamydia trachomatis* L-2 (BU-434) в качестве антигена. Средний геометрический титр антихламидийных антител в ИФА был 1:229; а в МИФ – 1:29, что указывало на хорошую чувствительность метода. В 1985 году Jepum предложил вариант твердофазного ИФА для определения IgG- и IgM-антител к хламидиям с использованием группового (родоспецифического) антигена. Это фосфолипид, полученный путем экстракции в ацетоне из оболочки желточного мешка куриного эмбриона, зараженного штаммом *Chlamydia trachomatis*, выделенным из конъюнктивы. В середине 80-х годов в Харьковском НИИ дерматологии и венерологии МЗ УССР был разработан вариант ИФА для количественного определения антител разных классов к хламидиям и антигена хламидий в клинических образцах с чувствительностью и специфичностью 80-90%. Установлено, что в сыворотке крови больных урогенитальным хламидиозом при свежей форме заболевания преобладали IgG- и IgM-антитела, а у больных с бессимптомной инфекцией – IgA-антитела. Было показано, что у 20% больных гуморальный иммунный ответ на хламидии был слабым (Мавров, Навольнев, 1986; Мавров, 1987; Мавров, 1990).

Началом современного этапа в развитии лабораторной диагностики хламидийных инфекций явилось создание методов, выявляющих специфические для хламидий нуклеотидные последовательности ДНК и РНК. Первой работой, где была предложена методика выявления нуклеиновых кислот хламидий методом гибридизации, была публикация Palva

и соавторов (1984). Авторы предложили так называемый сэндвич – вариант гибридизации ДНК для выявления хламидий в материале от больных. Вскоре были предложены другие модификации ДНК-гибридизации для диагностики хламидиоза и было проведено сравнение с иммуноферментным методом (Nuuri et al., 1989; Tuokko et al., 1989). Однако чувствительность этих методов уступала диагностическому выделению хламидий в культурах клеток. Выявление специфических последовательностей ДНК методом гибридизации имело свои ограничения. Даже усиление сигнала методом объединения различных олигонуклеотидных зондов и использование хемилюминесценции не позволили выявлять более 10000 элементарных телец хламидий в образцах (Clyne et al., 1989; Peterson et al., 1989; Naher et al., 1989; LeBar et al., 1989).

Существенным прорывом в методах диагностики инфекционных болезней стало использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации нуклеиновых кислот. Внедрение ПЦР в диагностику хламидиоза позволило существенно упростить выявление нуклеиновых кислот хламидий и повысить чувствительность и специфичность до значений, близких к 100%. В последующие годы количество публикаций по ПЦР-диагностике хламидиоза лавинообразно возрастало.

#### 1.4. ЛЕЧЕНИЕ

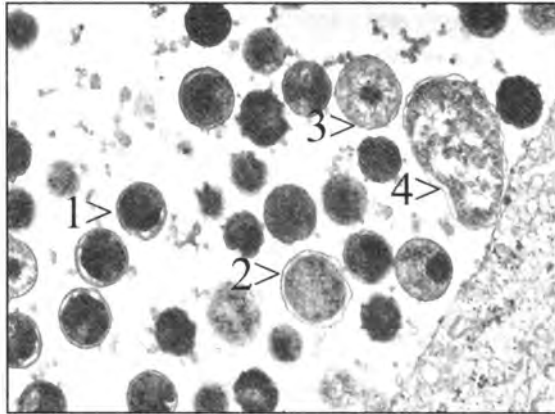
В доантибиотическую эру хламидийные инфекции лечились различными способами. Reiter, считая хламидийный артрит спирохетозом, назначал препараты мышьяка. Применялась шоковая пиротерапия путем введения серы. Darbon, Portal (1959) и Klika (1960) при болезни Рейтера назначали коллоидное золото (1 раз в неделю внутримышечно 1, 2, 3, 4, 5 мл 2% р-ра – курс 50 мл) (Порудоминский, 1963). Кричевский и соавторы (1954) назначали синтомицин (2-3 г/сут, 15-20 г на курс) в сочетании с пиротерапией (2-6 инъекций 2% серы). При лечении трахомы применялись ультрафиолетовые лучи (Koleszar et al., 1965) и сульфаниламидные препараты (Milano, 1965).

С появлением антибиотиков и возможности выращивать хламидии на куриных эмбрионах и культурах клеток были проведены исследования, которые позволили установить чувствительность *C. trachomatis* к антибактериальным препаратам. Активность *in vitro* проявляли тетрациклины, макролиды, рифампицины, сульфонамиды (Blackman et al., 1977; Kuo et al., 1977; Шаткин, Мавров, 1983). Полученные данные нашли подтверждение в клинических исследованиях (Bowie, 1982).

## ГЛАВА 2. ТАКСОНОМИЯ ХЛАМИДИЙ

### 2.1. ТАКСОНОМИЯ CHLAMYDIALES

Хламидии (*Chlamydiae*) – неподвижные, облигатно-внутриклеточные, кокковидные, патогенные бактерии, относящиеся к эубактериям (*Eubacteriae*) (Gupta, 2000). Размножаются только внутри связанных с мембраной вакуолей в цитоплазме клеток человека, млекопитающих, птиц и амёб. Членистоногие хозяевами не служат. Размножение происходит в ходе уникального цикла развития, состоящего в превращении мелких элементарных телец (ЭТ)



**Рисунок 2.1.** Хламидии (*Chlamydiae*) – неподвижные, кокковидные бактерии. Размножение делением (4) происходит внутри ограниченных мембраной вакуолей в цитоплазме клеток млекопитающих, птиц и амёб. Цикл развития состоит в превращении элементарных тел (1) в ретикулярные тельца (2) через промежуточные тельца (3).

в более крупные – ретикулярные тельца (РТ), которые активны метаболически и претерпевают деление (рис. 2.1). Клеточная стенка не содержит мурамовую кислоту и пептидогликан или содержит их в следовых количествах, Хламидии не окисляют глюкозу с образованием АТФ – зависят от получения АТФ клетками хозяина. Таксономически хламидии объединены в порядок *Chlamydiales* и составляют класс риккетсий и хламидий (Определитель бактерий Берджи, 1997). Хламидии пока не выделены в отдельный класс, поскольку на сегодняшний день известно только небольшое количество семейств (4), родов (5) и видов (12). Все представители порядка *Chlamydiales* являются облигатными внутриклеточными бактериями, имеют сходный двухфазный цикл развития, состоящий из чередования функционально и морфологически различных форм – ЭТ и РТ, обладают склонностью к персистенции и имеют более 80% гомологии по последовательности 16S- и 23S- рРНК-генов (Герасимова и соавт., 2001).

До 1999 года считалось, что хламидии составляют 4 вида (*C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*), которые были объединены в один порядок (*Chlamydiales*), одно семейство (*Chlamydiaceae*) и один род (*Chlamydia*) (Page, 1968; Grayston et al., 1989; Fukushi, Hira, 1992). Молекулярный филогенетический анализ – новое направление в эволюционной биологии, которое бурно развивается в последнее десятилетие – заставил кардинально пересмотреть взгляды на таксономические взаимоотношения всех живых организмов, и в частности микроорганизмов (Рассе, 1997). Сравнение последовательности нуклеотидов малой субъединицы рибосомальной РНК с константой седиментации 16 (16S-субъединицы) у всех живых существ привело к концепции трех доменов – основных направлений эволюции жизни на земле:

- *Eucarya*, куда входят животные, растения, грибы, плесени, амёбы, реснитчатые, жгутиковые, трихомонады и дипломонады;
- *Bacteria*, около 40 групп (порядков) бактерий, включающий и порядок *Chlamydiales*;
- *Archaea* – *Crenarchaeota* и *Euryarchaeota* – древние одноклеточные, отделившиеся на ранних стадиях эволюции (Woese et al., 1990).



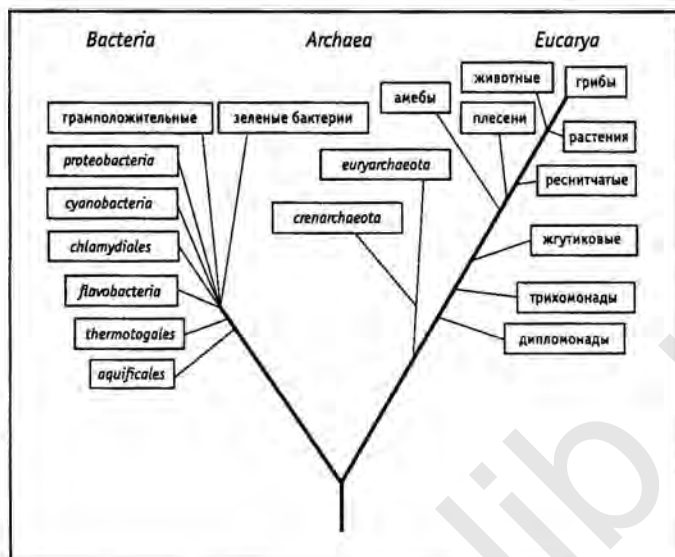


Рисунок 2. 2. Дендрограмма, показывающая три домена жизни и филогенетическое место *Chlamydiales* на универсальном эволюционном древе. Длина каждой ветви приблизительно отражает эволюционную дистанцию (количество изменений нуклеотидов) между организмами. (Tanner et al., 1999).

Рис. 2.2 приближенно показывает эволюционное место хламидий на всеобщем филогенетическом древе всех клеточных организмов (Tanner et al., 1999). Наиболее близкие родственники *Chlamydiales* – бактерии порядков *Planctomycetales* и *Verrucomicrobiales*, хотя родство это довольно дальнее (Hugenholtz et al., 1998). Представители *Planctomycetales* и *Verrucomicrobiales* – малоизученные микроорганизмы, которые, как показывают недавние молекулярные исследования, чрезвычайно широко представлены в окружающей среде. Как и хламидии, они не содержат пептидогликанов в клеточной стенке и поэтому не чувствительны к  $\beta$ -лактамам антибиотикам, подавляющим синтез бактериальной клеточной стенки. *Planctomycetales* и *Verrucomicrobiales* не являются внутриклеточными паразитами. Поэтому вполне можно допустить, что существуют промежуточные формы, близкие к хламидиям, но обладающие способностью к внеклеточному существованию (Tanner et al., 1999).

Прогресс молекулярной биологии вызвал к жизни новое направление эволюционной биологии – молекулярную систематику (Hills et al., 1996). Появление методов амплификации нуклеиновых кислот, их клонирования и изучения нуклеотидных последовательностей привело к созданию метода точного определения филогенетической позиции живых существ. Особенно это актуально для облигатных внутриклеточных бактерий, которые имеют мало фенотипических характеристик (Roux, Raoult, 1995). В геноме *Bacteria* существуют консервативные гены, которые не встречаются у живых существ, относящихся к другим доменам – *Eucarya* и *Archaea*. Одним из таких генов является участок ДНК, кодирующий 16S-субъединицу рибосомальной РНК бактерий (Woese, 1987). Это позволяет амплифицировать методом ПЦР только бактериальный 16S-РНК-ген даже в присутствии нуклеиновых кислот других живых организмов (Wilson et al., 1990). Другой особенностью 16S-РНК-гена является то, что различия



в нуклеотидных последовательностях разных групп бактерий отражают эволюционные взаимоотношения между ними. Эти различия могут быть большими (между разными порядками) и незначительными, отражающими внутривидовые различия между отдельными видами.

Применение ПЦР и анализа рибосомальной РНК для филогенетической характеристики хламидий привело к накоплению информации о нуклеотидных последовательностях многих изолятов хламидий. Данные, полученные в разных лабораториях, приблизительно совпадали (Gaydos et al., 1993; Pettersson et al., 1997; Pudjiatmoko et al., 1997; Takahashi et al., 1997). Для обнаружения, идентификации и таксономической характеристики хламидий используется ПЦР с несколькими системами праймеров (Everett et al., 1997, 1999; Белозоров, 2001). Пара праймеров, которая выявляет все семейства порядка *Chlamydiales*:

**U23F 5'GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA 3'**

**23SIGR 5'TGGCTCATCATGCAAAAGGCA 3'**

U23F соответствует последовательности сразу же после старта *23S-rRNA*-гена, а 23SIGR комплементарен последовательности приблизительно 600 оснований.

Три пары праймеров специфичны только для семейства *Chlamydiaceae*:

**IGF 5'GACTAGGTTGGGCAAG 3'**

**IGR 5'AGCTCTTA(T/G/A/)(C/T)AАСТТGGTCTGTGA 3'**

IGF соответствует началу межгенного спейсера между генами *16S-rRNA* и *23S-rRNA* всех известных *Chlamydiaceae*, IGR перекрывает стартовый сайт *23S-rRNA*-гена всех известных *Chlamydiaceae*.

**1260 5'CGCTTAATC(A/GOA(T/C)GAAAGAGCTGCTCA 3'**

**TGLY 5'GGCTACAGCTCTACCATTGA 3'**

1260 распознает стартовый участок за 48 оснований перед стоп-кодоном, TGLY комплементарен tRNA, локализованному за 270 пар оснований от стоп-кодона *ompA* у всех известных *Chlamydiaceae*:

Праймеры, специфичные для участка гена *23S-rRNA* всех известных *Chlamydiaceae*:

**TQF 5'GAAAAGAACCCTTGTTAAGGGAG 3'**

**TQR 5'CTAACTCCCTGGCTCATCATG 3'**

Для типирования лабораторных изолятов хламидий используется также методика определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP). Важной положительной стороной новой классификации порядка *Chlamydiaceae* можно считать включение в нее широкого круга новых изолятов и современную методологическую базу выделения таксономических единиц.

Новая классификация хламидий была предложена в 1999 году и принята в 2000 году на 4-ом Европейском конгрессе «Хламидия-2000» в Хельсинки, Финляндия. Расшифровка генома бактерий позволила установить консервативные участки нуклеотидной последовательности – так называемые подписи, уникальные для отдельных видов протеобактерий. На основе анализа участков молекул белков, которые кодируются «подписями», производится типирование и определяются филогенетические взаимоотношения между бактериями с помощью специальных филогенетических алгоритмов (с использованием компьютерных программ) (Gupta, 2000). Данное общее правило справедливо и для хламидий. Новая классификация хламидий основана на генетическом анализе и отражает сходство и различие генов, *16S*- и *23S*-субъединиц

рибосомальной РНК. В основе классификации лежит также сравнительный филогенетический анализ пяти структурных генов, кодирующих ферменты GroEL- и KDO-трансферазу, MOMP (major outer membrane protein) – главный протеин наружной мембраны, богатый цистеином, массой 60-kDa, а также богатый цистеином липопротеин (Everett et al., 2000). Классификация хламидий основана на наличии более чем 95% гомологии в нуклеотидной последовательности генов 16S- и 23S-pPHK для всех представителей рода и более чем 90% сходства внутри семейства (Everett et al., 1997, 1999; Белозоров, 2001). В соответствии с этим критерием порядок *Chlamydiales* был разбит на 4 семейства – *Chlamydiaceae*, *Parachlamydiaceae*, *Simkaniaceae*, *Waddliaceae*, каждое из которых имеет свою экологическую нишу (табл. 2.1).

Таблица 2.1.

## Таксономическая классификация хламидий (состояние на 01.01.2001)

Порядок	Семейство	Род	Вид	Краткое описание
<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiaceae</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>C. trachomatis</i>	Образуют одно вакуольное включение, содержащее гликоген. Вызывают болезни у людей (трахома, конъюнктивиты, ВЗПО <sup>1</sup> , артриты, пневмонии). Известно два биовара — <i>Trachoma</i> (16 сероваров) и LGV <sup>2</sup> (4 серовара).
			<i>C. suis</i>	Образуют одно вакуольное включение, содержащее гликоген. Синтезируют фолиевую кислоту. Вызывают болезни у свиней (конъюнктивиты, энтериты, пневмонии). Устойчивы к сульфаниламидам и тетрациклинам.
			<i>C. muridarum</i>	Образуют одно вакуольное включение, содержащее гликоген. Синтезируют фолиевую кислоту. Вызывают болезни у грызунов (пневмонии, илеиты).
		<i>Chlamydophila</i>	<i>C. pneumoniae</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Некоторые штаммы имеют элементарные тельца грушевидной формы. Паразитируют в человеке и животных. Известно три биовара — TWAR <sup>3</sup> , koala, equine. Вызывают бронхопневмонии, и, возможно, способствуют развитию астмы, атеросклероза, реактивного артрита, саркоидоза, цистифиброза, узловой эритемы, болезни Альцгеймера

<sup>1</sup> ВЗПО – воспалительные заболевания половых органов<sup>2</sup> LGV – лимфогранулема венерическая<sup>3</sup> TWAR – Taiwan Acute Respiratory (Тайваньский острый респираторный синдром)

Продолжение таблицы 2.1.

Порядок	Семейство	Род	Вид	Краткое описание
			<i>C. pecorum</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Возбудитель болезней млекопитающих и сумчатых животных.
			<i>C. psittaci</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Вызывают болезни у птиц. У человека — пситтакоз. Известно 8 сероваров.
			<i>C. abortus</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Поражают плаценту. Вызывают аборт у жвачных животных и человека (гестационный пситтакоз).
			<i>C. caviae</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Вызывают конъюнктивиты и половые инфекции у морских свинок.
			<i>C. felis</i>	Образуют много плотных включений, не содержащих гликоген. Не синтезируют фолиевую кислоту. Вызывают риниты и конъюнктивиты у кошек. Могут болеть люди.
	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydia</i>	<i>P. acanthamoebae</i>	Эндосимбионты у амёб. ( <i>Acanthamoeba castellanii</i> ). Включений не образуют. Окружены цитоплазматической мембраной. Варибельная окраска по Граму. Сохраняют жизнеспособность в цистах. Растут в культуре клеток <i>Vero</i> .
		<i>Neochlamydia</i>	<i>N. hartmannellae</i>	Паразиты амёб. ( <i>Hartmannella vermiformis</i> , <i>Dictyostelium discoideum</i> ). Включений не образуют. Не окружены цитоплазматической мембраной. Грамотрицательные. Предотвращают развитие цист у амёб. Растут в культуре клеток <i>Vero</i> .
	<i>Simkaniaceae</i>	<i>Simkania</i>	<i>S. negevensis</i>	Длительный (до 14 суток) цикл развития. Выделены от людей. Спектр патологии неизвестен.
	<i>Waddliaceae</i>	<i>Waddlia</i>	<i>W. chondrophila</i>	Вызывают спондилоартриты, аборт у человека и животных. Растут в культуре ВТ (ATCC CRL-1390)

### 2.1.1. Семейство *Chlamydiaceae*

В семействе *Chlamydiaceae* (хламидии) выделено два рода – *Chlamydia* (собственно хламидии) и *Chlamydophila* (хламидофилы), которые различаются между собой как по генотипическим, так и по фенотипическим признакам. Представители рода *Chlamydia* имеют сходные по структуре органеллы и способны накапливать гликоген во включениях. Элементарные тельца, попав в клетку-хозяина, образуют одно большое включение. Представители рода *Chlamydophila* не способны продуцировать гликоген, каждое элементарное тельце образует собственное включение, поэтому инфицированная клетка содержит много мелких включений (Everett, et al., 1999).

**Род *Chlamydia*** включает три вида: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia muridarum* и *Chlamydia suis*. *Chlamydia trachomatis* является облигатным паразитом человека и вызывает трахому, конъюнктивиты, воспалительные заболевания мочеполовых органов, реактивные артриты и пневмонию новорожденных. В настоящее время известно два биовара *C. trachomatis*: *Trachoma* (включает 14 сероваров) и LGV- лимфогранулема венерическая (4 серовара) (Fox et al., 1993; Stephens, 1999; Morre et al., 2000). Вид *Chlamydia muridarum* является возбудителем пневмоний и илеитов у грызунов семейства *Muridae* (мыши, хомяки). *Chlamydia suis* впервые была выделена у свиньи (*Sus scrofa*) (Zahn et al., 1995; Szeredi et al., 1996). Различные штаммы этого вида вызывают конъюнктивит, энтерит и пневмонию у животных и характеризуются повышенной устойчивостью к сульфаниламидам и антибиотикам тетрациклинового ряда.

**Род *Chlamydophila*** составляют уже известные виды *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila pneumoniae* и *Chlamydophila pecorum*, а также *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila caviae* и *Chlamydophila felis*, которые выделены в самостоятельные виды из *C. psittaci*. Выделение названных видов в отдельный род обусловлено значительными генетическими и фенотипическими различиями между родами *Chlamydophila* и *Chlamydia*. В то же время все представители рода *Chlamydophila* проявляют эволюционное родство по структуре различных генов, включая гены рибосомного оперона и белков наружной мембраны (OMP1, OMP2). *Chlamydophila pecorum* является исключительно возбудителем заболеваний животных (Zahn et al., 1995). Несколько штаммов *C. pecorum* выделены у сумчатых (коала), жвачных млекопитающих и свиней. У коал этот возбудитель вызывает бесплодие, заболевания мочевыводящей и репродуктивной систем. *Chlamydophila pneumoniae* является возбудителем респираторных инфекций. Этот вид имеет три биовара: TWAR (Taiwan Acute Respiratory), коала (Koala) и конский (Equine). Все штаммы *C. pneumoniae*, паразитирующие в животных и человеке, имеют сходные генетические и антигенные характеристики, что позволяет рассматривать их как представителей одного вида. Штаммы TWAR в основном являются возбудителями заболеваний респираторного тракта у человека, вызывая бронхиты, синуситы, фарингиты, пневмонии и средние отиты (Huovinen et al., 1989; Grayston, 1992; Kuo et al., 1995; Block et al., 1997). За последние 10-12 лет накопилось достаточно данных, указывающих на прямую связь между *Chlamydophila pneumoniae* и развитием атеросклероза (Saikku et al., 1988; Shor et al., 1992; Ellis, 1997; Maass et al., 1998; Ossewaarde et al., 1998). Имеются данные, указывающие на связь с хламидофильной инфекцией таких хронических неинфекционных заболеваний с неизвестной этиологией, как бронхиальная астма, узловая эритема, синдром *Guillain Barre*, реактивный артрит, саркоидоз, цистифиброз, болезнь Альцгеймера (Erntell et al., 1989; Hahn



et al., 1991; Haidl et al., 1992; Braun et al., 1994; Emre et al., 1996; Puolakkainen et al., 1996; Balin et al., 1998). В новой классификации *Chlamydophila psittaci* включает штаммы, для которых основными хозяевами являются птицы. Все эти штаммы могут передаваться человеку, вызывая пситтакоз. *C. psittaci* включает 8 сероваров, многие из которых могут паразитировать в нескольких видах птиц. *Chlamydophila abortus* распространена среди жвачных животных и, в основном, колонизирует плаценту, вызывая аборт у скота. Невынашивание беременности, которое было вызвано *C. abortus*, наблюдалось также у женщин, работавших с овцами, и получило название «гестационный пситтакоз» (Herring et al., 1987; Jorgensen, 1997). *Chlamydophila felis* – возбудитель ринитов и конъюнктивитов у домашних кошек (*Felis catus*). Отмечены зоонозные инфекции у людей, вызванные *C. felis* и проявлявшиеся в виде конъюнктивита. *Chlamydophila caviae* впервые выделена из конъюнктивы морской свинки (*Cavia cobayd*) (Zhao Q. et al., 1993). На животных моделях было показано, что *C. caviae* способна вызывать воспалительные заболевания половых органов, сходные по проявлениям с аналогичными заболеваниями у человека.

### 2.1.2. Семейство *Parachlamydiaceae*

Семейство *Parachlamydiaceae* (парахламидии) включает микроорганизмы с вариабельной окраской по Граму, которые являются паразитами свободно живущих амёб и могут быть выращены в культуре клеток *Vero* (Fritsche et al., 2000). Различия в нуклеотидной последовательности рибосомных генов *Parachlamydiaceae* и *Chlamydiaceae* составляют 10-20%. Пока в состав семейства входят два рода: *Parachlamydia*, представителем которого является *P. acanthamoebae* (паразитирующая у простейших рода *Acanthamoebae* – *Acanthamoeba castellanii*) и *Neochlamydia*, представителем которого является *N. Hartmannellae* (паразитирующая в амёбах *Hartmannella vermiformis* и *Dictyostelium discoideum*) (Horn et al., 2000). Трофозоиты амёб, несущие штамм *P. acanthamoebae*, были выделены у людей во время вспышки лихорадки среди работников печатной мастерской в штате Вермонт (США), связанной с работой кондиционера-увлажнителя (humidifier fever) (Lewis et al., 1990).

### 2.1.3. Семейство *Simkaniaceae*

Семейство *Simkaniaceae* пока включает один род *Simkania*, представленный единственным видом и штаммом – *Simkania negevensis*. Родовое название дано по имени исследовательницы Симоны Каханэ (Simona Kahane), которая впервые описала данный штамм как «микрорганнизм Z» (Kahane et al., 1993, 1995). Видовое название дано по названию пустыни Неgev в Израиле. Там, в городе Beer Sheva находится университет имени Бен-Гуриона (Ben-Gurion University of the Negev). Спектр хозяев *Simkania* пока неизвестен. Однако серологические данные и ПЦР-анализ показывают, что этот микроорганизм широко распространен у людей (Friedman et al., 2000). Для *Simkania* характерен более длительный, по сравнению с другими хламидиями, цикл развития (до 14 дней).

### 2.1.4. Семейство *Waddliaceae*

Семейство *Waddliaceae*, название которого происходит от аббревиатуры WADDL (Washington Animal Disease Diagnostic Laboratory), представлено единственным видом *Waddlia chondrophila* (штамм WSU 86-1044), который впервые был выделен из abortивного

материала коровы (Rurangirwa et al., 1999). Геном данного возбудителя оказался идентичен нуклеотидной последовательности микроорганизма, обнаруженного ранее в синовиальной жидкости и хряще больных реактивными артритами (Braun et al., 1997). Нуклеотидная последовательность 16S-rPHK-штамма WSU 86-1044 проявляет 84,7-85,3% гомологии с соответствующими последовательностями генов различных хламидийных штаммов, что, по современным критериям геносистематики, позволяет отнести этот штамм к отдельному роду (*Waddlia*) и семейству (*Waddliaceae*) в составе порядка *Chlamydiales*.

## 2.2. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *CHLAMYDIALES*

### 2.2.1. Род *Chlamydia*

*C. trachomatis* является исключительно патогеном человека и имеет два биовара – *Trachoma* и LGV. Это разделение первоначально было обусловлено различиями в инвазивности и в способности расти на культурах клеток. *Trachoma*-биовар может инокулироваться, размножаться и пассироваться на клеточных культурах только с помощью центрифугирования либо после обработки культуры антиметаболитами или облучением. Он вызывает локальные ограниченные заболевания с поражением преимущественно эпителия глаз и мочеполовых путей. LGV-биовар может размножаться в чувствительных культурах без центрифугирования и соответствующей обработки. Этот биовар вызывает венерическую лимфогранулему – заболевание, поражающее лимфатическую систему. Позднее разделение *C. trachomatis* на два биовара было подтверждено тестами нейтрализации на животных моделях, когда смерть мышей от токсикации в результате введения выращенного на куриных эмбрионах возбудителя предотвращалась предварительной иммунизацией гомологичным сероваром (Bell et al., 1959). Затем была разработана техника серотипирования на основе иммунофлуоресценции с помощью моноспецифических сывороток (Wang et al. 1973) и моноклональных антител (Wang, Grayston, 1991). Антигенные детерминанты, определяющие принадлежность к тому или иному серовару, связаны с MOMP – главным белком наружной мембраны. MOMP является иммунодоминантным антигеном *C. trachomatis* и содержит четыре переменных домена (VD1-4) и пять постоянных доменов (CD1-5). Три переменных домена находятся на поверхности микробной клетки и содержат антигенные эпитопы. Молекулярной основой антигенных различий между сероварами являются различия в последовательности аминокислотных остатков переменных доменов MOMP (Yuan et al., 1989) и, соответственно, различий в нуклеотидной последовательности генов, кодирующих MOMP (Carter et al., 1991). На основании сходств и различий антигенов MOMP с помощью компьютерного анализа (Felsenstein, 1989) было построено филогенетическое «дерево», отражающее степень родства между отдельными сероварами *C. trachomatis*.

В 1993 году был разработан высокоразрешающий и воспроизводимый метод анализа нуклеотидной последовательности ДНК – AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Zabeau, Vos, 1993). ДНК «разрезается» воздействием ферментов-рестриктаз (EcoRI, PstI, HindIII или ApaI в комбинации с MseI или TaqI) во многих местах, после чего определенный набор фрагментов ДНК подвергается амплификации, помечается флуорохромом и анализируется с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. В результате получается уникальный набор полос (отпечаток пальца), строго индивидуальный для данного штамма

и/или биовара (серотипа). Индивидуальность обусловлена мутациями в местах рестрикции ДНК и вставками или выпадениями отдельных нуклеотидов в этих участках. Сравнение результатов такого анализа позволяет типировать хламидии, выделенные у человека и животных, в том числе и внутри вида (Boumedine, Rodolakis, 1998).

Meijer A. et al. (1999) провели анализ генома представителей родов *Chlamydia* с помощью метода AFLP (табл. 2.2). Степень сходства между штаммами определялась с помощью коэффициента корреляции Pearson и коэффициента Dice ( $SD=2 \cdot \text{число одинаковых полос} / \text{общее число полос}$ ) и выражалась в процентах. Вычисление и построение филограмм производилось с помощью компьютерных программ PHYLIP и TREEVIEW (Felsenstein, 1989; Page, 1996). Род *Chlamydia* оказался гетерогенным. Мышиные, свиные и человеческие изоляты отличались друг от друга –  $SD=64,9 \pm 2,4\%$  (что указывает на их принадлежность к разным видам, которые по новой классификации носят название – *C. trachomatis*, *C. muridarum* и *C. suis*). Все человеческие изоляты составили один вид –  $SD=88,3 \pm 2,5\%$ . Порогового значения SD, определяющего принадлежность к одному виду, не существует. Однако, если принять ее для вида за 80%, то получаются данные, которые вполне согласуются с последней классификацией рода *Chlamydia* (рис. 2.3, табл. 2.2).

Таблица 2.2.

Известные представители рода *Chlamydia*

Вид	Штамм	Кем и где выделен	От кого выделен	Заблевание
<i>C. trachomatis</i>	A/Sa-1	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Трахома
	B/TW-5	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Трахома
	Ba/Apache-2	American Type Culture Collection, Manassas, Va, USA	Человек	Трахома
	C/UW-1	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Трахома
	D/IC-CAL-8	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	Da/MT-566	M. F. Lampe, University of Washington, Seattle, USA	Человек	Урогенитальная инфекция
	D-/NL-326	M. F. Lampe, University of Washington, Seattle, USA	Человек	Урогенитальная инфекция
	D'	J. H. T. Wagenvoort, Rotterdam, The Netherlands	Человек	Урогенитальная инфекция
	E/DK-20	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	F/MRC-301	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	G/IOL-238	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	H/UW-4	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	I/UW-12	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция
	I'	J. H. T. Wagenvoort, Rotterdam, The Netherlands	Человек	Урогенитальная инфекция
J/UW-36	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция	
K/UW-31	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция	
L1/440-L	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция	
L2/434-B	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция	
L3/404-L	S. Darouger, London, United Kingdom	Человек	Урогенитальная инфекция	
<i>C. muridarum</i>	MoPn/Nigg II	American Type Culture Collection, Manassas, Va, USA	Мышь	Пневмония
<i>C. suis</i>	R19	A. A. Andersen, National Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA	Свинья	Пневмония

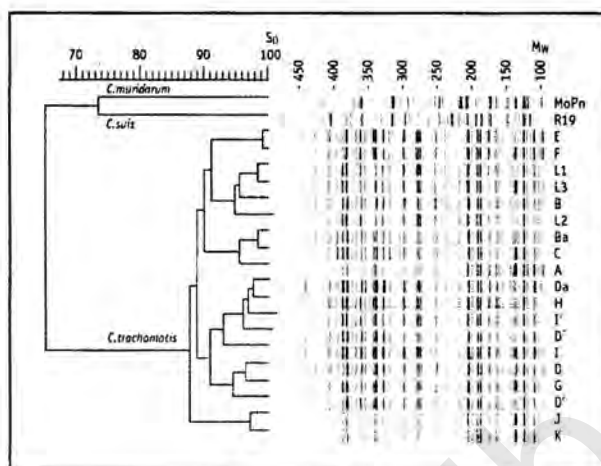


Рисунок 2.3. AFLP-отпечатки и филограмма 19 штаммов *C. trachomatis* и двух штаммов *C. muridarum* и *C. suis*. Филограмма построена с помощью программы UPGMA на основании коэффициента Dice (SD). Значения SD (в процентах) и молекулярная масса (Mw) показаны сверху над филограммой и отпечатками соответственно. Названия штаммов указаны справа (подробнее см. табл. 2.2). (Meijer A., et al. 1999).

Внутри вида *C. trachomatis*, на основании локализации полос меченной ДНК, можно различить, по крайней мере, 19 вариантов, которые коррелируют с известными сероварами, полученными в результате серотипирования (Ossewaarde et al., 1994), и вариантами на основе анализа последовательности *omp1*-генов, кодирующих МOMP (рис. 2.4) (Stothard et al., 1998).

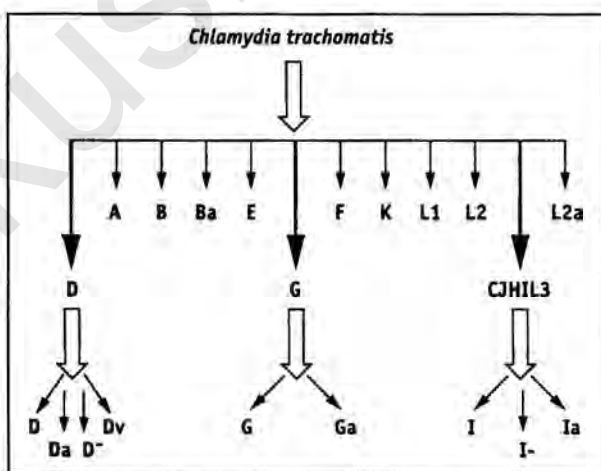


Рисунок 2.4. Результаты типирования *Chlamydia trachomatis* с помощью моноклональных антител и определения нуклеотидной последовательности *omp1*-гена, кодирующего МOMP – главный белок наружной мембраны (Stothard et al., 1998).



Некоторые представители *Chlamydia* могут нести плазмиды размером приблизительно 7,5 kbp (7,5 тысяч пар нуклеотидов). Анализ последовательности этих плазмид (по данным GenBank) предполагает, что одна или две полоски в AFLP-отпечатках могут отражать наличие таких плазмид. Поскольку нуклеотидная последовательность плазмид хламидий довольно консервативна внутри каждого вида, то предполагается, что наличие плазмид не может существенно отразиться на сравнении различных вариантов внутри вида (Thomas et al., 1997).

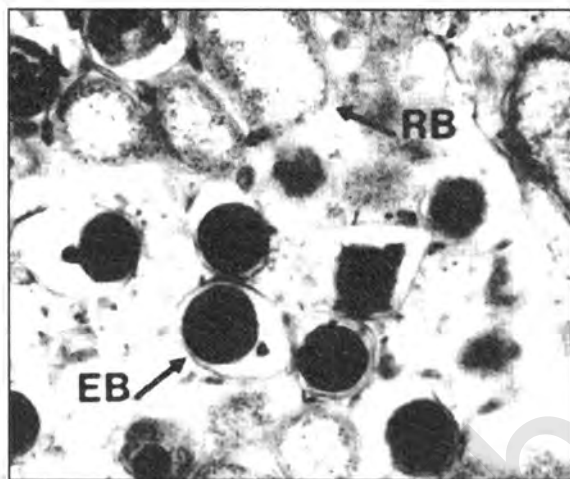
Данные анализа целого генома рода *Chlamydia*, проведенного при помощи других методов (RAPD и RFLP), оказались аналогичными результатам таксономического типирования. Степень ДНК-ДНК-гибридизации внутри вида *C. trachomatis* составляет от 92 до 100% (Peterson, de la Maza, 1988; Scieux et al., 1993; Rodriguez et al., 1994).

За последние годы были идентифицированы новые серовары *Chlamydia trachomatis*: Ba (UW113, J104, J160, TW439, U/CT77), Da (TW448, MT199), D (NL32 6, TB39, MT157, RB205), D\* (MTS2, ICD033), Ga (IOL238), Ia (NL1540, MT165), I (MT518, MT741, MT1196), и L2a (UW396). К 2000 году насчитывалось более 20 сероваров *C. trachomatis* (рис. 2.4). Биовар *Trachoma* включал 17 сероваров (A, B, Ba, C, D, Da, D-, Dv, E, F, G, Ga, H, I, Ia, I-, K) и LGV – 4 серовара (L1, L2, L2a, L3) (Wang, Grayton, 1991; Dean, 1994; Lampe et al., 1993; Morre et al., 1998). Степень корреляции этих типов внутри вида с их фенотипическими и клиническими характеристиками интенсивно изучается. В последние годы типирование клинических изолятов *C. trachomatis* производится с помощью анализа нуклеотидной последовательности гена *omp1* (RFLP – restriction fragment length polymorphism и AFLP – amplified fragment length polymorphism). Это более удобно и точно, чем серотипирование с помощью моноспецифических сывороток и моноклональных антител. Сведения о генетических вариантах возбудителя, циркулирующего на данной территории и в данной популяции, составляют предмет нового направления в борьбе с инфекциями – молекулярной иммунологии. Вполне возможно, что эти данные в перспективе позволят создать вакцину против хламидиоза, направленную против MOMP-1 эпитопа.

### 2.2.2. Род *Chlamydoxyla*

Некоторые штаммы *C. pneumoniae*, в том числе и впервые идентифицированный штамм TWAR, имеют морфологическое отличие от всех других хламидий – элементарные тельца (ЭТ) грушевидной формы с широким периплазматическим пространством (Grayston et al., 1989) (рис. 2.5).

Однако этот признак присущ не всем штаммам *C. pneumoniae* и не может считаться видовой морфологической характеристикой. Carter и соавторы отметили круглую форму элементарных телец у штамма IOL-207 (Carter et al., 1991). Miyashita и соавторы детально изучили морфологию штамма YK-41, выделенного в 1992 году Kanamoto и Sakano от больного острым бронхитом (Kanamoto, Sakano, 1992; Miyashita et al., 1993). Авторы отметили круглую форму ЭТ, в отличие от TW-183 и AR-388. Применяя специальные методики электронной микроскопии, авторы обнаружили на внутренней поверхности наружной клеточной мембраны ЭТ всех изученных ими штаммов *C. pneumoniae* характерные правильные гексагональные структуры, которые считают характерным морфологическим признаком *C. pneumoniae*. Попов и соавторы отметили наличие у некоторых ЭТ характерного периплазматического пространства (Popov et al., 1991).



**Рисунок 2.5.** Электронная микрофотография *C. pneumoniae*, штамм AR-39 в культуре клеток Hep2 через 72 часа после заражения. EB – элементарное тельце грушевидной формы с широким периплазматическим пространством у одного из полюсов. RB – ретикулярное тельце. Увеличение 37 000 (Meijer, 1999).

Геном *C. pneumoniae* состоит из хромосомы, содержащей примерно 1 000 000 пар оснований. У человеческого биотипа плазмиды не обнаружены, тогда как у конского типа найдена плазида примерно 7500 оснований, сходная с таковой у *C. psittaci* и *C. trachomatis* (Storey et al., 1993). Геном *C. pneumoniae*, выделенный от человека, довольно консервативный. Изоляты из разных стран имеют 94-95% гомологии при гибридизации ДНК (Cox et al., 1988). Генетический RFLP-анализ, впервые проведенный Campbell, Kuo и Grayston в 1987 году, показал наличие только двух разновидностей внутри вида. Изучение антигенов *C. pneumoniae* с помощью иммуноблоттинга показало значительное разнообразие антигенного состава внутри вида на основании отличий профилей сывороток разных людей, имеющих антитела к *C. pneumoniae* (Black et al., 1991; Wagels et al., 1994; Jantos et al., 1997). Расшифровка участков генетического кода *C. pneumoniae* показала полную консервативность генов, кодирующих белки наружной мембраны – протеин № 1 и MOMP (*omp1* и *omp2*), гена *16S rRNA*, домена 1 гена *23S-rRNA*, *Rnase P RNA*, генов, кодирующих протеины 53 и 76 кДальтон, а также генов *dnaK*, *waaA (kdtA)* и участка межгенного пространства между генами *16S-* и *23S-rDNA* (Carter et al., 1991; Melgosa et al., 1991; Gaydos et al., 1992; Wagels et al., 1994; Hermann et al., 1996; Everett et al., 1997; Jantos et al., 1997; Pettersson et al., 1997; Pudjatmoko et al., 1997; Molestina et al., 1998).

В ранее цитированной работе Meijer et al. (1999) проведено сравнение генома 19 штаммов *C. pneumoniae* с помощью AFLP-анализа. Степень сходства между штаммами определялась с помощью коэффициента корреляции Pearson и коэффициента Dice ( $SD=2 \cdot \text{число одинаковых полос} / \text{общее число полос}$ ) и выражалась в процентах. Вычисление и построение филограмм производилось с помощью компьютерных программ PHYLIP и TREEVIEW (Felsenstein, 1989; Page, 1996). Все изоляты *C. pneumoniae*, выделенные как у больных респираторной патологией, так и атеросклерозом, оказались гомогенными и дали практически одинаковые AFLP-отпечатки (табл. 2.3, рис. 2.6).

Таблица 2.3.

Некоторые представители рода *Chlamydophyla*

Вид	Штамм	Кем и где выделен	От кого выделен	Заболевание
<i>C. pneumoniae</i>	A-03	J. T. Summersgill, University of Louisville, Louisville, Ky.	Человек	Атерома коронарной артерии
	AR-39	Washington Research Foundation, Seattle, Wash.	Человек	ОРЗ <sup>1</sup>
	AR-338	Washington Research Foundation, Seattle, Wash.	Человек	ОРЗ
	BAL-16	J. T. Summersgill, University of Louisville, Louisville, Ky.	Человек	Бронхопневмония, СПИД
	CM-1	C. M. Black, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.	Человек	Пневмония
	CWL-011	C. M. Black, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.	Человек	Пневмония
	CWL-029	C. M. Black, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.	Человек	Пневмония
	CWL-050	C. M. Black, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.	Человек	Пневмония
	GR0-21	S. Farholt, Statens Seruminstitut, Copenhagen, Denmark	Человек	Пневмония
	H-12	P. Saikku, University of Oulu, Oulu, Finland	Человек	ОРЗ
	IOL-207	Treharne, University of London, London, United Kingdom	Человек	Конъюнктивит
	K-7	P. Saikku, University of Oulu, Oulu, Finland	Человек	ОРЗ
	NWL-1	M. W. Carter, PHLS Central Public Health Laboratory, London, United Kingdom	Человек	Пневмония
	P-1	P. Saikku, University of Oulu, Oulu, Finland	Человек	ОРЗ
	PS-32	C.-C. Kuo, University of Washington, Seattle, Wash.	Человек	Атерома сонной артерии
	TW-183	Washington Research Foundation, Seattle, Wash.	Человек	Конъюнктивит
UZG-1	M. van den Abeele, University Hospital, Ghent, Belgium	Человек	Пневмония	
2023	American Type Culture Collection, Manassas, Va.	Человек	ОРЗ	
2043	American Type Culture Collection, Manassas, Va.	Человек	Пневмония	
KKpn-15	N. Miyashita, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Okayama, Japan	Человек	Острый бронхит	
IOL-207	Shatkin A. A., Gamalei Institute, Moscow, Russia	Человек	Пневмония	
<i>C. psittaci</i>	6BC	American Type Culture Collection, Manassas, Va.	Попугай	Пситтакоз
	ORNI	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands	Человек	Пситтакоз
	D661	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands	Голубь	Причина смерти неизвестна
	P635	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands	Попугай	Здоровый носитель
	P650	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands	Попугай	Здоров; хозяин болен пситтакозом
<i>C. pecorum</i>	E58 (McNutt)	American Type Culture Collection, Manassas, Va.	Теленок	Энцефалит
<i>C. felis</i>	Cat12137	National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands	Кошка	Конъюнктивит

<sup>1</sup> ОРЗ – Острое респираторное заболевание

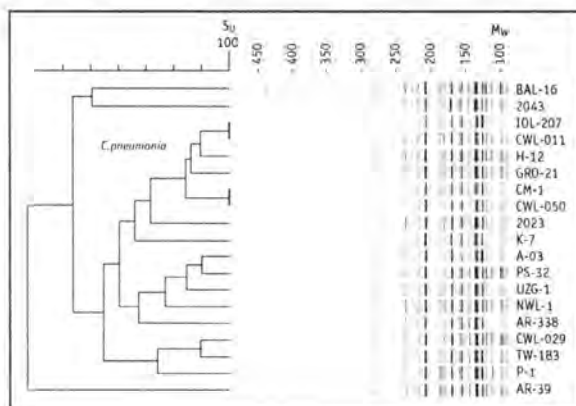


Рисунок 2.6. AFLP-отпечатки и филограмма 19 штаммов *C. pneumoniae*. Филограмма построена с помощью программы UPGMA на основании коэффициента Диска (SD). Значения SD (в процентах) и молекулярная масса (Mw) показаны вверху над филограммой и отпечатками соответственно. Названия штаммов указаны справа (подробнее см. табл. 2.3). (Meijer A., et al. 1999).

Таким образом, установлено, что геном человеческого биоара *Chlamydomphyla pneumoniae* весьма консервативен. Штаммы, выделенные в разных концах земного шара, отличаются генетически крайне незначительно. Различия в последовательности ДНК не превышают 5% (Braun et al., 1994; Emre et al., 1994). Однако такие различия существуют. Возможно, более детальный анализ в последующем позволит выявить различия между штаммами *C. pneumoniae*. Между отдельными изолятами рода *Chlamydomphyla psittaci* имеются различия, связанные

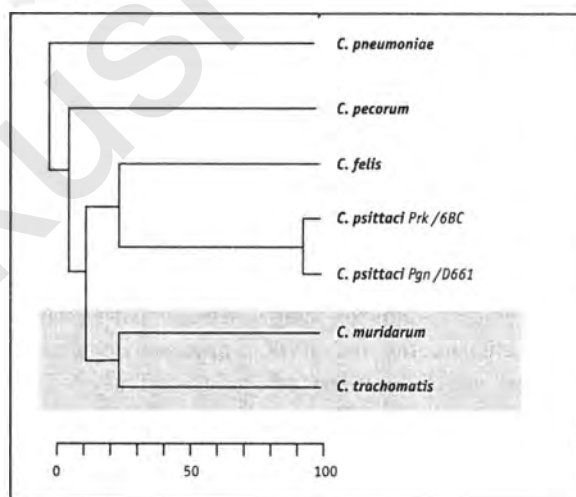


Рисунок 2.7. Филограмма двух видов рода *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum*) и четырех видов рода *Chlamydomphyla* (*C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. psittaci*) построена с помощью программы UPGMA на основании данных ДНК-ДНК-гибридизации (Everett, et al., 1999).



с видовой принадлежностью хозяев. В новой классификации представители рода *Chlamydophyla*, вызывающие патологию у млекопитающих, выделены в соответствующие виды (табл. 2.1). Так, штамм *C. psittaci* Pgn/D661, выделенный от голубя, отличается от штаммов Prk/6BC, ORNI, P635, P65, вызывающих патологию у попугаев. Филогенетические отношения между родами *Chlamydia* и *Chlamydophyla*, установленные на основании данных ДНК-ДНК-гибридизации, показаны на рис. 2.7.

### 2.2.3. Семейство *Parachlamydiaceae*

В 1993 году Fritsche и соавторы при изучении внутриклеточного паразитизма различных бактерий у амёб рода *Acanthamoeba* обнаружили грамтрицательные кокковидные бактерии, которые не росли на искусственных питательных средах. Было показано, что около 5% всех амёб (выделенных из окружающей среды и от больных амёбным кератитом) инфицированы микроорганизмами, морфологически напоминавшими *Rickettsiales* и *Chlamydiales*. Детальное электронномикроскопическое изучение выявило наличие жизненного цикла размножения у обнаруженных бактерий, характерного для *Chlamydiales* – с элементарными и ретикулярными тельцами (Gautom et al., 1996). Последующие морфологический и филогенетический анализы доказали принадлежность данных микроорганизмов к порядку *Chlamydiales* и обосновали их выделение в отдельное семейство, получившее название *Parachlamydiaceae*. Хламидии, паразитирующие в амёбах, получили видовое название *P. acanthamoebae* (Amann et al., 1997; Everett et al., 1999). К 2000 году было выделено уже шесть изолятов *Parachlamydiaceae* – с проведением филогенетического анализа и определением полной последовательности нуклеотидов 16S-субъединицы рибосомальной РНК (Fritsche et al., 2000). Эти данные, скорее всего, приведут к выделению в составе семейства *Parachlamydiaceae* дополнительных родовых и видовых таксонов. Была показана возможная роль *P. acanthamoebae* в возникновении респираторной патологии у человека (Birtles et al., 1997). Newsome и соавторы (1998) обнаружили *Parachlamydiaceae* путем амплификации фрагментов 16S-рРНК (216-224 пары нуклеотидов) в амёбах, паразитирующих в верхних дыхательных путях больных пневмонией, а также в макрофагах периферической крови и в ткани аорты. Однако для доказательства патогенного значения *Parachlamydiaceae* необходимы дальнейшие исследования.

Филогенетический анализ *Parachlamydiaceae* позволил установить их место в эволюционном древе *Chlamydiales* (табл. 2.4) (рис. 2.8). Fritsche и соавторы (2000) амплифицировали, клонировали и определили полную нуклеотидную последовательность 16S-рРНК четырех штаммов хламидий – эндосимбионтов амёб – UWC22, TUME1, UWE1 и UWE25. Сравнительный анализ последовательностей 16S-рРНК с другими представителями *Chlamydiales* показал их значительную эволюционную обособленность от *Chlamydiaceae* (т.е. от *Chlamydia* и *Chlamydophila*) – менее 85% гомологии по 16S-рРНК. Обособленность от *Simkaniaceae* и *Waddliaceae* – меньше. Отличия от *S. negevensis* и *W. chondrophila* составили соответственно 83,5% и 88,2%. Дальнейший анализ выявил, по крайней мере, две различные направленности эволюции внутриамёбных эндосимбионтов. Одну составили изоляты UWC22 и TUME1, которые имели 99,1% гомологии 16S-рРНК между собой и от 91,5 до 93,2% гомологии с *P. acanthamoebae*. Все четыре изолята и *P. acanthamoebae* включены в семейство *Parachlamydiaceae*.

Степень сходства нуклеотидных последовательностей (в %) 16S-рРНК пяти изолятов *Parachlamydiaceae* с другими представителями *Chlamydiales* (Fritsche et al., 2000)

Организм	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A <i>Chlamydomphila abortus</i> B577															
B <i>Chlamydomphila psittaci</i> 6BC	99.7														
C <i>Chlamydomphila felis</i> FP Baker	98.0	98.4													
D <i>Chlamydomphila caviae</i> GPIC	98.9	98.9	97.9												
E <i>Chlamydomphila pecorum</i> E58	96.2	96.5	95.9	96.1											
F <i>Chlamydia trachomatis</i> HAR-13	95.0	95.2	94.8	95.3	95.1										
G <i>Chlamydia suis</i> S45	94.3	94.7	94.4	94.5	94.5	97.3									
H <i>Chlamydia muridarum</i> MoPn	95.6	95.7	95.5	95.7	95.5	98.4	97.7								
I <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> TW-183	95.8	96.2	95.1	95.3	95.8	93.9	93.5	94.6							
J <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> Bn9	86.2	86.7	86.6	86.9	86.4	86.2	87.2	87.0	87.0						
K <i>Simkania negevensis</i> Z	83.5	83.8	83.9	83.9	83.6	84.2	84.4	84.2	83.7	88.2					
L <i>Parachlamydiaceae</i> UWE1	85.8	85.5	84.8	85.4	84.4	84.3	85.4	85.0	85.6	93.1	85.7				
M <i>Parachlamydiaceae</i> UWE25	86.2	86.0	85.6	86.0	85.6	85.4	85.9	86.1	86.3	92.5	85.4	93.0			
N <i>Parachlamydiaceae</i> UWC22	86.8	86.7	86.2	86.7	86.2	85.7	86.4	86.4	86.1	91.2	85.5	92.9	91.9		
O <i>Neochlamydia hartmannellae</i>	87.0	87.5	86.9	87.5	86.5	87.0	87.5	87.4	86.6	92.0	86.5	92.2	91.6	95.6	
P <i>Parachlamydiaceae</i> TUME1	86.8	87.2	86.8	87.2	86.8	86.3	87.0	87.0	86.6	91.2	85.9	92.3	91.4	99.4	
Q <i>Waddlia chondrophila</i> WSU-85-1044	84.4	84.6	84.4	84.6	84.2	84.7	84.8	84.9	84.4	87.2	84.4	87.1	87.9	87.0	87.0

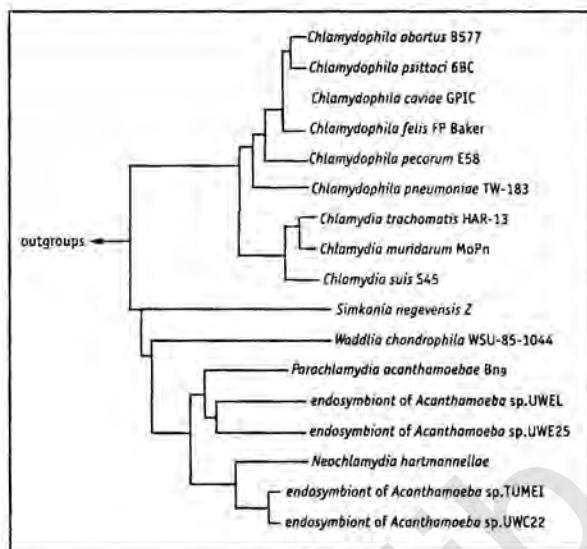


Рисунок 2.8. Дендрограмма, показывающая эволюционные взаимоотношения *Parachlamydiaceae* с другими представителями *Chlamydiales* (Horn et al., 2000).

Морфологически *Parachlamydia* представляют собой мелкие кокковидные микроорганизмы, которые окрашиваются по Граму отрицательно. Они не формируют включений и разбросаны по цитоплазме дисперсно, хотя могут формировать отдельные небольшие скопления (рис. 2.9). При электронной микроскопии в трофозонтах хорошо видны парахламидии на разных стадиях жизненного цикла, характерные для *Chlamydiales* – маленькие, электронноплотные элементарные тельца и большие по величине, менее плотные, ретикулярные тельца, которые подвергаются бинарному делению. В отличие от хламидий, парахламидии не образуют больших цитоплазматических включений со многими особями. Каждое тельце образует как бы собственное включение, поскольку окружено цитоплазматической мембраной хозяина. Некоторые парахламидии находятся в пищеварительных вакуолях амёб и подвергаются лизису. Однако жизнеспособные организмы обладают способностью выключать последнюю фазу фагоцитоза в клетке и размножаются внутри амёб. Когда амёба входит в стадию цисты, парахламидии формируют небольшие включения, состоящие исключительно из элементарных телец. В таком состоянии парахламидии могут длительно сохраняться и переживать неблагоприятные условия среды вместе с цистой (рис. 2.9). Таким образом, *Parachlamydia* хорошо приспособились к внутриклеточному существованию внутри амёб с учетом жизненного цикла самой амёбы. При этом хозяин сохраняет свою жизнедеятельность и не подвергается лизису. В данном случае взаимоотношения между парахламидиями и амёбами напоминают скорее симбиоз, чем классический паразитизм, когда паразит быстро истощает ресурсы хозяина и приводит его к гибели.

Horn и соавторы (2000) выделили новый эндопаразит амёбы *Hartmannella vermiformis*, который был классифицирован как *Neochlamydia hartmannellae*, с выделением в новый род *Neochlamydia* в составе семейства *Parachlamydiaceae*. Это граммотрицательный кокковидный

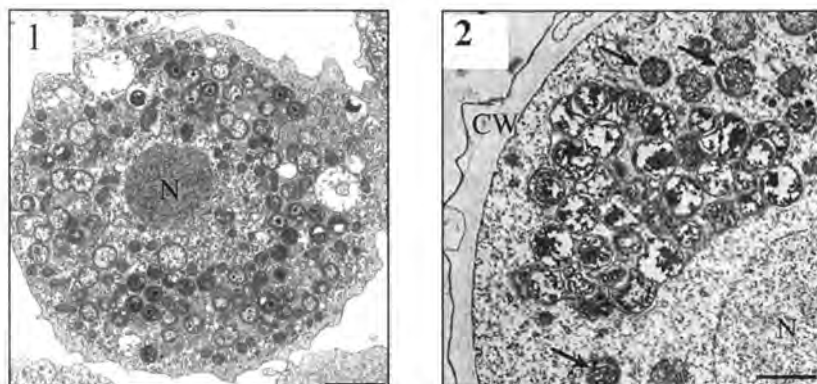


Рисунок 2.9.

- (1) Трофозоит *Acanthamoeba* (штамм UWE25) при низком увеличении в электронном микроскопе. Видны многочисленные бактерии, рассеянные по цитоплазме, на различных стадиях жизненного цикла (элементарные и ретикулярные тельца). N – ядро. Отрезок = 1 мкм.
- (2) Циста *Acanthamoeba* (штамм UWE25). Бактерии находятся в неактивной форме, т.к. стадии жизненного цикла отсутствуют. CW – клеточная стенка. N – ядро > митохондрии. Отрезок = 1 мкм. (Horn et al., 2000).

организм, не культивируемый на искусственных средах. Микроорганизм предотвращает развитие цисты у амебы-хозяина. Может размножаться также внутри амебы *Dictyostelium discoideum*, но не поражает другие амебы, в том числе и *Acanthamoeba*. Horn и соавторы (2000) успешно амплифицировали, клонировали и определили последовательность 16S-rРНК-ампиконов (1529 пар нуклеотидов). Данная последовательность оказалась наиболее близка к *P. acanthamoebae* (92%), что позволило отнести данный микроорганизм к семейству *Parachlamydiaceae* (Everett et al., 1999), но достаточной, чтобы выделить в отдельный род – *Neochlamydia*. *Neochlamydia hartmannellae* имеет морфологию и жизненный цикл, сходный с хламидиями – элементарными и ретикулярными тельцами, и размножается бинарным делением. Элементарные тельца имеют клеточную стенку, как у грамотрицательных бактерий (в отличие от некоторых штаммов *Parachlamydia acanthamoebae*, которые имеют клеточную стенку грамположительного типа (Amann et al., 1997)). В отличие от эндосимбионтов *Acanthamoeba*, ЭТ и РТ *N. hartmannellae* не окружены цитоплазматической мембраной и находятся непосредственно в цитоплазме. Это предполагает наличие особого механизма защиты от фагосом хозяина. Попав внутрь хозяина-амебы, *N. hartmannellae* быстро размножается, и через 3-5 дней происходит лизис амебы с высвобождением большого количества элементарных телец. Поскольку трофозоит гибнет, то *N. hartmannellae* является классическим паразитом. Такой агрессивный паразитизм предполагает не слишком длительные в эволюционном смысле взаимоотношения паразита с хозяином. Это биологическое свойство *N. hartmannellae* кардинально отличает ее от *P. acanthamoebae*, у которой наблюдаются преимущественно симбионтные отношения с хозяином.

Приспособление к внутриклеточному существованию у амеб, которые чрезвычайно обильно представлены во внешней среде, возможно, отражает определенный этап эволюции предков хламидий в процессе их адаптации к паразитизму в высших эукариотах. Это вызывает вопрос о патогенном значении *Parachlamydiaceae*. Ответа на этот вопрос пока нет.



Учитывая тот факт, что практически все пока известные представители *Chlamydiales* являются безусловными патогенами человека и животных, нельзя исключить патогенные потенции парахламидий. Амебы чрезвычайно распространены в окружающей среде, они колонизируют слизистую оболочку человека и животных. Поскольку, по данным литературы, до 5% всех амеб инфицированы парахламидиями, то они легко попадают в организм человека – прежде всего в дыхательную и половую системы, которые поражаются при инфекциях, вызванных *Chlamydiales*. Требуется изучения способность парахламидий размножаться в макрофагах и эпителиальных клетках человека. Не исключено, что переключение на эволюционно более «молодого» хозяина привело не к симбиозу, а к классическому паразитизму с гибелью клеток и инфицированию новых клеток в условиях среды многоклеточного макроорганизма.

#### 2.2.4. Семейство *Waddliaceae*

В 1990 году группа под руководством Dilbeck в Лаборатории диагностики заболеваний животных в городе Пулман, при университете штата Вашингтон, США (Washington Animal Diseases Diagnostic Laboratory, Pullman, WA, USA) опубликовала описание микроорганизма, который был выделен из абортированного материала коровы в 1986 году. Позднее этот микроорганизм получил название WSU 86-1044T (по названию университета штата Вашингтон – Washington State University). Микроорганизм был выделен в культуре клеток ВТ (bovine turbinate) после инокуляции ее гомогенатом печени и легких погибшего плода. Цитопатический эффект проявлялся через 2-3 дня. Была проведена серия пассажей. Организм накапливался быстро – свыше 100 000 000 (10<sup>8</sup>) инфекционных доз на 1 мл за 3 дня (Dilbeck et al., 1990). Размножение подавлялось тетрациклином, однако пенициллин и гентамицин на микроб не действовали. WSU 86-1044T – мелкие бактерии размером 0,2-0,4 мкм, морфологически сходные с *Rickettsia* и находящиеся внутри цитоплазматических включений. Электронная микроскопия выявила наличие жизненного цикла, напоминавшего таковой у *Ehrlichia* и *Chlamydia* – со сменой характерных ретикулярных и элементарных телец (Kocan et al., 1990). Серологическое типирование WSU 86-1044T не удалось, поскольку организм не реагировал ни с моноклональными антителами, ни с поликлональными сыворотками, направленными против различных представителей *Rickettsia*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Wolbachia*, *Anaplasma* и др. Наблюдалась только слабая реакция с антисывороткой к *Cowdria ruminantium*. WSU 86-1044T тогда не был таксономически классифицирован. Было ясно, что WSU 86-1044T морфологически сходен с риккетсиями и хламидиями, но в антигенном отношении имелись существенные различия. Организм был абсолютно резистентен к пенициллину, хотя все известные хламидии чувствительны (хотя и незначительно) к бета-лактамам антибиотикам *in vitro* (Moulder et al., 1991).

Позже Rurangirwa и соавторы (1999) предприняли попытку классифицировать агент WSU 86-1044T. ДНК, кодирующая 16S-рРНК, была амплифицирована с помощью ПЦР, и была определена ее последовательность. Сравнение последовательности с аналогичными 16S-рРНК других бактерий, имеющимися в базе данных GenBank, позволило таксономически определить организм WSU 86-1044T как представителя порядка *Chlamydiales*, с выделением нового семейства *Waddliaceae*. Имеет место > 84,5% сходства последовательности с другими представителями *Chlamydiales*. С *Rickettsia*, включая *Cowdria ruminantium*, наблюдалось сходство в 72-72,9%. С представителями *Ehrlichia* – в 72,1%.

## ГЛАВА 3.

### СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ *CHLAMYDIALES*

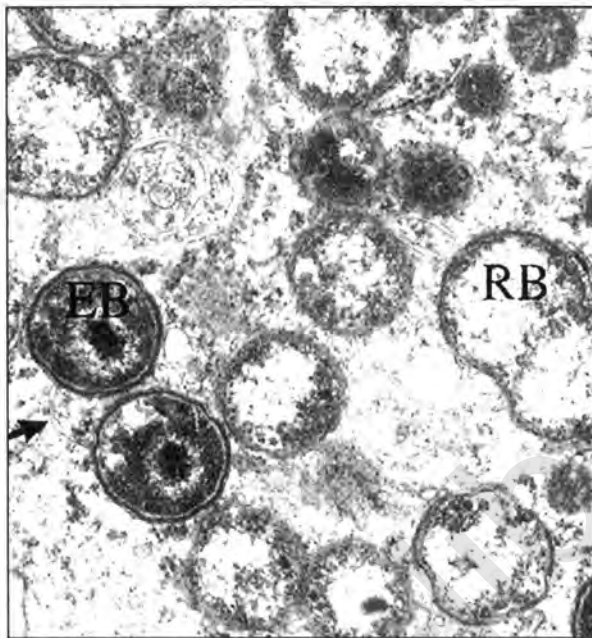
Являясь облигатными внутриклеточными паразитами, *Chlamydiales* выработали чрезвычайно эффективные механизмы адаптации к существованию как внутри, так и вне клетки-хозяина. Они легко проникают в клетку, избегают воздействия защитных механизмов, перестраивают метаболизм клетки, обеспечивая собственное размножение. Хламидии способны покидать клетку и долго выживать во внеклеточной среде, дожидаясь следующего жизненного цикла. Цикл развития протекает в цитоплазматическом включении – паразитофорной вакуоли, которая сама по себе претерпевает сложный цикл развития и являет собою пример того, как паразит заставляет клетку работать на себя (Hackstadt, 1999). Жизненный цикл хламидий напоминает процесс споруляции у других бактерий: устойчивые во внешней среде, находящиеся в метаболическом покое, спороподобные формы и метаболически активные вегетативные формы.

Современные представления о морфологии, физиологии, химическом составе и метаболизме хламидий основаны на суммировании ряда характеристик, полученных при изучении различных представителей *Chlamydiales*. Большая часть данных получена при изучении представителей родов *Chlamydia* и *Chlamydophyla*. Что касается недавно описанных *Parachlamydia*, *Neochlamydia*, *Simkania* и *Waddlia*, то информации об их структурных и функциональных характеристиках пока накоплено мало. В данном разделе представлено современное понимание биологии хламидий, особенностей их морфологии, жизненного цикла и закономерностей их жизнедеятельности внутри клетки. Ввиду диалектической связи структуры и функции, морфология, биохимия, физиология хламидий и чувствительной клетки будут рассматриваться вместе.

#### 3.1. ОБЩАЯ МОРФОЛОГИЯ

Основными формами хламидий являются элементарные (ЭТ) и ретикулярные (РТ) тельца (синоним: инициальные тельца). Промежуточные формы, выявляемые в цикле развития, определяются как переходные, или промежуточные, тельца (ПТ). Эти формы имеют ультраструктурные, биологические и функциональные отличия, сходные у различных представителей *Chlamydiales*. Зрелой формой возбудителя урогенитальных хламидиозов (так же, как и других хламидий) является сферическое ЭТ с диаметром 250-300 нм (рис. 3.1).

Основная функция ЭТ – выжить продолжительное время во внеклеточной среде (внутри многоклеточного организма или во внешней среде) и инфицировать чувствительную клетку. Метаболические процессы в ЭТ находятся в состоянии покоя. ЭТ снаружи ограничено двумя трехслойными (унитарными) мембранами, каждая толщиной 8 нм. Эти мембраны являются морфологическими аналогами клеточной стенки и цитоплазматической мембраны грамотрицательных бактерий. Внутри ЭТ имеются цитоплазма, содержащая рибосомы, и нуклеоид. Клеточная стенка ЭТ содержит дифференцированные структуры, которые участвуют в первичном взаимодействии с клеткой хозяина на начальном этапе ее инфицирования. Клеточная стенка с находящимся под ней промежуточным слоем, который рассматривают как аналог пептидогликанового слоя грамотрицательных бактерий, ответственна за ригидность ЭТ.



**Рисунок 3.1.** Формы жизненного цикла *Chlamydiales*. Цикл развития состоит в превращении элементарных тельц (EB) в ретикулярные тельца (RB), которые претерпевают деление. Клетка содержит одновременно тельца на разных стадиях развития (асинхронность жизненного цикла). (Отрезок = 1 мкм). (Fritsche et al., 2000).

ЭТ сохраняют форму сферы как внутри, так и вне клетки хозяина. Клеточная стенка содержит различные антигенные компоненты, выявляемые с помощью иммунологических реакций. Цитоплазматическая мембрана ЭТ тесно прилегает к цитоплазме или к плотному компактному нуклеоиду, если он располагается эксцентрично. Цитоплазма ЭТ отличается значительной плотностью и содержит плотно упакованные рибосомы и мелкие гранулы полисахаридной природы. Нуклеоид, содержащий генетический аппарат ЭТ – плотно упакованную ДНК – часто имеет эксцентричное расположение, что характерно для вирулентных штаммов хламидий (Попов, 1979). Попадая внутрь чувствительной клетки, ЭТ быстро (у некоторых штаммов спустя 1-2 часа) начинают трансформироваться в РТ. При этом происходит деконденсация плотно упакованной бактериальной хромосомы, которая из состояния «сверхспирализации» переходит в релаксированную кольцевидную форму. Это необходимо для экспрессии множества генов, кодирующих необходимые для жизнедеятельности ферменты и структурные макромолекулы. На этой стадии размер клеток не меняется.

Ретикулярные тельца (РТ) представляют собой вегетативную форму хламидий, образующуюся внутри клетки хозяина (способной к размножению) и являющуюся предшественником нового поколения ЭТ. РТ весьма лабильны, обладают выраженной метаболической активностью. РТ представляют собой овальные или округлые образования со средними размерами 400-600 x 800-1000 нм (рис. 3.1). Форма РТ зависит от плотности упаковки включения и прилегающих морфологических структур размножающихся хламидий (Шаткин, Мавров,

1983). РТ окружены двумя трехслойными мембранами, соответствующими мембране клеточной стенки и цитоплазматической мембране грамотрицательных бактерий. В ультратонких срезах толщина каждой из этих мембран около 8 нм. На поверхности клеточной стенки РТ обнаружена микрокапсула (Попов, 1979) в виде хлопьевидного материала, которая содержит полисахариды, как и сама клеточная стенка.

Клеточная стенка РТ так же, как и клеточная стенка ЭТ, содержит антигенные компоненты, выявляемые в иммунологических реакциях. Ригидный слой клеточной стенки у РТ отсутствует (Garret et al., 1974), что объясняет ее высокую пластичность. Между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной находится периплазматическое пространство (периплазматический слой). Цитоплазматическая мембрана ограничивает протопласт РТ, содержащий цитоплазму с рибосомами и нуклеоид, представленный фибриллами ДНК. Иногда нуклеоид может занимать центральную часть протопласта. В ультратонких срезах молекула ДНК имеет вид рыхло упакованных фибрилл в виде сетчатых (ретикулярных) структур толщиной 24 нм. При изучении ультратонких криосрезов РТ, окрашенных амином осмия по Готье, толщина нитей нуклеоида составляет 5-10 нм (Popov et al., 1991).

Переходные, или промежуточные, тельца (ПТ) образуются на двух стадиях цикла развития хламидий: на ранней – при преобразовании ЭТ в РТ (дисперсные ПТ), и на поздней – при реорганизации РТ в ЭТ (конденсированные ПТ). Морфологически они весьма сходны, но различаются по направленности происходящих в них процессов (например, деконденсации и конденсации нуклеоида, разрушения и формирования клеточной стенки). ПТ обычно имеют размеры несколько большие, чем ЭТ. Они ограничены клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной. Их внутреннее содержимое представлено фибриллярным нуклеоидом, находящимся в разной степени конденсации, и рибосомами. Рибосомы выявляются в цитоплазме, расположенной по периферии ПТ.

Представленные характеристики основных форм хламидий указывают на сходство строения РТ с грамотрицательными бактериями. Функциональные отличия РТ и ЭТ нашли отражение и в их определении: РТ – как «вегетативных», а ЭТ – как «спороподобных» форм хламидий. ЭТ и РТ обладают различными тинкториальными свойствами, что позволяет дифференцировать эти формы и при световой микроскопии. При окраске по методам Романовского-Гимзы, Мая-Грюнвальда-Гимзы, Маккиавелло и Хименеса ЭТ приобретают красное или фиолетово-красное окрашивание. Тинкториальные свойства РТ определяются их выраженной базофильностью (как у грамотрицательных бактерий). При окраске по методам Романовского-Гимзы и Маккиавелло они окрашиваются соответственно в синий и голубой цвет (Шаткин, Мавров, 1983).

### 3.2. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ

Определяющей биологической характеристикой *Chlamydiales* является уникальный облигатный внутриклеточный жизненный цикл. Суть его заключается в постепенном переходе через ряд промежуточных стадий от мелких (0,3 мкм) инфекционных элементарных телец (ЭТ) к более крупным (1 мкм), метаболически активным и делящимся ретикулярным тельцам (РТ). Этот цикл был впервые описан Bedson и Bland в 1932 году. Последующие многочисленные электронномикроскопические исследования точно охарактеризовали морфологию ЭТ и РТ, а также промежуточных форм, фазы жизненного цикла и строение мембраны (ограничивающей внутриклеточное включение, где происходит размножение хламидий) (Matsumoto, 1988;

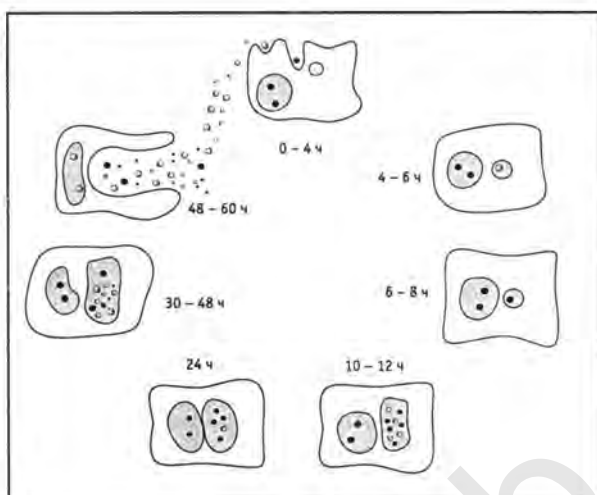


Рисунок 3.2. Схема цикла развития *Chlamydia* в чувствительной клетке (Шаткин, Мавров, 1983).

Ward, 1983, 1988). Схематично и упрощенно основные морфологические этапы этого цикла у *Chlamydia trachomatis* представлены на рис. 3.2. Можно условно выделить четыре этапа: прикрепление, внедрение, размножение и созревание внутри включения, выход во внеклеточную среду.

- **0-4 ч** после заражения – инфекционные ЭТ адсорбируются на поверхности клетки, в месте прикрепления ЭТ наблюдается инвагинация (выпячивание) плазмалеммы.
- **4-6 ч** – отделение и замыкание плазмалеммы вокруг ЭТ с образованием фагоцитарной вакуоли.
- **6-8 ч** – фагосомы, содержащие ЭТ, перемещаются в зону Гольджи, преобразование ЭТ в РТ через ПТ или «дисперсные» формы.
- **10-12 ч** – деление РТ (может продолжаться до 30-36 ч).
- **24 ч** – РТ начинают преобразовываться в ЭТ нового поколения через ПТ или «конденсированные» формы. Этот процесс сопровождается конденсацией внутреннего содержимого РТ и последовательным уменьшением их размера.
- **48-60 ч** – цитоплазматические включения содержат преимущественно ЭТ, которые затем выходят из лизированной клетки, завершая цикл развития.

### 3.2.1. Прикрепление и внедрение

Вначале инфекционные ЭТ адсорбируются на поверхности клетки. Они обладают высокой аффинностью к эукариотным клеткам. Так, ЭТ прикрепляются к наружной мембране клетки в 10-100 раз более эффективно, чем полистироновые латексные шарики или *Escherichia coli* (Hackstadt, 1999). Процесс внедрения внутрь клетки также весьма эффективен и носит название «паразит-специфический эндоцитоз» – поглощение непрофессиональным фагоцитом строго определенного паразита. Причем паразит, наряду с клеткой-хозяином, сам активно участвует в эндоцитозе (Byrne, Moulder, 1978).



В последние годы получено много сведений о первичном взаимодействии хламидий с клеткой хозяина, однако точный его механизм остается неизвестным. Не идентифицированы окончательно лиганды и распознаваемые рецепторы на поверхности паразита и хозяина. По этому вопросу имеются противоречивые данные. Возможно, потому что этот процесс изучался у разных видов и штаммов хламидий, которые выращивались на разных клеточных культурах, в разных условиях. Требуется клонировать множество генов, чтобы определить протеины, ответственные за прикрепление к клетке.

Процесс взаимодействия рецептор-лиганд является жизненно важным для паразита. Его избирательное подавление предотвращает инфекцию и затрудняет экспериментальные исследования. Кроме того, внедрение паразита в клетку возможно с помощью нескольких механизмов, которые реализуются в зависимости от штамма, клетки-хозяина и ряда условий. У различных представителей *Chlamydiales* процесс прикрепления к клетке протекает неодинаково. Имеются видовые и внутривидовые различия. Два биовара *C. trachomatis* – LGV (серотипы А-К) и *Trachoma* (серотипы L1, L2, L3), вызывающие различную патологию у человека, по-разному взаимодействуют с клетками культуры. Еще на ранних этапах исследования биологических свойств хламидий было установлено, что биовар *Trachoma* лучше прикрепляется и внедряется в монослой культуры клеток при их обработке DEAE-декстраном или поли-L-лизинном, а также при центрифугировании инокулята на монослой. На внедрение биовара LGV подобные процедуры влияния не оказывают (Kuo et al., 1972, 1973; Kuo, Grayston, 1976). Биовар LGV реплицируется быстрее, обладает более выраженным цитопатическим эффектом и, в отличие от биовара *Trachoma*, образует в монослое участки, лишенные клеток (plaques) (Banks et al., 1970; Matsumoto et al., 1998). Кроме того, LGV-штаммы выживают и размножаются в моноцитах периферической крови человека, тогда как большинство штаммов *Trachoma* в этих условиях погибают (Yong et al., 1987). Нами была показана способность клинических изолятов биовара *Trachoma* выживать в моноцитах периферической крови *in vivo* (Мавров, 1996).

Поверхность ЭТ обладает гидрофобными свойствами и отрицательным зарядом при нейтральном pH. Различий между штаммами, которые могли бы объяснить разную эффективность внедрения в клетку, не выявлено (Kraairopoel, van Duin, 1979; Soderlund, Kihstrom, 1982). Главный белок наружной мембраны (MOMP) всех изученных штаммов *C. trachomatis* имел примерно равную изоэлектрическую точку (pI) в интервале 5,3-5,5. Существенные различия между штаммами в поверхностных свойствах выявлены на уровне двух богатых цистеином белков наружной мембраны массой 12 kDa (OmpA) и 60 kDa (OmpB). Так OmpB штаммов биовара *Trachoma* имели pI, равную 7,3-7,7, а штаммов биовара LGV – более чем 8,5. A OmpA штаммов биовара *Trachoma* имели pI около 6,9, а штаммов биовара LGV – примерно 5,4 (Batteiger et al., 1985; Allen et al., 1990).

Вначале исследования по внедрению хламидий в клетку были направлены на сравнительное изучение взаимодействия нативных и химически или физически измененных ЭТ как с неизмененными клетками, так и с клетками, подвергшимися различным воздействиям. Если фиксировать клетки формальдегидом или лишить их АТФ, то они теряют способность поглощать прикрепленные к ним ЭТ хламидий (Hatch et al., 1981a; Vretou et al., 1989; Ting et al., 1995). Весьма важно влияние температуры на взаимодействие ЭТ с клеткой-хозяином. Прикрепление и эндоцитоз зависят от температуры. При температуре ниже 22°C происходит только прикрепление, а эндоцитоз не наблюдается. При 37°C – условия для прикрепления и эндоцитоза наиболее благоприятны (Friis, 1972; Kuo, Grayston, 1976). Инактивация ЭТ

теплом изменяет взаимодействие их с клеткой. Так, нагревание до 60°C в течение 3 мин снижает прикрепление на 60-70%. После внедрения хламидии, подвергшиеся тепловой инактивации, не образуют характерных включений, а перевариваются клеткой в фаголизосомах (Friis, 1972; Byrne, 1976; Hatch et al., 1981). Однако Lee (1981) не обнаружил какого-либо эффекта от мягкого температурного воздействия на прикрепление серовара *A C. trachomatis* к чувствительным клеткам.

Клетка может одновременно поглощать несколько ЭТ, однако их количество не может быть большим. Изучение кинетики поглощения с целью определения максимального числа ЭТ, которые могут внедриться в клетку, а следовательно, и количества рецепторов на поверхности клетки, было предпринято вначале Moulder с соавторами (1976), а затем Vretou с соавторами (1989). Прикрепление большого количества ЭТ к клетке вызывало ее немедленную гибель. Тем не менее, исходя из изучения взаимодействия хламидий с клеткой, можно сделать вывод о наличии множества рецепторов по всей поверхности клетки. Для индукции инфекции теоретически достаточно проникновения в клетку одного ЭТ (Шаткин, Мавров, 1983).

Рецептор, распознаваемый ЭТ на поверхности чувствительной клетки – это белок или гликопептид, поскольку он чрезвычайно чувствителен к протеолитическим ферментам. Обработка клеток даже малыми количествами трипсина делает их невосприимчивыми к заражению хламидиями. Восприимчивость клеток восстанавливается не ранее чем через 4 ч. Способность клеток восстанавливать чувствительность подавляется циклогексимидом (Byrne, 1976; Byrne, Moulder, 1978). Весьма вероятно, что данный рецептор является гликопротеином, о чем свидетельствует тот факт, что периодат подавляет прикрепление *C. psittaci* к клеткам культуры L, фиксированным параформальдегидом. Кроме того, прикрепление биовара *Trachoma* (но не биовара LGV) подавляется нейраминидазой, которая удаляет остатки сиаловой кислоты (Kuo et al., 1973; Bose et al., 1983). Однако другие исследователи не подтвердили эти результаты, что поставило под сомнение необходимость гликозилирования протеинов для осуществления функции прикрепления. Простые сахара в эксперименте не конкурируют с ЭТ за рецепторы прикрепления, за исключением ди- и трисахаридов N-ацетилглюкозамина – хитобиозов и хитотриозов (Hatch et al., 1981; Soderlund, Kihstrom, 1983a). Однако лектины и углеводные остатки гликана (N-ацетилнейраминавая и N-ацетилглюкозаминавая кислоты) конкурируют с ЭТ за связывание с клетками некоторых клеточных культур, на которых растут хламидии (Bose, Goswami, 1986). Примечательно, что клетки насекомых, в которых гликановые сахара отсутствуют, способны поглощать *C. trachomatis* биоваров LGV и *Trachoma* (Allan, Pearce, 1987).

Поверхность ЭТ хламидий, в отличие от поверхности клеток-хозяев, не чувствительна к воздействию протеолитических ферментов в смысле влияния на процессы прикрепления. Так, *C. psittaci*, штамм 6BC и *C. trachomatis*, серотипы L2 и L3 резистентны к поверхностному протеолизису, тогда как *C. trachomatis*, серотип B и *C. psittaci*, штамм GPIC при обработке трипсином не прикрепляются к клеткам культуры HeLa (Byrne, Moulder, 1978; Hatch et al., 1981a; Bose, Paul, 1982; Hackstadt, Caldwell, 1985; Su et al., 1990; Ting et al., 1995). Эти штаммовые различия объясняются разной чувствительностью поверхностных доменов МОР у различных видов и штаммов к протеолитическому расщеплению (Su et al., 1988).

Электростатические силы играют важную роль на первой стадии взаимодействия инфекционного ЭТ хламидий и клетки-хозяина. Для прикрепления к клетке нужны положительно заряженные ионы, чтобы нейтрализовать отрицательный заряд на поверхности ЭТ.

Двухвалентные катионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  усиливают связывание *C. psittaci* и *C. trachomatis* с L-клетками (культура мышинных фибробластов) как с нативными, так и с фиксированными глютаральдегидами. Высокие концентрации ионов  $\text{Na}^+$  (~100 мМ/л) также способствовали прикреплению хламидий к клеткам (Hatch et al., 1981; Sneddon, Wenman, 1985).

В начальный период, охватывающий примерно первые 4 ч после заражения, в месте прикрепления ЭТ наблюдаются инвагинация (выпячивание), его отделение и замыкание плазмалеммы вокруг ЭТ с образованием фагоцитарного участка плазмалеммы вакуоли. Каким образом происходит внедрение хламидий в клетку, точно не установлено. По имеющимся данным, здесь присутствует несколько механизмов поглощения. Поскольку хламидии внедряются в клетки, не являющиеся профессиональными фагоцитами, то вначале они взаимодействуют со специфическим рецептором на поверхности клетки, после чего путем сигнальной трансдукции активируются процессы, приводящие к изменению структуры цитоскелета в месте внедрения ЭТ.

Известно два механизма поглощения бактерий нефагоцитирующими клетками: механизм по типу застевки-молнии, при котором вначале имеет место прямой тесный контакт между бактериальным лигандом и триггерный механизм, сопровождающийся массивной реорганизацией цитоскелета, изменением свойств наружной мембраны и макропиноцитозом. В случае хламидий, по-видимому, имеет место механизм по типу молнии, поскольку морфологических признаков макропиноцитоза при внедрении хламидий в чувствительную клетку не обнаружено (Ward, Murray, 1984; Finlay, Cossart, 1997). Обычно ЭТ прикрепляются к клетке у основания микроворсинок, где и происходит поглощение с образованием микровезикулы. Было показано, что поглощение *C. trachomatis* и *C. psittaci* может происходить как путем эндоцитоза, опосредованного рецептором (когда образуется углубление в наружной мембране, покрытое клатрином), так и захватом в везикулы, не покрытые клатрином. В месте контакта плазматическая мембрана клетки-хозяина утолщается, становится более плотной. Вновь образовавшееся включение окружено фибриллярным материалом. С помощью электронной микроскопии во включении вместе с ЭТ выявляется меченный золотом коллоид  $\alpha^2$ -макроглобулина, который является маркером эндоцитоза, опосредованного рецептором. Включение, как правило, содержит клатрин, что было показано с помощью иммуноэлектронной микроскопии (Ward, Murray, 1984; Hodinka, Wyrick, 1986; Hodinka et al., 1988).

По-иному описали взаимодействие *C. trachomatis* и *C. psittaci* с клетками McCoу на начальном этапе Reynolds, Pearce (1990). Небольшая часть ЭТ обоих видов наблюдалась в ассоциации с окружающей клеточной мембраной, которая «отщипывалась» с образованием пузырьков. Ward, Murray (1984) изучили ультраструктурные детали поглощения *C. trachomatis*, серотип L2 после центрифугирования на монослойные культуры клеток. Используя дубильную кислоту для визуализации клатрина, авторы не обнаружили его на плазматической мембране в месте контакта с ЭТ или в мембране, окружающей включение с содержанием ЭТ. Было установлено, что механизм внедрения хламидий в клетку и их дальнейшее продвижение зависят от способа инокуляции – центрифугирования или статической инкубации (Prain, Pearce, 1989). Обработка клеток антимиетаболитом цитохалазином D или инкубация при 20°C не подавляли внедрения *C. psittaci*, штамм GPIC в клетки при статической инкубации, однако эти же воздействия препятствовали инфицированию клеток в случае, если инокулят центрифугировали на монослой. Эти результаты свидетельствуют о том, что при статической инкубации хламидий с чувствительными клетками они внедряются путем пиноцитоза, тогда как при центрифугировании

преобладает фагоцитоз. Однако при хламидийной инфекции *in vivo* имеют место оба механизма. Это было показано при изучении внедрения *C. trachomatis* в поляризованные эпителиальные клетки человека. Было установлено, что клетки HeLa и эпителиальные клетки эндометриальных желез человека чаще поглощают ЭТ путем эндоцитоза, если их выращивать на коллагеновых фильтрах, а не на пластиковой поверхности (Wyrick et al., 1989). Результат действия специфических ингибиторов рецепторзависимого эндоцитоза – монодансилкадаверина, метиламина и амантадина — зависит от метода инокуляции (Soderlund, Kihlstrom, 1983; Ward, Murray, 1984).

Весьма вероятно, что ЭТ хламидий каким-то образом сигнализируют клетке, чтобы она начала поглощение. Молекулярная природа этих сигналов, заключающаяся в каскадном превращении ряда субстанций в клеточных мембранах, окончательно не установлена. Накопленные данные позволяют предположить несколько механизмов. В одном из них ведущую роль играют циклические нуклеотиды. Установлено, что инфекционность *C. trachomatis* усиливается, если за 2 ч до заражения культуру обработать аналогом цГМФ, и существенно ослабевает, если обработать ее аналогом цАМФ. Данные аналоги конкурируют с природными нуклеотидами и выключают их действие. Таким образом, для внедрения хламидий в клетку необходим циклический аденозинмонофосфат – цАМФ (Ward, Salari, 1980, 1982). Обработка клеток простагландинами, которые повышают концентрацию цГМФ в цитозоле, также усиливает инфекционность хламидий, а ингибиторы синтеза простагландинов блокируют этот эффект.

Прикрепление хламидий к клетке сопровождается притоком в неё кальция. Считается, что кальций необходим для активации кальцийзависимого мембранного фермента фосфолипазы A<sub>2</sub>, который участвует в синтезе простагландинов. В процессе прикрепления также участвует кальмодулин – регуляторный белок, связывающий кальций. Ингибиторы кальмодулина существенно снижают инфекционность хламидий при заражении культуры клеток методом центрифугирования (Murray, Ward, 1984). Однако при инокуляции без центрифугирования связывание внутриклеточного кальция хелатными молекулами существенно не влияет на стадию внедрения хламидий в клетку. При внедрении хламидий без центрифугирования содержание кальция в клетке не меняется, что показано с помощью радиометрических методов. Тем не менее кальций необходим для внутриклеточного развития хламидий независимо от механизма проникновения в клетку, поскольку антагонисты кальция подавляют их жизненный цикл (Murray, Ward, 1984; Shainkin-Kestenbaum et al., 1989; Majeed et al., 1993).

Хламидии, как и другие внутриклеточные паразиты, «запускают» фосфорилирование остатков тирозина в белках клетки-хозяина, что является одним из метаболических путей сигнальной трансдукции, приводящей к перераспределению сократительного белка актина и изменению физико-химических свойств цитоскелета. Это создает условия для внедрения в клетку и последующего формирования внутриклеточного включения. Birkelund и соавторы (1994) определили с помощью иммуноблоттинга, что уже через 15 мин после внедрения *C. trachomatis*, серотип L2 в клетки HeLa происходит фосфорилирование тирозина в белковых фракциях массой 64, 66, 68, а также 97 и 140 kDa. Сходные данные были получены Fawaz и соавторами (1997), которые идентифицировали тирозин-фосфорилированные протеины размером 75–85 kDa сразу после инфицирования, а затем во включении, содержащем ЭТ хламидий. Фосфорилирование остатков тирозина наблюдается у клеток после обработки цитохалазином, который подавляет эндоцитоз. Для запуска процесса фосфорилирования достаточно прикрепления ЭТ к клетке. Протеины 75–85 kD связаны с цитоскелетом



и сократительным белком – актином. Фосфорилирование сократительного белка контрактина наблюдалось Dehio и соавторами (1995) в месте внедрения в эукариотные клетки *Shigella flexneri*. Данные, полученные при изучении хламидийной инфекции, показывают, что здесь имеют место аналогичные механизмы.

Полагают, что белки клетки-хозяина динамин и Eps-15 участвуют в клатринзависимом эндоцитозе. Voleti и соавторы (2000) инокулировали *C. psittaci* (serovar GPIC), *C. trachomatis* (serovar LGV/L2) в две мутантные линии клеток HeLa: dyn-1 K44A, с дефектом синтеза динамина и Eps-15 GFP-ЕД 95/295, с дефектом синтеза Eps-15. Внедрение хламидий в клетки dyn-1 K44A было нормальным, однако рост включений подавлялся. В клетках Eps-15 GFP-ЕД 95/295 хламидии развивались нормально. Было сделано заключение, что клатрин не участвует в поглощении. Он необходим для движения везикул между включением и внутриклеточными органеллами. Поскольку цитохалазин D подавляет поглощение хламидий клетками более чем на 90%, то это указывает на актинзависимый фагоцитоз, не связанный с динамином. Исходя из этих данных, можно предположить, что у хламидий имеют место разные пути внедрения в клетку – в зависимости от факторов среды и свойств клетки.

### 3.2.2. Внутриклеточное развитие

Клеточная среда является экстремальной для внутриклеточного паразита. Точно так же, как экстракеллюлярный паразит приспосабливается к неблагоприятным условиям существования во внешней среде, хламидии выработали адаптивные механизмы защиты от разрушающего воздействия клетки-хозяина. Характер этих механизмов у различных внутриклеточных бактерий отличается (Moulder, 1985; Falkow et al., 1992; Hackstadt, 1998). До недавнего времени способность избегать лизиса со стороны лизосом связывалась со способностью бактерий занимать определенное положение в клетке. Большинство бактерий, таких как *Rickettsia*, *Shigella*, *Listeria* «уходят» от лизосом и размножаются непосредственно в цитоплазме. Немногие другие (*Coxiella burnetii* и, возможно, *Leishmania*) приспособились к существованию внутри фаголизосом и даже «требуют» выраженной кислой среды pH для осуществления своего метаболизма. Функция эндосом и лизосом у внутриклеточных паразитов подавляется на разных стадиях их жизненного цикла (Small et al., 1994; Garcia-del Portillo, Finlay, 1995; Clemens, 1996; Russell, 1996). Что касается *Chlamydiales*, то они подавляют слияние включения с лизосомой клетки-хозяина и образование фаголизосомы. Это было показано в ранних исследованиях отсутствием в хламидийных включениях кислой фосфатазы – маркера лизосом, а также неспособностью включений сливаться с лизосомами, мечеными ферритином (Friis, 1972; Lawn et al., 1973; Wyrick, Brownridge, 1978).

Элементарные тельца поглощаются клеткой путем инвагинации плазматической мембраны, которая вначале плотно окутывает ЭТ и прочно с ним ассоциирована. Образуется цитоплазматический пузырек (первичное включение), свойства которого на ранней стадии инфекции мало изучены. Неясно, какие белки клетки-хозяина содержит пузырек и каковы взаимоотношения этого первичного включения с клеткой. При поглощении эукариотной клеткой инородного тела обычно формируется внутриклеточный пузырек, который претерпевает быстрое созревание – от стадии ранней эндосомы до стадии поздней эндосомы, а затем и лизосомы. Существуют протеины, специфичные для каждой из фаз такого созревания. Они служат маркерами данного процесса. При хламидийной инфекции пузырьки, содержащие



ЭТ, не созревают до стадии лизосом. Добавление в среду ингибиторов синтеза белка (например, хлорамфеникола) не снижает способности ЭТ подавлять подключение лизосом. Добавление ингибиторов транскрипции и трансляции бактерий выключает этот процесс. Переваривание погибших хламидий начинается спустя лишь 20 ч после поглощения (Friis, 1972; Scidmore et al., 1996). Если добавить в культуру чувствительных клеток очищенные клеточные стенки хламидий, то они успешно поглощаются и также тормозят формирование фаголизосом. По-видимому, фактор, определяющий этот процесс, находится на поверхности ЭТ, а не синтезируется в первые часы после инфицирования (Levy, Moulder, 1982; Eissenberg et al., 1983). Возможно, данное свойство клеточной стенки хламидий обуславливает общую резистентность к лизирующим системам клетки-хозяина. Данный фактор – термолабильный, он нейтрализуется предварительным нагреванием ЭТ. Возможно, речь идет о молекулах белковой природы, поскольку нагретые ЭТ демонстрируют отличный от нативных ЭТ белковый профиль при электрофорезе (Zeichner, 1983). Фактор, препятствующий подключению лизосом, действует только в восприимчивых к хламидийной инфекции клетках. Так, при поглощении хламидий моноцитами часто происходит быстрое слияние с лизосомами и лизис возбудителя (Ojcius et al., 1997, 1998).

В последние годы были проведены исследования мембраны цитоплазматических включений, содержащих *C. trachomatis*, с применением современных цитологических методик. Было показано, что в мембране включения отсутствуют маркеры эндосом – рецептор трансферрина и рецептор катионнезависимой маннозо-6-фосфатазы (Heinzen et al., 1996; Scidmore et al., 1996; Taraska et al., 1996; van Ooij et al., 1997). В мембране хламидийных включений отсутствуют также маркеры лизосом – лизосомальные белки 1 и 2, катепсин D, и вакуольная Н<sup>+</sup>-АТФаза. Установлено, что маркеры жидкой фазы лизосом – декстран, меченый флуоресцеином изотиоцианатом (ФИТЦ), и люцифер желтый – не перемещаются из лизосом в хламидийное включение (Heinzen et al., 1996). Примечательно, что при хламидийной инфекции избирательно подавляется только процесс слияния лизосом с фагосомой, содержащей хламидии. Общая лизосомальная функция инфицированной клетки остается интактной (Eissenberg, Wyrick, 1981; Heinzen et al., 1996). Каким образом это происходит, было выяснено сравнительно недавно. Хламидии взаимодействуют с транспортной системой, доставляющей сфинголипиды из аппарата Гольджи в плазматическую мембрану. Транспорт происходит путем перемещения внутриклеточных пузырьков, защищенных от лизосом. Пересекая этот путь и вступая в функциональное взаимодействие с данной системой, хламидийное включение избегает подключения лизосом с последующим «перевариванием» поглощенного возбудителя (Hackstadt et al., 1995; Hackstadt et al., 1997). Эта гипотеза возникла на основании изучения перемещения сфинголипидов в инфицированной хламидийной клетке. Флуоресцирующий аналог сфинголипида – С6-NBD-керамид, полное химическое название 6-(N-[(нитробензо-2-окси-1,3-диазол-4-ил)амино]капроил)сфингозин – был использован в качестве красителя и контрастирующего агента при люминесцентной и электронной микроскопии аппарата Гольджи в живых клетках.

С6-NBD-керамид метаболизируется до аналога сфингомиелина или гликозил керамида в медиальной части аппарата Гольджи. Затем было показано его перемещение и включение в состав цитоплазматической мембраны клетки (Lipsky, Pagano, 1985a, 1985b; Pagano et al., 1989; Rosenwald, Pagano, 1993). С6-NBD-керамид оказался удобным инструментом для изучения процессов взаимодействия внедрившихся хламидий с клеткой-хозяином на самых ранних

стадиях жизненного цикла *C. trachomatis*. Через 2 ч после поглощения хламидии способны встраивать сфингомиелины, синтезируемые клеткой, в собственные мембраны. Для этого необходимо слияние раннего включения с внутриклеточными пузырьками, содержащими фосфолипиды. Этот процесс требует экспрессии хламидийных генов *de novo* и синтеза хламидийных белков. Механизм доставки сфингомиелинов в хламидийное включение аналогичен таковому при транспорте их к наружной клеточной мембране (рис. 3.3). Попав внутрь хламидийного включения, эти фосфолипиды встраиваются в мембраны хламидий без затрат энергии – благодаря своим липофильным свойствам (van Meer et al., 1987; Koval, Pagano, 1991; Rosenwald, Pagano, 1993; Hackstadt et al., 1996). Примечательно, что транспорт сфингомиелинов во включение отличает хламидии от других внутриклеточных паразитов, поскольку *Coxiella burnetii*, например, не обладает таким свойством (Heinzen et al., 1996). Сфингомиелин, включенный в состав клеточных стенок хламидий, остается там до конца жизненного цикла. Количественные исследования с помощью микрофотометрии и тонкослойной хроматографии экстрагированных липидов показали, что при массивной инфекции хламидии утилизируют до 40-50% сфингомиелинов, синтезируемых клеткой.

Способность раннего включения (первые 2 часа) препятствовать слиянию с эндосомами и лизосомами биологически важна для выживания хламидий. В первые часы после поглощения клеткой-хозяином собственные белки хламидий еще не успевают синтезироваться, что не позволяет им изменять внутриклеточную среду в угоду собственной жизнедеятельности. Изучение Hackstadt и соавторами (1998) раннего включения с помощью иммуноэлектронной микроскопии показало отсутствие в нем маркеров слияния с ранними и поздними эндосомами и лизосомами – такими как рецепторы трансферрина, маннозо-6-фосфата и LAMP-1.

Хламидии инициируют синтез собственных белков вскоре после попадания в клетку (Plaunt, Hatch, 1988; Lundemose et al., 1990). В течение первых двух часов после интернализации ЭТ претерпевают изменения, при которых необходимы процессы транскрипции и трансляции. Это транспортировка включения в зону Гольджи клетки-хозяина и взаимодействие с так называемым путем эндоцитоза клетки. Если остановить синтез бактериальных белков хлорамфениколом сразу после инфицирования, то поглощенные ЭТ не аккумулируются в зоне Гольджи, а равномерно распределяются по цитоплазме. Способность ЭТ, покрытых иммуноглобулином G, внедряться в клетку путем Fc-опосредованного эндоцитоза и размножаться предполагает, что в развитии включения играют более важную роль именно белки хламидий, а не клетки-хозяина. Способ поглощения хламидий клеткой не влияет на формирование зрелого включения (Su et al., 1991; Scidmore et al., 1996a; Scidmore et al., 1996b). Это отличает хламидии от некоторых других внутриклеточных бактерий, в частности от *Toxoplasma gondii*, у которых свойства паразитофорной вакуоли определяются способом внедрения в клетку (Joiner et al., 1990).

Наиболее вероятный механизм влияния хламидий на движение включения и изменения его фузогенных свойств – это изменение структуры мембраны включения путем «вставки» в нее специфических хламидийных белков. Эти белки, называемые протеинами мембраны включения (Inc), вначале были обнаружены у *C. psittaci* (Rockey, Rosquist, 1994; Rockey et al., 1995; Bannantine et al., 1998), а затем и у *C. trachomatis* (Scidmore-Carlson et al., 1998). Для этих белков характерно наличие большого гидрофобного домена. Этот домен входит в состав нескольких предполагаемых белков хламидий, если исходить из полностью расшифрованной структуры генома некоторых представителей *Chlamydiales*.

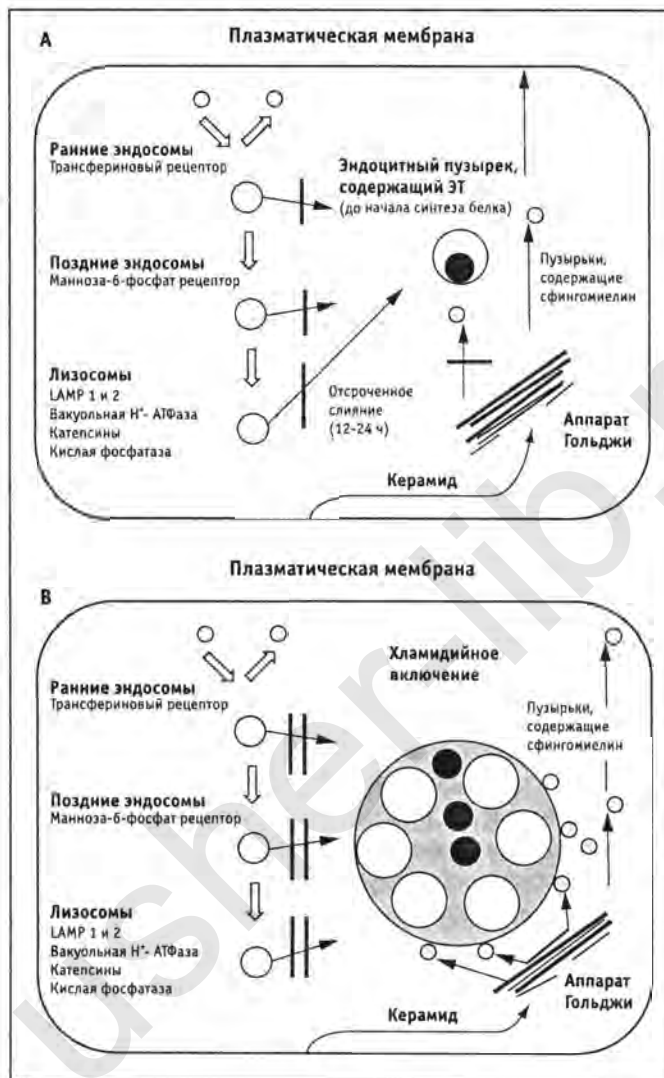


Рисунок 3.3. Модель взаимодействия клеточных везикул с ранним и зрелым хламидийным включением (Hackstadt, 1999).

А – раннее включение, содержащее ЭТ, до начала синтеза хламидийных полипептидов. Поглощенное ЭТ интернализируется в пузырьрек, который не взаимодействует с эндоцитным путем клетки и не сливается (по крайней мере, первые 12 ч) с лизосомами. Взаимодействие с пузырьками, доставляющими сфингомиелин или керамид, пока не началось. Если обработать ЭТ ингибиторами транскрипции и/или трансляции, то через 12-24 ч оно будет лизировано.

Б – зрелое включение, содержащее преимущественно РТ, после начала синтеза хламидийных полипептидов.

*C. trachomatis* активно трансформирует свойства включения. Оно становится зрелым включением. Маркеры ранних эндосом – трансферрин и трансферриновый рецептор, и поздних эндосом – катионнезависимый маннозо-6-фосфат рецептор, а также маркеры лизосом – кислая фосфатаза, катепсин D, лизосомальные гликопротеины и Н<sup>+</sup>-АТФаза – не обнаруживаются в хламидийном включении. Вместо эндосом и лизосом хламидийное включение сливается с группой сфингомиелинсодержащих пузырьков, которые доставляют фосфолипиды из аппарата Гольджи к плазматической мембране клетки-хозяина. Фосфолипиды попадают внутрь включения и встраиваются в клеточные стенки размножающихся хламидий.

Функция Ipc-полипептидов неизвестна, но поскольку они включаются в состав мембран клетки-хозяина, то можно предположить, что они играют важную роль во взаимодействии хламидий с клеткой.

Higashi (1955) с помощью электронной микроскопии первым определил, что поглощенные ЭТ хламидий к исходу второго часа после инфицирования клетки доставляются в перинуклеарную зону вблизи аппарата Гольджи. В 90-х годах это было подтверждено тщательно спланированными и детальными экспериментальными исследованиями (Majeed, Kihstrom, 1991; Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996). В случае *C. trachomatis* отдельные пузырьки, содержащие хламидии, сливаются в одно большое включение. Это было убедительно показано Ridderhof и Barnes (1989), которые последовательно заразили культуру клеток HeLa двумя серотипами *C. trachomatis* – E и F. Образовывалось одно включение, содержащее хламидии обоих серотипов. В случае *C. psittaci* и *C. pneumoniae* слияние включений не происходит, хотя они также группируются возле ядра.

Перемещение включений осуществляется за счет компонентов цитоскелета. Хламидии так модифицируют мембрану включения, что цитоскелет «распознает» эти включения не как чужеродные элементы, подлежащие лизису, а как собственные внутриклеточные везикулы, которые транспортируются в зону Гольджи. Данное взаимодействие хламидийных белков и цитоскелета отличается от взаимодействия между внеклеточными ЭТ и цитоскелетом перед поглощением хламидий клеткой (Hackstadt, 1999). Агрегированные ЭТ концентрируются возле центра организации микротубул в клетке. В этой же зоне концентрируются тирозин-фосфорилированные белки и белок микротубул-динеин. В процессы вовлечены как микрофиламенты, так и микротубулы (что было подтверждено иммунофлуоресцентной микроскопией, а также обработкой ингибиторами микрофиламентов – цитохалазином D и В, и ингибиторами функции микротубул – винбластином, винкристином, колхицином, нокодазолом) (Ridderhof, Barnes, 1989; McBride, Wilde, 1990; Majeed, Kihstrom, 1991; Schramm, Wyrick, 1995; Clausen et al., 1997). Данные ингибиторы подавляют перинуклеарную агрегацию ранних включений у *C. trachomatis*. У *C. pneumoniae*, по-видимому, имеет место другой механизм, поскольку ни динеин, ни фосфопротеины не участвуют в процессе агрегации.

Хотя зарождающееся хламидийное включение не сливается с ранними эндосомами (как до, так и после начала экспрессии хламидийных генов), тем не менее возле включения концентрируется множество различных внутриклеточных везикул. Это связано с тем, что включение находится в непосредственной близости к аппарату Гольджи – органелле, ответственной за «упаковку» и транспортировку везикул. Перераспределение утилизирующих эндосом, содержащих трансферрин и его рецептор, становится заметным через 2-4 ч после инфицирования и продолжается в течение всего жизненного цикла хламидий. Оно наиболее выражено при множественном инфицировании клетки несколькими ЭТ. Эндосомы находятся в близком контакте с включением, но не сливаются с ним, что видно при электронной микроскопии. Как показывает анализ кинетики комплекса трансферрин-рецептор, функциональная активность эндосом клетки при хламидийной инфекции не возрастает (Scidmore et al., 1996; van Ooij et al., 1997; Hackstadt et al., 1998).

В дополнение к эндосомам, аннексины III, IV и V, но не I и II, обнаруживаются близко от хламидийного включения к 3-му часу после инфицирования (Majeed et al., 1994). Аннексины – семейство белков, которые участвуют в регуляции транспорта через внутриклеточные и наружные мембраны клетки посредством кальцийзависимого связывания с фосфолипидами



(Creutz, 1992; Burgoyne, Clague, 1994). Пузырьки, содержащие маннозо-6-фосфатный рецептор, также располагаются вокруг включения, соприкасаясь с ним, но не сливаясь. Характерно, что лизосомы не претерпевают перераспределения и не контактируют с хламидийным включением (Hackstadt et al., 1998). Наиболее вероятное объяснение перераспределения эндосом в клетках, инфицированных большим количеством ЭТ хламидий, связано с реорганизацией цитоскелета. Белки клатрин и транс-Гольджи-специфический протеин AP1 ассоциируются с пузырьками, выходящими из аппарата Гольджи и находящимися возле включения. Однако эти белки не обнаружены в мембране включения, что свидетельствует об отсутствии слияния или тесного контакта пузырьков с включением (Scidmore et al., 1996).

Таким образом, особенностью *Chlamydiales* является способность избегать слияния включения с лизосомами посредством двух различных, дополняющих друг друга механизмов. Вначале особые свойства клеточной стенки ЭТ позволяют им «уходить» от так называемого эндоцитного пути с последующим лизисом. Затем, через несколько часов после инфицирования, продукты синтеза самих хламидий обуславливают слияние с везикулами клетки, содержащими сфингомиелин, который необходим для синтеза клеточных стенок и мембран размножающихся хламидий. Зрелое хламидийное включение располагается в зоне дистальнее аппарата Гольджи, приобретая свойства экзоцитного пузырька. При этом слияние с плазматической мембраной клетки-хозяина ингибируется и включение остается в клетке. Данная модель предполагает, что хламидии избегают лизиса, «заставляя» клетку распознавать включение как собственный секреторный пузырек, который не сливается с наружной мембраной и не удаляется из клетки. Механизм изменения реакций клетки хламидиями остается неизвестным. Модель взаимодействия хламидий с чувствительной клеткой в самых общих чертах показана на рис. 3.3.

Как уже было сказано, через 4–8 ч после заражения фагосомы, содержащие ЭТ, обычно перемещаются в зону Гольджи. В этот период определяется преобразование ЭТ в неинфекционные вегетативные формы – РТ через ПТ или «дисперсные» формы. Отмечается последовательное уменьшение плотности нуклеотида ЭТ, рассредоточение фибрилл ДНК по протопласту, снижение плотности цитоплазмы. Одновременно происходит увеличение размеров преобразующейся частицы и окружающей ее фагосомы. При множественном инфицировании клетки близлежащие фагосомы, содержащие сформировавшиеся РТ, нередко сливаются. РТ делятся «перетяжкой» по типу бинарного деления грамотрицательных бактерий (рис. 3.1). Время между двумя последовательными делениями варьирует у разных представителей *Chlamydiales*. У *Chlamydia trachomatis* оно составляет около 2 ч. Деление РТ начинается примерно через 10–12 ч после заражения и может продолжаться до 30–36 ч.

Было показано, что включения, содержащие *C. psittaci*, контактируют с митохондриями. Это происходит спустя 10–12 ч после инфицирования. Включения, содержащие *C. trachomatis* и *C. pneumoniae*, не проявляли таких свойств (Matsumoto, 1981; Peterson, de la Maza, 1988; Matsumoto et al., 1991). Причина тесной ассоциации хламидийных включений с митохондриями неизвестна. Peterson и de la Maza (1988) предположили, что поскольку хламидии являются «энергетическими паразитами», то они могут заполучить молекулы АТФ прямо из митохондрий клетки-хозяина. Каким образом АТФ могут проникнуть через мембрану включения, не ясно. До сих пор не удалось доказать ни прямого, ни опосредованного переноса АТФ из клетки в хламидии, хотя было показано усиление митохондриального и глицерофосфолипидного метаболизма в инфицированной клетке (Hatch, McClarty, 1998).



Фагосомы, содержащие РТ, ПТ и ЭТ, образуют цитоплазматические включения – «микрoколонию» возбудителя – которые выявляются при окраске препаратов флуоресцирующими антителами, начиная с 6-8-го часа после заражения клеток, а при окраске Романовско-го-Гимзы – с 12-16-го часа. При электронной микроскопии эти включения выглядят как компактные образования, содержащие плотно упакованные РТ. В дальнейшем, по мере накопления вегетативных форм, включение увеличивается в размере, и (в зависимости от особенностей штамма *Chlamydia trachomatis*) содержащиеся в нем РТ могут сохранять плотную упаковку либо распределяться более рыхло. Примерно через 24 ч после заражения РТ начинают преобразовываться в ЭТ нового поколения через ПТ. Этот процесс сопровождается конденсацией внутреннего содержимого РТ и последовательным уменьшением их размера. Через 48-60 ч после заражения цитоплазматические включения содержат преимущественно ЭТ, которые затем выходят из лизированной клетки, завершая тем самым цикл развития микроорганизма.

Важно подчеркнуть, что весь цикл развития рода *Chlamydia* протекает в одной вакуоли, ограниченной унитарной мембраной, отделившейся от плазмалеммы клетки. Представители рода *Chlamydophila* образуют много плотных включений. Некоторые штаммы *Chlamydophila pneumoniae* имеют элементарные тельца грушевидной формы (Grayston et al., 1989). Паразиты амёб (*Hartmannella vermiformis*, *Dictyostelium discoideum*), которые объединены в род *Neochlamydia*, семейства *Parachlamydiaceae*, включений не образуют и не окружены цитоплазматической мембраной (Horn et al. 2000). Их цикл развития происходит непосредственно в цитоплазме амёб. Ограничивающая мембрана, или «оболочка» включения, у *Chlamydia* претерпевает функциональные и структурные изменения под влиянием размножающегося микроорганизма. Она непосредственно контактирует с прилежащими митохондриями и цистернами эргастоплазмы, избирательно транспортирует во включение клеточные метаболиты, необходимые для воспроизводства паразита, выводит из включения токсические продукты его метаболизма, осуществляет защиту хламидий от лизосомных ферментов клетки-хозяина.

Процесс размножения хламидий в цитоплазматических включениях протекает несинхронно. При размножении микроорганизма во включении содержатся его формы на различных стадиях развития. В пуле освобождающихся из погибшей клетки хламидий, помимо ЭТ, содержатся ПТ и РТ. Средние сроки последовательных этапов цикла развития могут значительно варьировать у разных представителей *Chlamydiales* в зависимости от семейства, рода, вида, биовара и штамма. На продолжительность и эффективность размножения этих микроорганизмов оказывают влияние вирулентные особенности штаммов, степень их адаптации к клеткам хозяина, функциональное состояние культуры клеток, на которых производилось исследование, качество и состав используемых питательных сред и другие факторы. Считается, что продолжительность цикла развития *Chlamydiaceae* – 36-72 ч. Цикл развития *Simkaniaceae* (*Simkania negevensis*) – значительно более длительный и может составлять до 14 суток (Kahane et al., 1999).

Шаткин с соавторами (1981) при электронной и световой микроскопии выявили штаммовые отличия по формам включений и плотности их заполнения морфологическими структурами микроорганизма. По этим показателям было выделено два типа включений. Включения I типа характеризуются правильной округлой формой, рыхлым, неплотным расположением внутреннего содержимого и наличием после 30 ч инфекции углеводсодержащего компонента – гликогена. Включения II типа имеют в той же культуре клеток (L-929) неправильные

очертания, плотно заполнены морфологическими структурами микроорганизма и не содержат гликогена. Обнаружение двух типов включений, образуемых урогенитальными штаммами хламидий, выделенными от людей, указывало на биологическую неоднородность возбудителя урогенитальных хламидиозов и в дальнейшем было подтверждено эпидемиологическими исследованиями.

Цикл развития хламидий, показанный на рис. 3.2, обычно протекает при благоприятных для паразита условиях в нормально функционирующей чувствительной клетке хозяина (т.н. продуктивный цикл). Однако морфо-функциональный анализ взаимоотношений хламидий с клеткой хозяина указывает, что наряду с продуктивным циклом развития, одновременно могут реализовываться и другие пути их взаимодействия. По-видимому, в патологии человека и животных чаще встречается персистенция – продолжительное пребывание хламидий в клетке хозяина без выраженного нарушения функции. Персистенция имеет важное патогенетическое и эпидемиологическое значение (Брагина и соавт. 1998).

Для реализации фаз жизненного цикла хламидий необходим ряд последовательных биохимических превращений, природа которых, несмотря на интенсивное изучение в последние годы, остается в значительной степени неясной. Структурные и биохимические различия между ЭТ и РТ обусловлены особым механизмом регуляции генов во время цикла развития. Накопленные данные получили обобщение в ряде исчерпывающих обзоров, посвященных данной проблеме (Moulder, 1991; Stephens, 1993; McClarty, 1994; Raulston, 1995; Hatch, 1999). Схематично жизненный цикл хламидий состоит из превращения ЭТ в РТ, бинарного деления РТ, превращения РТ в ЭТ. Деление РТ по сути не отличается от размножения большинства бактерий, за исключением того, что происходит внутри клетки. Уникальным является начало и конец цикла, связанные с формированием ЭТ и их внедрением в клетку-хозяина. У большинства представителей *Chlamydiales* ЭТ приспособлены к внеклеточному существованию и могут достаточно длительно сохраняться в межклеточной среде внутри организма и в окружающей среде (*Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pecorum*, *Parachlamydia sp.*, *Neochlamydia sp.*). Уменьшение размера, формирование осмотически стабильной и почти непроницаемой клеточной стенки позволяют пережить неблагоприятные физические и химические воздействия. Происходит практически полное «выключение» метаболизма, что предотвращает размножение в неблагоприятных условиях. При этом ДНК конденсируется в гиперпикнотический нуклеоид, уменьшаясь в объеме примерно в 30 раз.

Биохимия жизненного цикла хламидий гораздо менее изучена, чем у других бактерий. Это связано с объективными методическими трудностями. Hatch (1999) выделяет следующие три проблемы, осложняющие изучение хламидий: трудность разделения биохимических процессов паразита и хозяина; асинхронность жизненного цикла хламидий и отсутствие надежных стандартов измерений.

Распознавание жизненных проявлений паразита и хозяина является проблемой на всех этапах жизненного цикла. Наиболее сложно выявить жизнедеятельность хламидий на самых ранних этапах инфицирования, когда постепенное «пробуждение» ЭТ происходит на фоне сложной и многообразной метаболической активности клетки-хозяина. Выявление стадий специфических белков представляет особые трудности. В свое время была разработана методика радиоактивной метки этих белков, позволявшая с помощью радиографии выявлять соответствующие полосы после электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Однако количество белка при этом слишком мало для определения

аминокислотной последовательности или для иммунизации животных с целью приготовления антисыворотки (Plaunt, Hatch, 1988). Появление технологии ПЦР позволило выявлять уникальные хламидийные нуклеотидные последовательности внутри клетки, однако это в основном качественные методы, а применение количественной ПЦР требует точных стандартов.

Асинхрония стадий развития отдельных телец является проблемой для выявления стадий специфических белков как на ранних, так и на поздних стадиях цикла. Если клетку инфицирует несколько телец, их внедрение происходит не одновременно. Обычно пораженная клетка содержит одновременно как элементарные, так и промежуточные, и ретикулярные тельца (рис. 3.1). Появление отдельных белков свойственно определенным стадиям цикла, однако сложно определить, когда выключаются и включаются те или иные гены. Например, МOMP – главный белок наружной мембраны – определяется в основном на поздних стадиях цикла, когда клетка содержит преимущественно ЭТ, однако это еще не означает, что РТ, подвергаясь трансформации, действительно синтезирует МOMP.

Важной проблемой при изучении жизненного цикла является отсутствие стандартов для измерения. Можно исследовать равное число клеток в определенное время после заражения и определять последовательное появление протеинов или генных транскриптов. Другой способ – определение суммарного хламидийного белка или РНК в определенные моменты времени, однако он требует очистки от компонентов клетки-хозяина, что особенно сложно на ранних этапах цикла, когда количество хламидий в клетке мало. Можно определять МOMP с помощью диск-электрофореза или иммуноблоттинга и 16S-РНК с помощью количественного ПЦР. Однако их содержание в хламидийной клетке меняется, поэтому стандарт получается не совсем строгим. Предпочтительнее определять геномную или плазмидную ДНК, количество копий которой различается на протяжении цикла не более чем в два раза.

### 3.2.3. Влияние на клетку-хозяина

Многие факультативные внутриклеточные паразиты при попадании в клетки запускают процессы некроза и апоптоза (Zychlinsky, Sansonetti, 1997). Некроз вызван внеклеточными факторами, а апоптоз – генетически запрограммированная смерть клетки, регулируемая внутриклеточными факторами. Апоптоз может быть как физиологическим проявлением, когда необходима смерть отдельных клеток в интересах всего организма (эмбриогенез, дифференцировка тканей), так и проявлением различных заболеваний. Апоптоз характеризуется сжатием клетки, фрагментацией ДНК и формированием телец апоптоза, которые поглощаются фагоцитирующими клетками. Во время хламидийной инфекции активируется каскад событий, ведущих к двум альтернативным последствиям – воспалению с высвобождением цитокинов и повреждением клеток, вплоть до некроза или апоптоза. При инфекции клеток McCoy *C. trachomatis*, серовар E или L2 апоптоз в начале жизненного цикла хламидий тормозится (0-24 ч), а затем наблюдается выраженная индукция апоптоза в инфицированной культуре клеток. Степень апоптоза зависит от количества инфекционного материала. Апоптоз в клетках, инфицированных хламидиями, зависит от синтеза белка хламидий, поскольку он подавляется хлорамфениколом. Апоптоз, вызванный стауроспорином, в неинфицированных клетках McCoy не подавляется хлорамфениколом (Schoier et al., 2000).

Для хламидий биологически очень важно, чтобы клетка оставалась жизнеспособной и функционально активной до завершения жизненного цикла паразита. Поэтому имеются данные, что хламидии тормозят апоптоз клеток на ранних стадиях жизненного цикла, что указывает на взаимодействие с цитозолем и прерывание сигнального пути клетки, ведущего к апоптозу (Fan et al., 1998). Хламидийная инфекция не прерывает нормального функционирования клетки-хозяина, если размножение хламидий в клетке происходит умеренно. Еще в ранних исследованиях метаболизма инфицированных клеток было отмечено, что синтез ДНК практически не нарушается и клетки проходят свой обычный цикл жизни (Bose, Liebhaber, 1979). Синтез белка клетки-хозяина изменяется в связи с хламидийной инфекцией весьма незначительно, тогда как дыхание и гликолиз усиливаются. Хламидиям не всегда требуются для размножения продукты клеточного синтеза, поскольку они продолжают размножаться в клетках, лишенных ядра, и в тех, где синтез белка остановлен циклогексимидом или эметином (Gill, Stewart, 1970; Moulder, 1970; Perara et al., 1990; Ojcius et al., 1998). Однако эукариотные клетки, инфицированные хламидиями, меняют свое функциональное состояние. Так, клетки HeLa секретируют интерлейкин-6 и -8 и становятся защищенными от апоптоза. По-видимому, хламидии влияют на клетку на уровне матричной РНК. Нев и соавторы (2000) с помощью ДНК-зонда установили различия в активности 1176 регуляторных генов клеток HeLa до и после инфицирования *C. trachomatis* (D/UW-3/Cx) и *C. pneumoniae* (CWL029). Среди этих генов есть и те, которые регулируют апоптоз.

Несмотря на близкое расположение хламидийного включения к аппарату Гольджи и захват им сфингомиелинов, гликопротеины клетки-хозяина не обнаружены в мембране включения. Хламидии, по-видимому, не оказывают выраженного влияния на движение гликопротеинов в клетке (Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996). Механизм транспорта гликопротеинов и сфинголипидов из аппарата Гольджи к плазматической мембране аналогичен. В неполяризованных клетках он осуществляется в общем потоке транспортируемых продуктов метаболизма клетки (Pfeffer, Rothman, 1987; Schwarzmann, Sandhoff, 1990). Вполне логично предположить, что часть гликопротеинов на экзоцитном пути от аппарата Гольджи к плазматической мембране перенаправляется и попадает в хламидийное включение, поскольку они необходимы для строительства мембран возбудителя. Тем не менее доказать это пока не удалось. Scidmore и соавторы (1996) анализировали посттрансляционный процессинг и транспорт в клетках, инфицированных *C. trachomatis*, трех мембранных белков: гликопротеина G-вируса везикулярного стоматита, трансферринового рецептора, антигена комплекса гистосовместимости человека класса I. Ни один из них не попадал в хламидийное включение. Возможно, небольшие количества гликопротеинов содержатся в сфингомиелиновых пузырьках, которые захватываются хламидийным включением.

В отличие от интрацитоплазматических бактериальных паразитов, которые имеют прямой доступ к богатой питательными веществами цитоплазме, хламидии должны обладать способностью активно транспортировать различные вещества во включение (Moulder, 1985; Falkow et al., 1992). Поскольку хламидии окружены мембраной в течение всего жизненного цикла, то все метаболиты, необходимые для их размножения и роста, должны преодолеть мембранный барьер. В отличие от паразитофорной вакуоли *T. gondii*, которая позволяет пассивное прохождение молекул размером до 1900 Da (Дальтон), хламидийное включение не пропускает молекулы размером больше чем 520 Da (Heinzen, Hackstadt, 1997). *Chlamydiales* получают от



клетки-хозяина аминокислоты (Hatch, 1975), нуклеотиды (Hatch, 1975; Tipples, McClarty, 1993; McClarty, 1994), липиды (Hackstadt et al., 1995; Wylie et al., 1997). Но механизм доставки этих предшественников метаболизма хламидий через мембрану включения не установлен. При этом могут иметь место следующие пути:

- слияние включения с пузырьками эндосомального или лизосомального пути, нагруженными питательными веществами;
- существование открытых каналов через паразитофорную вакуоль к цитоплазме, позволяющих свободный обмен небольшими молекулами, наличие которых было показано у включений токсоплазмы и малярийного плазмодия (Desai et al., 1993; Schwab et al., 1994);
- наличие транспортных белков в мембране включения, способных специфически связывать и доставлять в просвет включения метаболиты из цитоплазмы клетки-хозяина.

Какой из перечисленных механизмов преобладает при хламидийной инфекции, пока не установлено. Метаболически активные РТ поддерживают тесный контакт с внутренней поверхностью мембраны включения (Moulder, 1991). В месте контакта имеются пикообразные отростки неизвестного состава, примерно 6 нм в диаметре и 45–90 нм в длину (Nichols et al., 1985; Matsumoto, 1988). Они пронизывают мембрану включения и оканчиваются в цитоплазме клетки-хозяина (рис. 3.4). Эти структуры могут служить в качестве каналов для обмена продуктами метаболизма и их предшественниками между клеткой-хозяином и хламидийной клеткой. Если из-за накопления хламидий во включении РТ теряют контакт с мембраной включения, то они лишаются доступа питательных веществ, что служит сигналом к свертыванию метаболизма и превращению их в ЭТ (Hackstadt et al., 1997). Это согласуется с наблюдаемой асинхронией развития отдельных хламидий во включении.

Очень мало известно о физических свойствах и химическом составе среды в хламидийном включении. Кислотность внутри включения, вероятно, близка к нейтральной, поскольку РТ *in vitro* демонстрируют наибольшую метаболическую активность при pH от 7,0 до 7,5 (Hatch et al., 1985). Прямые измерения pH внутри включения были сделаны Schramm и соавторами (1996)

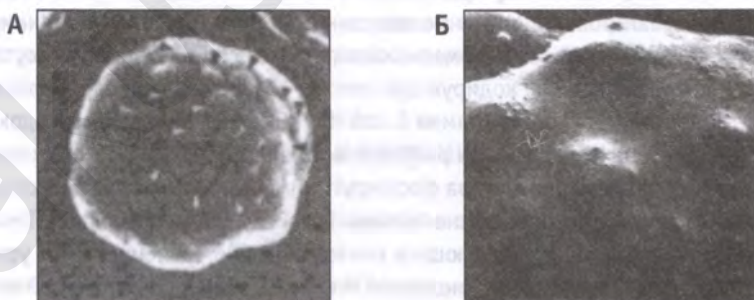


Рисунок 3.4.

- А. Элементарное тельце *Chlamydia trachomatis*. Куполообразные полусферические выпячивания на поверхности (стрелки). Поверхность выпячиваний неоднородна, через них проходят пикообразные отростки. Сканирующая электронная микроскопия. Отрезок = 100 нм. (Matsumoto, 1982).
- Б. Наружная поверхность цитоплазматического включения клетки культуры HeLa-229, содержащего *Chlamydomphila pneumoniae*. Хламидии контактируют с мембраной включения. Пикообразные отростки пронизывают мембрану и выходят в цитоплазму клетки-хозяина (стрелка). Электронная микроскопия после заморозки и откалывания (freeze replica image). Отрезок = 500 нм. (Miyashita et al., 1993).



с помощью pH-сенситивных флуоресцирующих зондов. Авторы заключили, что pH превышает 6,0. Ионный состав содержания внутри хламидийного включения не установлен. Известно, что большинство органелл эукариотной клетки имеют одну или несколько ионных транспортных систем, регулирующих ионный состав внутри органеллы (Gennis, 1989). Определение наличия мембранного потенциала и его направленности могли бы пролить свет на механизмы доставки во включение питательных веществ и поддержания его формы.

Несмотря на связь трансферрина и его рецептора с хламидийным включением, неизвестно, доставляется ли железо из клетки во включение. Хелат железа – дефероксамина мезилат (де-сферал) ограничивает размножение хламидий. Это ограничение может быть устранено добавлением в культуру клеток железа в комплексе с трансферрином (Scidmore, Hackstadt, 1995; Raulston, 1997). Добавление в культуру клеток радиоактивного  $^{55}\text{Fe}$ -трансферрина и последующая очистка нового поколения ЭТ доказало включение данного изотопа железа в ЭТ хламидий. *C. trachomatis*, как и многие другие патогенные бактерии, отвечают на недостаток железа синтезом уникального набора белков. У хламидий идентифицировано, по крайней мере, 19 таких потенциальных белков. Чрезвычайно важным для понимания патогенеза хламидийной инфекции является факт, что синтез белка теплового шока Hsp60 индуцируется недостатком железа. Синтез ряда белков *C. trachomatis* изменяется в зависимости от уровня железа. Синтез белков при недостатке железа контролируется на уровне транскрипции регуляторами, сходными с белком, регулирующим захват железа (ferric uptake regulator – FUR), известным у *Escherichia coli*. Wyllie, Raulston (2000), проанализировав генетическую последовательность *C. trachomatis*, серовар D выявили семь открытых рамок считывания, которые кодируют белки, гомологичные FUR-белкам других бактерий. Была использована стандартная рекомбинантная технология экспрессии в векторной системе *E. coli*, штамм LMG194 (для накопления и очистки каждого из 7 FUR-подобных хламидийных белков) и иммуноблоттинга с антисывороткой против FUR. Функциональная активность FUR-белков *C. trachomatis* изучалась после трансформации рекомбинантной плазмиды в мутантный штамм *E. coli* H1780, неспособный синтезировать собственный FUR-белок. Для такого штамма характерна повышенная активность  $\beta$ -галактозидазы, которую можно оценить спектрофотометрически. Из 7 потенциальных хламидийных FUR-белков один четко реагировал с FUR-антисывороткой. Это был богатый остатками гистидина белок, массой 19 kD. Он формировал димеры, характерные для FUR-белков в отсутствие металлохелатных реагентов. Плазида, кодирующая этот 19 kD-протеин, способна была восстанавливать FUR-активность у мутантного штамма *E. coli* H1780. Таким образом, было доказано наличие у хламидий железозахватывающего регуляторного белка, аналогичного таковому у других бактерий, который в присутствии железа формирует димеры и связывается со специфической последовательностью в промоторной зоне генов железорегулирующих белков. Точная характеристика FUR-белка хламидий, регулирующего синтез белков в зависимости от уровня железа в окружающей среде, определение промоторной последовательности, с которой он связывается, поможет определить роль железорегулирующих белков в патогенезе хламидийной инфекции и наметить новые пути патогенетической терапии.

Большинство представителей *Chlamydiales* завершают свой жизненный цикл в течение 36–48 часов. Род *Simkania* имеет медленный цикл – до 14 суток, а некоторые штаммы *Chlamydia psittaci* и *Chlamydia trachomatis*, биовар LGV имеют более короткий цикл внутриклеточного развития. В последнем случае цикл завершается лизисом клетки-хозяина. Хламидии должны иметь особые белки-цитоллизины, способные вызвать лизис клетки-хозяина в конце жизненного

цикла. Для их выявления Lamre и соавторы (2000) подвергли скринингу рекомбинантную плазмидную «библиотеку» ДНК *C. trachomatis*, серовар L2 в негемолитическом штамме *E. coli*. Было идентифицировано два клона *E. coli*, которые приобрели способность гемолизировать эритроциты человека. Геном этих клонов содержал 6 вставок хламидийной ДНК, примерно 1000 пар нуклеотидов. Определение их последовательности выявило одну большую открытую рамку считывания, кодирующую ген *ctc* (*C. trachomatis* цитолизин). Рекомбинантный цитолизин *ctc* был очищен и проявлял гемолитическую активность *in vitro*. Ctc-протеин, массой примерно 160 kD, локализуется в наружной мембране хламидий и реагирует в иммуноблоттинге с сывороткой больных хламидиозом. Были приготовлены поликлональные антитела (ПАТ) к этому белку, и в реакции иммунофлуоресценции они реагировали с включениями *C. trachomatis*, серовар L2 в культуре мышинных фибробластов McCoу. При анализе последовательности гена *ctc* было обнаружено 92% сходства с геном *ppmD* *C. trachomatis*, серовар D и 32% – с *omp21*-геном *C. pneumoniae*. Экспрессия гена *ctc* у *C. trachomatis*, серовар L2 начинается в самом конце жизненного цикла, через 36–48 ч после инфицирования, что совпадает с началом лизиса клетки-хозяина.

Однако чаще высвобождение нового поколения хламидий из клетки происходит без ее гибели. Включение сливается с плазматической мембраной, и происходит высвобождение его содержимого в межклеточную среду. Функционально и топологически высвобождение хламидий из клетки напоминает движение экзоцитного пузырька, с тем отличием, что процесс транспортировки и слияния с наружной мембраной откладывается до завершения цикла развития хламидий (Todd, Caldwell, 1985; Hackstadt et al., 1997).

Было показано, что хламидии могут активировать факторы транскрипции клетки-хозяина, изменяя тем самым дифференцировку клеток. Gensay с соавторами (2000) изучили эффект от инфекций *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* на эпителиальных клетках человека (культура HerG-2 и три линии легочного эпителия) в плане активации факторов транскрипции NFkB, NF-1L6 и AP-1, а также регуляции глюкокортикоидного рецептора (GR). Эти факторы контролируют активность генов, кодирующих факторы воспаления, в частности интерлейкина-6. Хламидийная инфекция вызывала быструю индукцию NFkB, NF-1L6 и AP-1 в первый час после инфицирования и GR – через три часа после инфицирования. Активация GR компенсирует действие предыдущих факторов транскрипции, подавляя воспаление и иммунный ответ макроорганизма.

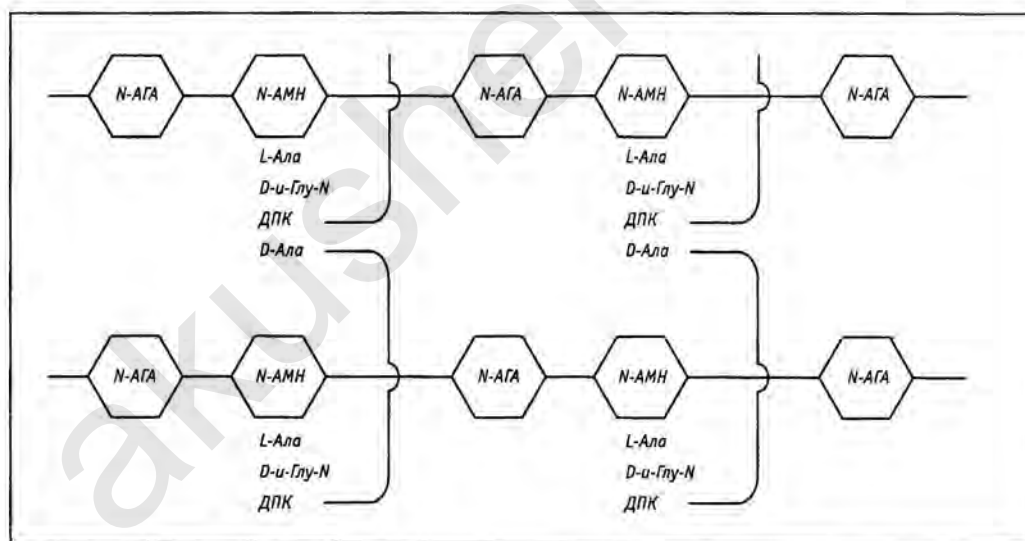
### 3.3 СТРУКТУРА И БИОХИМИЯ ХЛАМИДИЙ

#### 3.3.1. Клеточная стенка

Внутреннее осмотическое давление в ЭТ хламидий может составлять до 20 атмосфер, что является результатом концентрации растворов при дифференциации РТ в ЭТ. В этих условиях клеточная стенка предотвращает разрыв бактериальной клетки. Кроме осмотической защиты, клеточная стенка играет существенную роль в процессе деления клетки и запускает многие процессы биосинтеза. В различных слоях клеточной стенки локализуются основные антигенные детерминанты клеточной поверхности, а также молекулы, выполняющие роль рецепторов и являющиеся сигнальными для рецепторов клеток эукариотов. Липополисахариды клеточной стенки обладают эндотоксической активностью.

### Пептидогликан

Прочность клеточной стенки большинства бактерий обусловлена наличием пептидогликана. Пептидогликан является сложным полимером, который состоит из трех компонентов: «костова», состоящего из чередующихся молекул N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмураминовой кислоты; тетрапептидных боковых цепочек, прикрепляющихся к молекулам N-ацетилмураминовой кислоты, и пептидных поперечных мостиков. Наличие перекрестных связей между всеми пептидогликановыми цепочками означает, что пептидогликановый слой представляет собой одну гигантскую молекулу (рис. 3.5). Пептидогликан содержится в периплазме грамотрицательных бактерий, к которым относятся и *Chlamydiales*. Дискуссия о том, содержат ли хламидии пептидогликан, идет уже много лет (Fox et al., 1990; Moulder, 1993). С одной стороны, давно известно, что пенициллин и D-циклосерин, которые подавляют синтез пептидогликана, отрицательно влияют на деление РТ хламидий (Weiss, 1950; Moulder et al., 1963; Tamura, Manire, 1968; Matsumoto, Manire, 1970). Все гены, необходимые для синтеза пептидогликана, присутствуют в геноме *C. trachomatis*, что предполагает способность хламидий образовывать саккулу – морфологическую единицу клеточной стенки, содержащую пептидогликан (Hatch, 1999). Однако, с другой стороны, многие ранние исследователи не смогли биохимически определить наличие у хламидий N-ацетилмураминовой кислоты – углеводного остатка, специфичного для пептидогликана (Jenkin, 1960; Perkins, Allison, 1963; Garrett et al., 1974). Позже Harbour с соавторами (1982) и Fox с соавторами (1990;) также не удалось обнаружить мураминовую кислоту, несмотря на применение таких чувствительных методов,



**Рисунок 3.5.** Схематическое изображение пептидогликановой частицы грамотрицательных бактерий. Остов полимера состоит из чередующихся субъединиц N-ацетилглюкозамина (N-АГА) и N-ацетилмурамовой кислоты (N-АМК), соединенных посредством связей (3-1,4). Остатки мурамовой кислоты присоединены к коротким боковым пептидам. Мостики, состоящие из пептидных цепочек, соединяют карбоксильные группы терминального остатка D-аланина одной цепочки с аминогруппами диаминопимеловой кислоты (ДПК) следующей цепочки. Природа поперечных мостиков варьирует у различных видов бактерий.

как газовая хроматографическая масс-спектрометрия. Только Su с соавторами (1985) удалось обнаружить следовые количества N-ацетилмураминовой кислоты с помощью жидкостной хроматографической масс-спектрометрии. Hatch (1999) полагает, что пептидогликан все-таки присутствует у хламидий, но в небольших «субструктурных» количествах, а потому не играет такой существенной роли в поддержании осмотической целостности ЭТ, как у других граммотрицательных бактерий. Предполагается, что у *Chlamydiales* эту функцию выполняет массивная пространственная решетка из дисульфидных мостиков, которая связывает наружную мембрану и периплазматические белки. Отсутствие такой связи у РТ делает их осмотически нестойкими (Hatch et al., 1981; Newhall, Jones, 1983; Hatch et al., 1984; Hackstadt et al., 1985; Newhall, 1987). Взаимоотношения между пептидогликаном и связанными дисульфидными мостиками белками в ЭТ хламидий, а также роль пептидогликана в делении РТ хламидий остаются неясными и являются важным направлением исследований.

### **Белки, синтезируемые на ранней стадии жизненного цикла**

Ввиду очевидной морфологической разницы между ЭТ и РТ хламидий, логично предположить, что они также значительно различаются и по белковому составу. Однако электрофорез в полиакриламидном геле не выявил существенной разницы между белками ЭТ и РТ. Тем не менее отличия имеются и касаются следующих белков: OmpA и OmpB – богатые цистеином белки, синтез которых приходится на вторую половину цикла; полиморфные белки клеточной стенки, собирательно обозначаемые как POMP (Omp90A, Omp91A, Omp90B, Omp91B); два гистоноподобных протеина Hc1 и Hc2, входящих в состав нуклеоида (Hatch, 1999).

В 1988 году Plaunt и Hatch первыми провели исследование синтеза белка у хламидий сразу после инфицирования клетки. Была использована меченная аминокислота [35S] метионин с радиоактивным изотопом серы, которую добавили в культуру клеток. До заражения культуры хламидий не содержали радиоактивной метки. Включение меченного метионина в состав различных белков было отмечено в течение первого часа после инокуляции. Методика изоляции внутриклеточных хламидий и их инкубация в среде, содержащей большое количество [35S] метионина, АТФ и АТФ-регенерирующей системы, позволила зафиксировать синтез белка в ЭТ уже через 15 минут после внедрения в клетку. Белок молекулярной массой 35 kDa образовывался в первый час после инфекции, затем его синтез прекращался – к началу деления РТ. Функция этого белка не была изучена. Количество белка было слишком мало, чтобы авторы смогли определить аминокислотную последовательность, начиная с N-конца, или получить антитела к нему. Lundemose и соавторы (1990) метили хламидийные протеины в различные промежутки времени после инфицирования и выявили, кроме MOMP, еще семь белков, которые синтезировались хламидийной клеткой в фазе превращения ЭТ в РТ (0-8 ч после инфицирования). Один из этих белков идентифицирован как S1-рибосомальный протеин, два других – стресс-белки DnaK и GroEL. Природа остальных белков остается неизвестной. По-видимому, основной функцией этих, так называемых ранних белков, является регуляция жизненного цикла хламидий.

Возможно, истинные регуляторные белки ранней фазы жизненного цикла присутствуют в хламидийной клетке в таких малых количествах, что прямое определение их с помощью электрофореза или ауторадиографии не представляется возможным. Wichlan и Hatch (1993) применили другой подход к изучению ранних белков – попытались определить транскрипцию их возможных генов. В интервале от 1 до 24 ч после заражения культуры *C. psittaci*,



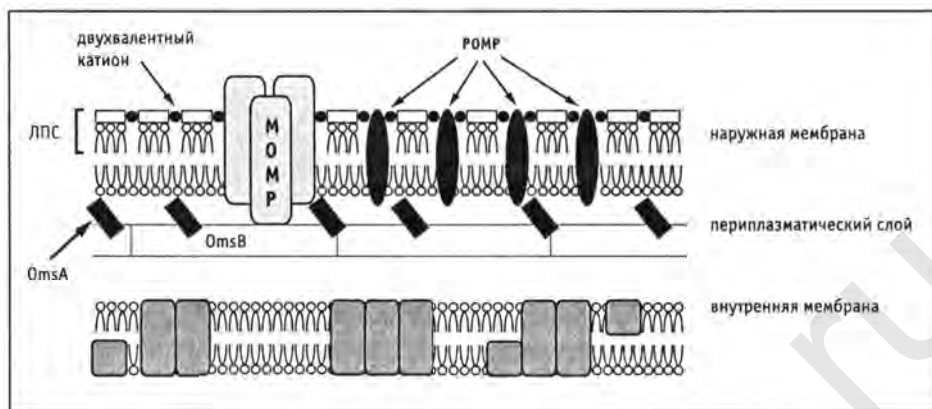
штамм 6BC, они периодически выделяли хламидийные тельца и «обрабатывали» их трифосфатами, мечеными радиоактивным фосфором-32 – [ $\alpha$ - $P^{32}$ ]ГТФ, АТФ, ЦТФ и УТФ. Были идентифицированы гены, которые наиболее сильно экспрессировались в первые часы после инфицирования. Предполагалось, что появление РНК, содержащей много меченых нуклеотидных оснований, отражало более высокий уровень транскрипции соответствующих генов. Эти гены были клонированы и охарактеризованы. Один из таких генов, обозначенный как *EUO*, экспрессировался особенно интенсивно по отношению к «базовому» уровню транскрипции генов *МОМР* и  $\sigma^{66}$ -генов. Ген *EUO* кодирует относительно небольшой ДНК-связывающий белок, который играет роль в регуляции генов (Zhang et al., 1998). Роль гена *EUO* не ограничивается регуляцией процесса превращения ЭТ в РТ, поскольку его экспрессия, особенно выраженная в начале цикла, сохраняется на протяжении всей фазы размножения и роста хламидий. Zhang и Hatch (1998) определили участки хламидийной ДНК, с которыми *EUO* связывается *in vitro*. Это оказались связывающие последовательности, содержащие много АТ-сочетаний (аденин-тимин) и локализованные в области кодирования белков. Неизвестно, имеют ли отношение эти последовательности к функции *EUO*, когда хламидии попадают в клетку-хозяина.

### Белки, синтезируемые на поздней стадии жизненного цикла

В 1984–86 годах Hatch с соавторами идентифицировали белки, которые содержались только в ЭТ, но отсутствовали у делящихся РТ. Это были два богатых цистеином белка, которые находились в клеточной стенке ЭТ в больших количествах (Newhall, 1987). Эти белки кодируются одним и тем же бисистронным опероном (Lambden et al., 1990; Alien et al., 1990; Fahr et al., 1995; Watson et al., 1995). В работе Everett и Hatch (1991), которые работали с *C. psittaci*, эти белки получили название *EnvA*, *EnvB*. У *C. trachomatis* они были названы *Omp3* и *Omp2* (Alien, Stephens, 1989; Alien et al., 1990). Позднее – были переименованы в *OmpA* и *OmpB*, поскольку они функционально связаны с наружным мембранным комплексом и не растворялись в слабом анионном детергенте саркозиле (натрия лаурил саркозинат). Эти белки парные – т.е. состоят из двух частей – большей и меньшей. *OmpA* чрезвычайно богат цистеином (14 остатков цистеина из 68 аминокислотных остатков у зрелой формы *OmpA Chlamydomypha psittaci*, штамм 6BC). Он является липопротеином со структурой, сходной с муреиновыми липопротеинами, которые обнаруживаются у грамотрицательных бактерий (Everett et al., 1994). *OmpB* после транскрипции превращается в два протеина массой приблизительно 60 kDa. Зрелая форма большего протеина у *C. psittaci*, 6BC, содержит 37 остатков цистеина из общего количества 517 аминокислот (Everett, Hatch, 1991). У *C. trachomatis*, серовар L2, N-концы сформировавшейся молекулы *OmpB* расположены на 19 аминокислотных остатков вниз (downstream) от сайта для сигнальной пептидазы I. У *C. psittaci*, 6BC – на два остатка вниз (Alien, Stephens, 1989; Everett, Hatch, 1991). Стереохимически две части двойного белка *OmpB* идентичны, это предполагает, что они функционируют в паре. Тем не менее у *C. trachomatis*, серовар B, биовар *Trachoma* обнаружен только один зрелый *OmpB*-белок (Newhall, Basinski, 1986).

Локализация *OmpB*-белков в клеточной стенке точно не установлена (Hatch, 1996). Вначале предполагалось, что они являются интегральной частью наружной мембраны, поскольку не растворяются в саркозиле (Hatch et al., 1994). Позже Everett и Hatch (1995) показали, что *OmpB*-белки не находятся в наружной мембране. В отличие от *OmpA* и *МОМР*, белок *OmpB* не связывался со специфическим для наружной мембраны липофильным зондом, меченым радиоактивным йодом-125 – [125I]ТЙД (3'-(трифлуорометил)-3-(m-[125I]йодофенил) диазирин).





**Рисунок 3.6.** Схема строения клеточной стенки элементарного тельца хламидий (формы молекул гипотетические, некоторые известные белки не показаны). Периплазматический слой прочно связан с внутренним слоем наружной мембраны посредством белков OmsA и OmsB, которые N-концами присоединены к интегральным белкам наружной мембраны (MOMP и POMP) и к внутреннему слою липополисахаридов (ЛПС) (Everett, Hatch, 1995).

Нерастворимость в саркозиле объясняется взаимной связью молекул OmpB между собой, а не локализацией их в наружной мембране.

Была предложена модель (схема) строения клеточной стенки ЭТ хламидий (рис. 3.6). Периплазматический слой прочно связан с внутренним слоем наружной мембраны посредством белка OmsB, который N-концами присоединен к интегральным белкам наружной мембраны (MOMP и POMP) и к внутреннему слою липополисахаридов (ЛПС) наружной мембраны. В результате формируется надмолекулярная структура в виде «сетки», которая обеспечивает прочность клеточной стенки хламидий. Данная гипотетическая модель согласуется с данными Matsumoto и Manire (1970), которые впервые, используя специальные методики, отделили наружную мембрану ЭТ *Chlamydomypha psittaci* от клеточной стенки и изучили ее строение в сканирующем электронном микроскопе. Внутренняя поверхность наружной мембраны имела выпячивания в виде гексагональных структур, которые, по-видимому, и являются белками OmsA и OmsB.

Исследования Miyashita и соавторов (1993), проведенные на *Chlamydomypha pneumonia*, подтвердили это предположение (рис. 3.7). Everett и Hatch (1995) предположили, что белок OmsA, который связан с внутренним листком наружной мембраны своей липидной частью, выпячивается в периплазматическое пространство своей гидрофильной частью, где он взаимодействует с другими протеинами, включая двойной белок OmsB.

Некоторые свойства OmsB указывают на его роль в качестве адгезина. Он входит в состав клеточной стенки ЭТ хламидий, которая, будучи отделенной от хламидийной клетки, может самостоятельно прикрепляться, поглощаться и предотвращать образование фаголизосомы в чувствительной клетке (Eissenberg, Wyrick, 1981; Levy, Moulder, 1982). Ting и соавторы (1995) показали, что OmsB частично экспрессируется на поверхности *Chlamydomypha psittaci* GPIC. Они также предположили, что OmsB является адгезином для хламидий, поскольку этот белок, экстрагированный в саркозиле, прикрепляется к фиксированным в глютаральдегиде клеткам

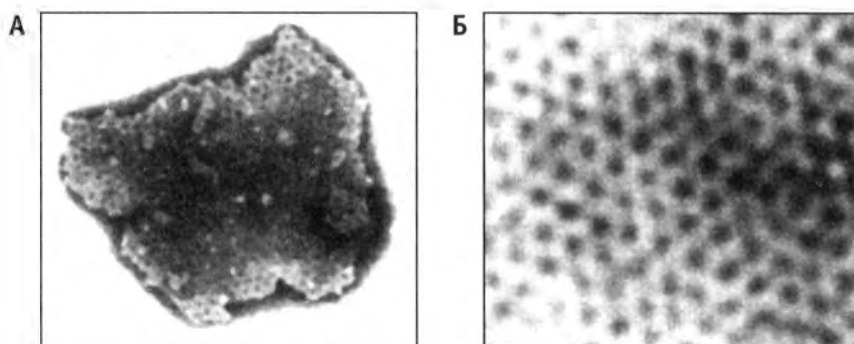


Рисунок 3.7.

- А. Внутренняя поверхность клеточной стенки ЭТ *Chlamydomytila pneumonia* УК-41. Видны правильные гексагональные структуры. Отрезок = 200 нм.
- Б. Изображение увеличено и преобразовано с помощью компьютерной программы Fourier. Отрезок = 100 нм. (Miyashita et al., 1993).

HeLa. ОмсВ имеет отрицательный заряд и щелочную реакцию. Причем, у биовара LGV щелочная реакция выше, чем у биовара *Trachoma*, и прикрепление LGV-штаммов в большей степени зависит от гепаран-сульфатов, что, по-видимому, отражает их более высокую инвазивность (Alien et al., 1990; Stephens, 1994; Chen, Stephens, 1997; Davis, Wyrick, 1997). Вполне вероятно, что ОмсВ – это периплазматический протеин, который своим N-концом либо выходит на поверхность бактериальной клетки, либо связан с гидрофильными каналами наружной мембраны. Часть ОмсВ, которая экспрессируется на поверхности клетки, должна быть очень малой, поскольку этот белок не удалось обнаружить на поверхности ЭТ с помощью иммуноэлектронной микроскопии (Collett et al., 1989; Mygind et al., 1998; Watson et al., 1994).

### МOMP

МOMP (major outer membrane proteine) – главный белок наружной мембраны – наиболее часто среди белков обнаруживается в ЭТ и РТ хламидий. МOMP кодируется геном *ompA* (ранее название *omp1*) (Stephens et al., 1986). В ЭТ, по сравнению с другими белками МOMP, содержится в соотношении 5 МOMP: 2 ОмсА: 1 ОмсВ (Everett, Hatch, 1991). В отличие от богатых цистеином белков ОмсА и ОмсВ, которые обнаруживаются только в элементарных тельцах хламидий, МOMP содержится как в ЭТ, так и в РТ (Caldwell et al., 1981; Hatch et al., 1981). Однако структура МOMP в элементарных и ретикулярных тельцах различна. В ЭТ он находится в конденсированной форме с большим количеством дисульфидных связей, а в РТ – в восстановленной форме (Newhall, Jones, 1983; Hatch et al., 1984; Hackstadt et al., 1985; Hatch et al., 1986; Newhall, 1987). МOMP прочно связан с белками клеточной стенки хламидий, однако природа этой связи пока неизвестна. Они могут образовывать единую гетеромерную структуру или взаимодействовать как отдельные гомополимеры.

До недавнего времени МOMP был единственным из известных белков, который всегда находится на поверхности *Chlamydia*. У всех штаммов МOMP состоит из четырех сероварвариабельных последовательностей аминокислот, которые чередуются с относительно консервативными участками (Stephens et al., 1987; Baehr et al., 1988; Conlan et al., 1988). Вариабельные участки

экспрессируются на поверхности и являются иммунодоминантными у многих штаммов хламидий, за исключением *C. pneumoniae*. (Campbell et al., 1990; Christiansen et al., 1997, 1998). В конце 80-х-начале 90-х годов огромные средства были вложены в исследования МОМР с целью создания на его основе вакцин против хламидийной инфекции. Однако, надежды на МОМР, как основу вакцины, не оправдались. При иммунизации животных протективный эффект носил выраженный сероварспецифический характер, зависел от конформационных эпитопов и был кратковременным (Tan et al., 1990; Batteiger et al., 1993; Pal et al., 1997; Zhang et al., 1997).

В нескольких исследованиях было показано, что МОМР играет важную роль в процессе адгезии – прикрепления хламидий к чувствительным клеткам. Если обработать ЭТ *C. trachomatis* трипсином, который разрывает соответствующие пептидные связи МОМР, то ЭТ утрачивают инфекционность. Моноклональные антитела, направленные против конформационных эпитопов МОМР, нейтрализуют инфекционность и препятствуют прикреплению ЭТ к клеткам культуры НаК. Агрегаты рекомбинатного МОМР успешно конкурируют с ЭТ хламидий за прикрепление к соответствующим рецепторам клеток-хозяев (Hackstadt, Caldwell, 1985; Zhang et al., 1987; Su et al., 1990, 1996; Fan, Stephens, 1997).

Молекула МОМР имеет четыре штаммоспецифических участка-домена с варибельной последовательностью аминокислот. Их обозначают VD (I-IV), и они экспрессируются на поверхности хламидийной клетки. Серотипспецифические моноклональные антитела к варибельным доменам МОМР нейтрализуют инфекционность ЭТ, блокируя прикрепление к чувствительным клеткам. VD несут отрицательный заряд, поэтому их блокирование препятствует электростатическому взаимодействию между ЭТ и клеткой. Молекула МОМР содержит также консервативный гидрофобный домен (CD), который не экспрессируется на поверхности и недоступен для антител. При потере инфекционности после тепловой обработки конформация этой части молекулы МОМР меняется. Возможно, CD участвует во второй фазе прикрепления, когда задействованы гидрофобные взаимодействия. Этот «секвестрированный» гидрофобный домен находится как бы в «кармане» и недоступен для лиганда на поверхности клетки, пока не произойдет электростатическая фиксация ЭТ на поверхности клетки. Далее в действие вступают гидрофобные силы, образуется необратимая связь и запускаются механизмы внедрения в клетку. Эта модель была предложена Su и соавторами (1990).

Функция МОМР в качестве адгезина была подробно изучена с помощью рекомбинантной технологии (Su et al., 1996). Если к С-концу полипептидной цепи МОМР присоединить особый блок, который носит название «мальтозасвязывающий протеин» (МВР), то в растворе комплекс МВР-МОМР образует высокомолекулярные частицы коллодия, достаточно крупные, чтобы быть различимыми в сканирующем электронном микроскопе. МОМР *C. trachomatis*, штамм мышинной пневмонии (современное название *Chlamydia muridarum*) в комплексе с МВР был клонирован в *Escherichia coli*. Это позволило визуализировать процесс прикрепления МОМР к клеткам. При электронной микроскопии видно, что МВР-МОМР специфически связывается с эпителиальными клетками человека при +4°C, но не поглощается клетками при повышении температуры до 37°C. Прикрепление МВР-МОМР к эукариотным клеткам ингибируется избытком гепарина и гепаран-сульфата, но не хондроидин-сульфата. Если у клеток линии HeLa удалить поверхностные протеогликаны с помощью фермента гепаритиназы, то МВР-МОМР перестает к ним прикрепляться. Однако хондроидиназа не подавляет прикрепление к клеткам. Культура мутантных клеток CHO, которые не синтезируют гликозаминогликаны, не адсорбирует на

поверхности МВР-МОМР и нативные ЭТ. Модель взаимодействия МОМР с клеткой предполагает, что МОМР является хламидийным рецептором для гликозаминогликанов, которые синтезируются клеткой-хозяином, тогда как гликозаминогликаны, по мнению Zhang и Stephens (1992), синтезируются хламидиями.

Возможно, МОМР взаимодействует с клеткой-хозяином через пока неизвестный олигосахаридный остаток (вероятно, это манноза), который прикреплен к N-концу белковой цепи (Swanson, Kuo, 1991; Kuo et al., 1996). По-видимому, МОМР является гликопротеином, поскольку обработка ферментом N-гликозидазой F уменьшает размер его молекулы, что видно при электрофорезе в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Очищенный МОМР *C. trachomatis*, серотипа L2, полученный с помощью препаративного электрофореза, связывается с рядом лектинов – веществ растительного происхождения, которые специфически связываются с определенными сахарами. Это агглютинин долихоса (*Dolichos biflorus*) – DBA, специфичный для N-ацетил-D-галактозамина; конканавалин А (ConA), специфичный для  $\alpha$ -D-маннозы и  $\alpha$ -D-глюкозы; агглютинин проростков пшеницы (wheat germ agglutinin – WGA), специфичный для N-ацетил-D-глюкозамина (нейраминавая кислота). Связь МОМР с перечисленными лектинами ингибируется соответствующими углеводами, что свидетельствует о том, что МОМР связывается именно своим углеводным остатком. После обработки N-гликозидазой F иммобилизованный МОМР, лишенный предполагаемого углеводного остатка, не связывает солюбилизованные клетки HeLa из экстракта, приготовленного с помощью детергентов (Swanson, Kuo, 1990, 1991). Природа углеводного остатка МОМР неизвестна. Определение его структуры затруднено из-за небольших количеств нативного МОМР, который можно получить из внутриклеточного паразита. Структура его близка к маннозе (Kuo et al., 1996). Попытки «пометить» МОМР с помощью 3H-галактозы или глюкозамина показали незначительное связывание радиоактивной метки. Swanson и Kuo (1994) отделили гликановый остаток от МОМР с помощью фермента N-гликаназы и поместили его тритием (3H) с помощью борогидрата натрия. Изолированный гликан связывался с клетками HeLa при 37°C. Это связывание подавлялось D-галактозой, D-маннозой и N-ацетилглюкозамином, но не подавлялось седогептулозой, D-фруктозой и нейраминавой кислотой. Данный изолированный гликан подавлял формирование включений в культуре клеток, если она была обработана им перед заражением хламидиями, равно как избыток ЭТ ингибировал присоединение гликана к клеткам HeLa.

Гликозилирование поверхностных белков – обычное свойство эукариотных клеток. У бактерий оно встречается сравнительно редко (Lechner, Wieland, 1989). В последние годы N-гликозилирование было обнаружено у *Pseudomonas*, *Borrelia*, и *Neisseria* (Brimer, Montie, 1998; Ge et al., 1998; Jennings et al., 1998). Характерно, что данные микроорганизмы являются необлигатными эндоситобионтами и часто паразитируют внутри клеток. Возможно, бактерии, в частности хламидии, используют для гликозилирования ферментный аппарат клеток-хозяев.

Stothard и соавторы (1998) провели филогенетический анализ МОМР, определив нуклеотидную последовательность генов, кодирующих этот белок и, соответственно, аминокислотную последовательность у 69 штаммов хламидий, представляющих 17 сероваров, которые вызывают инфекцию у человека. Не было выявлено эволюционных взаимоотношений между принадлежностью к определенному серовару и такими биологическими свойствами, как тропизм к определенным тканям, характер вызываемого заболевания, степень распространенности в популяции. У МОМР не было выявлено каких-либо аминокислотных последовательностей, определяющих биологические свойства данного штамма, кроме принадлежности к определенному серотипу.



По-видимому, вариабельные участки МOMP определяют не основные биологические или патогенные свойства хламидий, а антигенное разнообразие, которое возникло в результате эволюции как ответ на давление со стороны иммунной системы организма-хозяина. Примечательно, что у *Chlamydoxhyla pneumonia* вариабельные участки МOMP не распознаются иммунной системой человека и животных (Campbell et al., 1990; Christiansen et al., 1997). Возможно, их поверхностная экспрессия маскируется так называемыми полиморфными белками наружной мембраны – POMP. При естественной инфекции иммунный ответ формируется преимущественно к «конформационным» эпитопам МOMP, которые «видны» только при тримерной форме этого белка (Persson, Peykani, 1998).

Основное назначение МOMP – это функционирование в качестве порин клеточной стенки хламидий (Bavoil et al., 1984). Различные конформационные формы МOMP, в зависимости от наличия дисульфидных боковых связей, имеют разную проницаемость для молекул внутрь бактериальной клетки. Wyllie с соавторами (1998) показали, что МOMP функционирует в качестве ионного канала и в восстановленной форме может пропускать АТФ внутрь хламидийной клетки. По-видимому, только восстановленная форма МOMP, без дисульфидных боковых связей, функционирует в качестве порины, внедренной в билипидный слой наружной мембраны хламидий. Эта функция запускается, когда ЭТ попадает внутрь клетки. Происходит восстановление МOMP и богатых цистеином белков (Hatch et al., 1986). Дисульфидные связи МOMP разрываются, он меняет конформацию и становится проницаемым для ионов и молекул различных веществ. Во внеклеточной среде, когда пептидная цепь МOMP и других белков клеточной стенки сконденсирована, ЭТ практически непроницаемы для мелких молекул, что обеспечивает противодействие защитным механизмам хозяина во внеклеточной среде и останавливает метаболическую активность.

Для того чтобы ЭТ превратились в РТ и претерпевали деление, должен пройти процесс восстановления МOMP и других белков клеточной стенки. Восстановитель и ферменты, ответственные за процесс восстановления МOMP, пока неизвестны. Скорее всего, эти ферменты находятся в хламидийной клетке, а не в клетке-хозяине, поскольку, как было показано Hatch и соавторами (1986), восстановление МOMP полностью подавляется хлорамфениколом и не подавляется циклогексимидом. Однако не ясно, что запускает процесс дифференцировки ЭТ в РТ: то ли изменения проницаемости клеточной стенки приводят к экспрессии определенных генов, то ли эта экспрессия приводит к изменению проницаемости. Ясно одно – происходит восстановление надмолекулярных структур клеточной стенки после внедрения ЭТ в клетку, а затем происходит обратный процесс. Механизм этот весьма сложен, поскольку межцепочные связи разнообразны и многочисленны, и весь процесс должен быть синхронным и управляемым. При изучении генома хламидий были обнаружены участки нуклеотидной последовательности, которые потенциально являются генами редуктазы/изомеразы дисульфидных мостиков. Вероятно, они выполняют регулирующую функцию в данном процессе (Read et al, 2000).

### **POMP**

Campbell с соавторами (1990), затем Melgosa с соавторами (1993) сообщили о нескольких белках в нерастворимой в саркозиле фракции *C. pneumonia*, которые реагировали с кроличьей антисывороткой против *C. pneumonia*. Один из этих белков имел молекулярную массу около 98 kDa. Несколько иммунореактивных белков с молекулярной массой около 90 kDa были

выявлены у штамма *C. psittaci*, вызывающего аборт у овец (Cevenini et al., 1991; Souriau et al., 1994). Позже эти белки получили название «полиморфные белки (наружной) мембраны (Pmp), или предполагаемые белки наружной мембраны» (putative outer membrane proteins) – POMP. У *C. psittaci*, штамм A/22 было обнаружено, по крайней мере, шесть белков POMP. Парные гены, кодирующие четыре белка POMP, найдены в двух различных локусах хромосомы. Один локус кодирует белки Omp91A и Omp90A, а другой – Omp91B и Omp90B (Longbottom et al., 1996; Giannikopoulou et al., 1997; Longbottom et al., 1998). Два гена *omp90* абсолютно идентичны и являются примером дубликации генов у хламидий. Белки Omp91A и Omp91B совпадают по аминокислотной последовательности на 89% и на 86-87% сходны с Omp90. Все четыре POMP-белка имеют сигнальные последовательности, терминальный фенилаланиновый остаток и  $\beta$ -структуру ( $\beta$ -sheets), что характерно для белков наружной мембраны. Omp91A отличается тем, что его предположительная сигнальная последовательность (исходя из нуклеотидной последовательности гена) не имеет «cleavagesite» – места для фермент-зависимого «разрезания» полипептидной цепи на более короткие цепи – и имеет протяженную гидрофобную область, что предполагает его связь с внутренней мембраной. Иммуноэлектронная микроскопия с использованием коллоидного золота показала, что Omp90 экспрессируются на поверхности хламидийной клетки своими N-концами (Longbottom et al., 1998).

Геном *C. trachomatis* включает девять, геном *C. pneumoniae* – 21, а геном *C. psittaci* – 5 POMP-генов – *pmp* (Stephens et al., 1998; Grimwood et al., 1998; Longbottom et al., 1998; Laroucau et al., 2000a). Восемь из девяти *pmp* *C. trachomatis* локализованы в двух отдельных кластерах. Тогда как девятый ген расположен на расстоянии около 1 kbp (1000 пар нуклеотидов) и в противоположной ориентации к одному из этих кластеров. POMP-белки *C. trachomatis* проявляют весьма слабую гомологию с Omp90-91 *C. psittaci*. Тем не менее они имеют несколько общих характеристик, в частности терминальные фенилаланиновые остатки, повторяющиеся глициновые тетрады и сигнальные последовательности (за исключением PmpA). POMP-белки *C. trachomatis* имеют между собой сходство в аминокислотной последовательности от 9 до 40%, а их молекулярная масса колеблется от 96 000 до 187 000 (Lindquist, Stephens, 1998; Stephens et al., 1998). Все ли девять *pmp*-генов экспрессируются, неизвестно. Специфическая матричная РНК каждого из 9 генов обнаруживается в инфицированных клетках, однако не ясно, имеются ли все 9 белков на поверхности клетки. Столь значительное разнообразие POMP не вполне объяснимо. То, что относительно большая часть генома хламидий, который сам по себе не является большим, посвящена кодированию полипептидов одного класса, говорит о важности этих белков для жизнедеятельности микроорганизма. По одной из гипотез, POMP служат источником антигенного разнообразия внутри вида. В исследованиях Stothard и Batteiger (2000) все *pmp*-гены (кроме *pmpB* и *pmpH*) 12 лабораторных серотипов *C. trachomatis* (от А до К плюс Va) и тринадцатый серотип F, выделенный от больного, были амплифицированы в ПЦР. ДНК была очищена и подверглась воздействию рестриктирующих эндонуклеаз NhaI, HinfI, TaqI, MseI и анализировалась в агарозном геле (метод RFLP). Автоматическое секвенирование (определение нуклеотидной последовательности) было использовано для получения nt-последовательностей 3 порции *pmp1* (примерно от 560 пары) у каждого из 12 серотипов. Скрининг с помощью указанных методов выявил незначительные различия *pmp*-генов среди сероваров *C. trachomatis*. Тем не менее эти различия могут быть использованы для генотипирования при молекулярно-эпидемиологических исследованиях хламидийной инфекции.

В исследованиях с применением ПЦР установлено, что хламидийные *POMP*-гены подвергаются транскрипции через 10 часов после заражения культуры клеток *C. trachomatis*. *POMP*-белки появляются в хламидийной клетке на поздних стадиях жизненного цикла. Пока неизвестно, экспрессируются ли они в течение всего жизненного цикла (как *MOMP*) или являются характерными только для определенных стадий жизненного цикла (как *OmcA* и *OmcB*). С помощью иммуноэлектронной микроскопии было показано, что *POMP* находятся на поверхности ЭТ и РТ у *C. pneumoniae* и *C. psittaci* (Knudsen et al., 1998; Longbottom et al., 1998a). Функция *POMP*-белков у хламидий не установлена. Возможно, они играют важную роль в патогенезе хламидийной инфекции, поскольку их экспрессия меняется в течение заболевания, что было установлено Birkelund et al. (1998) при экспериментальной инфекции *C. pneumoniae* у мышей.

### Белок теплового шока Hsp70 (DnaK)

В 1991 году Schmiel и соавторы исследовали экспрессию генов *C. trachomatis* (серовар E рекомбинантных клонов *E. coli*, штамм JM109), которые обладали способностью прочно прикрепляться к эндотелиальным клеткам эндометрия. Был выявлен клон, продуцирующий три хламидийных протеина массой 18, 28 и 82 kDa. Белок массой 82 kDa оказался «стрессовым» протеином Hsp70, который затем был обнаружен у хламидий и получил название DnaK (Schmiel, Wyrick, 1994). Hsp70 – цитоплазматический белок, однако как было показано Raulston et al. (1993, 1998), часть его локализуется в наружном мембранном комплексе ЭТ хламидий. С-конец Hsp70 распознается моноклональными антителами только после обработки ЭТ дитиотретинолом, что показывает, что он находится в периплазматическом пространстве или связан с внутренним листком наружной мембраны. Danilition с соавторами (1990) показали, что Hsp70 может находиться при определенных условиях на поверхности хламидийной клетки, так как антисыворотка против этого белка реагирует с *C. trachomatis*, серовар D (биовар *Trachoma*). Вероятно, Hsp70 играет важную роль в процессе внедрения хламидий в клетку-хозяина. Вначале, после первого контакта ЭТ с клеткой, включается неизвестный механизм, который приводит к изменению конформации наружной мембраны и появлению на ее поверхности белка Hsp70. Затем Hsp70 прямо или через лиганд связывается с рецептором чувствительной клетки. Этот процесс зависит от АТФ, поскольку добавление в культуру АТФ-γS (аналога природного АТФ, который не разлагается с выделением энергии) существенно уменьшало инфекционность, но не препятствовало процессу прикрепления хламидий к клеткам культуры.

### Другие белки наружной мембраны

Для структуры поверхности хламидий характерны куполообразные, правильно расположенные выпячивания, через которые проходят пикообразные отростки. Это морфологическое свойство хламидий было обнаружено при просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, а также при изучении препаратов после замораживания и раскальвания. Количество, размеры и пространственное расположение пикообразных отростков у большинства штаммов хламидий примерно одинаковы и присутствуют как в ЭТ, так и в РТ. (рис. 3.4). Matsumoto (1988) предположил, что эти отростки служат для обмена молекулами между паразитом и хозяином, так как они проникают через мембрану включения в цитоплазму клетки хозяина. Ему удалось выделить и охарактеризовать пикообразные отростки. Их структура оказалась сходной с хвостовым участком T-бактериофагов.

Bavoil и Hsia (1998) предположили, что пикообразные отростки представляют собой секреторный аппарат III типа (TTS). Изучение генома хламидий выявило, что они содержат гены секреторного аппарата III типа (Hsia et al., 1997; Stephens et al., 1998; Read et al., 2000). Один из четырех известных локусов TTS включает гены *cds1*, *cds2*, *scc1* и *copN*. Предполагаемые белки Cds1 и Cds2 являются компонентами цитоплазматической мембраны, необходимыми для контактзависимой секреции. Белок CopN, являющийся аналогом MxiC *Shigella flexneri*, InvE *Salmonella typhimurium*, YopN (LcrE) *Yersinia*, также связан с наружной мембраной и обладает регуляторными функциями. Lagoucau и соавторы (2000) амплифицировали с помощью ПЦР гены *cds1*, *cds2*, *scc1* и *copN* *C. pecorum*, серотип 1, и птичий и кошачий штамм *C. psittaci*. Сравнение амплифицированных фрагментов с геномом *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* демонстрирует консерватизм этого локуса у различных хламидий. Профили RFLP белка CopN позволяют различить штаммы, вызывающие патологию у грызунов, птиц, кошек и морских свинок, и сделать предположение о специфичности этого протеина, определяемой хозяином.

У патогенных грамотрицательных бактерий секреторный аппарат III типа активируется при контакте с клеткой хозяина, и особые белки «впрыскиваются» внутрь клетки, прерывают сигнальную трансдукцию клетки, разрушают элементы цитоскелета. Это ведет к гибели профессиональных фагоцитов и эндоцитозу бактерии эпителиальной клеткой (Huesck, 1998). Природа этих белков у хламидий неизвестна. Наиболее вероятными кандидатами на роль таких белков являются Inc-протеины. Это белки, регулирующие синтез мембраны включения, и белки, предотвращающие апоптоз инфицированной хламидиями клетки. Из них наиболее вероятным кандидатом является предполагаемый фермент серин/треонин протеин киназа, ген которой (CT637) находится в одном из локусов, который кодирует секреторный аппарат III типа (Fan et al., 1998). Белки IncA, IncB, IncC, которые локализованы в мембране включения, транспортируются туда с помощью секреторного аппарата III типа (Hsia et al., 1997; Rockey et al., 1997; Vannantine et al., 1998). Роль секреторного аппарата III типа в патогенезе инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, была осознана сравнительно недавно (Huesck, 1998). Белки, составляющие секреторный аппарат III типа, довольно консервативны и мало отличаются у разных бактерий. Однако продукты их секреции разнообразны и видоспецифичны. Установление структуры этих молекул является важной задачей хламидиологии, что позволит пролить свет на патогенез внутриклеточной инфекции.

Хламидии определенно контролируют взаимодействие между включением и ферментными системами клетки-хозяина и определяют «маршрут» движения включения в клетке (Hackstadt, 1999). Секреторный аппарат III типа иногда называют «контактзависимой» секреторной системой, поскольку он активируется после контакта с клеткой-хозяином. Поскольку ЭТ являются метаболически инертными, то в случае, если вирулентные протеины «впрыскиваются» сразу же после контакта ЭТ с клеткой, они должны быть синтезированы заранее. Другим возможным вариантом событий является начало функционирования секреции III типа на поздних стадиях жизненного цикла хламидий – после их поглощения и формирования включения (Bavoil, Hsia, 1998; Kubo, Stephens, 1998).

В последние годы поверхностные белки хламидий интенсивно изучались, что определило их роль в иммунном ответе и в процессе внедрения в клетку-хозяина (Hackstadt et al., 1995; Hackstadt et al., 1996; Scidmore et al., 1996; Taraska et al., 1996; Wylie et al., 1997; Hatch, McClarty, 1998). Melgosa и соавторы (1994) клонировали и определили нуклеотидную



последовательность гена, кодирующего белок массой 76 kDa – видоспецифический антиген *C. pneumoniae*. Антитела против рекомбинантного белка 76 kDa нейтрализовывали инфекционность *C. pneumoniae* в культуре клеток. Локализация этого белка в бактериальной клетке неизвестна, но скорее всего, он находится на поверхности клетки. «Урезанная» форма этого белка кодируется геном CT623 у *C. trachomatis*, серотип D.

Swanson и Kuo (1990, 1994) идентифицировали два потенциальных гликопротеина *C. trachomatis*, массой 18 и 32 kDa, на основании реакции с лектинами после диск-электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия и последующего блоттинга на фильтры из нитроцеллюлозы. Размер этих белков оказался аналогичным размеру гистоноподобных протеинов Hc1 и Hc2 *C. trachomatis*, серотип L2. Большой из этих лектинсвязывающих белков варьировал в зависимости от штамма, наподобие Hc2 – большего из гистоноподобных белков (Hackstadt et al., 1993). Однако в отличие от гистоноподобного белка Hc2, который имеет щелочную реакцию, лектинсвязывающий белок 32 kDa имеет кислую реакцию. Предполагается, что оба лектиновых белка играют важную роль в адгезии к клетке-хозяину и характерны для ЭТ (Swanson, Kuo, 1994; Swanson et al., 1998).

При анализе генома *C. trachomatis*, серотип D, было обнаружено, что несколько «открытых рамок считывания» гомологичны известным генам, кодирующим белки наружной мембраны других бактерий. Ген CT713, сходный с геном MOMP, возможно, кодирует OmpB – вторую хламидийную порину. Ген *yaеT* (CT241), сходный с геном, который кодирует белок гонокки, связан с вирулентностью. Еще один белок наружной мембраны, кодируемый геном *pal* (CT600), является липопротеином, входящим в состав пептидогликана у других грамотрицательных бактерий. Поскольку вопрос о наличии пептидогликана в клеточной стенке хламидий пока не решен, то изучение белка Pa1, возможно, прольет свет на эту проблему.

### Липополисахариды (ЛПС)

Все представители семейства *Chlamydiaceae* имеют общий липополисахаридный групповой антиген, который используется в иммунодиагностике многих хламидийных инфекций. Имеются также видоспецифические и штаммоспецифические ЛПС-антигены хламидий. Peterson с соавторами (1998) получили моноклональные антитела к *C. pneumoniae*, штамм TW-183, которые нейтрализовывали инфекционность только данного штамма и не производили подобного эффекта на другие штаммы и виды *Chlamydia* и *Chlamydophila*. Превалирующая форма ЛПС у хламидий, выращенных на культурах клеток, напоминает грубую форму ЛПС *Salmonella minnesota*, штамм Re (Nurminen et al., 1983; Brade et al., 1987). Однако имеется, по крайней мере, два важных различия между хламидийными ЛПС и ЛПС кишечных бактерий. Во-первых, у хламидий структура центрального основного трисахарида 3-деокси-D-манно-окулозонной кислоты (KDO) наряду со связью 1-4, имеет также связь 1-8 (родоспецифический эпитоп), а у кишечных бактерий ЛПС имеют только 1-4 связь KDO. Во-вторых, ЛПС хламидий обладают низкой эндотоксической активностью, хотя они могут индуцировать цитокиновый ответ (Ivins, Wyrick, 1978; Lewis et al., 1979; Ingalls et al., 1995). За направленность связей в молекуле KDO отвечает фермент многофункциональная KDO трансфераза. Так показано, что у *C. psittaci* KDO может существовать, по крайней мере, в двух различных конфигурациях, которые являются штаммоспецифическими (Belunis et al., 1992; Lobau et al., 1995; Holst et al., 1995). Lukacova и соавторы (1994) обнаружили «гладкую форму» (smooth variant) ЛПС у *C. psittaci*, которая встречается у хламидий, выращенных в куриных эмбрионах, но не встречается у хламидий,

выращенных на культурах клеток. Авторы предположили, что *in vivo* в многоклеточном организме хламидии способны синтезировать O-боковые цепочки, и эта способность утрачивается при выращивании на культуре клеток. Однако при расшифровке генома хламидий не были обнаружены гены, аналогичные генам *rfa* и *rfb* кишечных бактерий, которые ответственны за синтез O-боковых цепей ЛПС. Состав жирных кислот в хламидийных ЛПС весьма разнообразен. Qureshi и соавторы (1997) предположили, что относительно низкая эндотоксическая активность ЛПС хламидий обусловлена необычным составом жирных кислот липида А – основного компонента ЛПС.

В 80-х годах с помощью иммуноэлектронной микроскопии было показано, что ЛПС в большом количестве присутствуют на поверхности РТ, нежели на поверхности ЭТ (Кюо, Чи, 1987; Collett et al., 1989). Химическая структура ЛПС, и как следствие – поверхностная экспрессия отдельных эпитопов в молекулах ЛПС хламидий, зависит от стадии жизненного цикла. Так Birkelund и соавторы (1988) охарактеризовали два вида моноклональных антител, один из которых реагировал только с ЭТ, а другой – только с РТ. Были выявлены тесные топологические взаимоотношения между МOMP и ЛПС, которые химически могут связываться между собой посредством дисукцинимидилселенодипропионата (ССП). ЛПС хламидий играют важную роль в патогенезе хламидийной инфекции и в иммунном ответе на хламидии. Существует мнение, что именно они являются маркерами, которые «метят» пораженную клетку, позволяя иммунной системе хозяина отличить инфицированные клетки от интактных. Липополисахариды хламидий включаются в состав мембраны цитоплазматических включений, находятся в цитоплазме клетки-хозяина, в наружной клеточной мембране. Их можно обнаружить также в межклеточной среде, что подтверждено несколькими группами исследователей (Richmond, Stirling, 1981; Karimi et al., 1989; Campbell et al., 1994). Изучение структуры и биологической функции хламидийных ЛПС является важным направлением биохимии хламидий.

#### **Гликозаминогликаны и экзогликолипид**

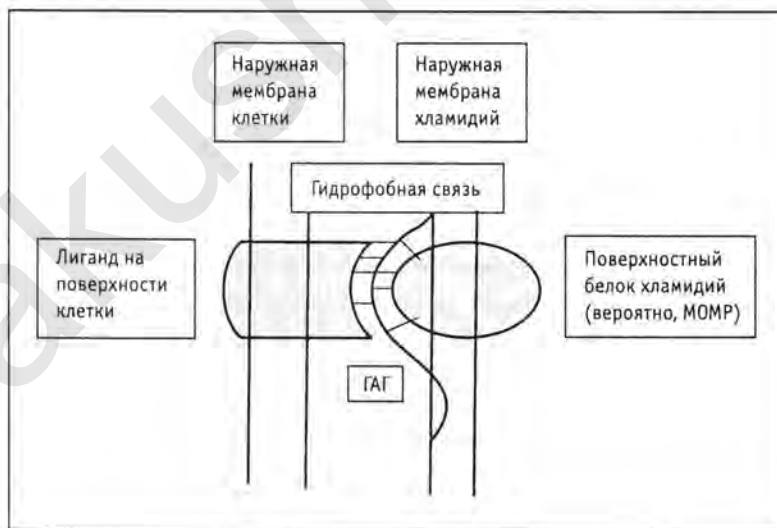
У хламидий имеются две сложные небелковые молекулы – сходные с гепаран-сульфатом гликозаминогликаны (ГАГ) и экзогликолипид (ЭГЛ). ГАГ – повторяющиеся дисахариды, состоящие из аминокетоз, которые широко распространены в эукариотных клетках. Они играют важную роль в адгезии вирусных, бактериальных и протозойных паразитов к клеткам животных и человека (Rostand, Esko, 1997). ГАГ были обнаружены Zhang и Stephens (1992) у *C. trachomatis*, серотип L2. Способность хламидий синтезировать ГАГ была доказана двумя способами. Меченный ГАГ был выявлен с помощью ионообменной хроматографии в клетках яичника китайского хомячка после заражения их *C. trachomatis*. Сами эти клетки не способны синтезировать ГАГ. Кроме того, было показано, что гепаран-сульфат-специфические моноклональные антитела реагируют с включениями хламидий в зараженных клетках.

ГАГ приписывается важная роль в механизме прикрепления хламидий к чувствительным клеткам. Прикрепление *C. trachomatis*, серотип L2 к клеткам HeLa ингибируется гепарином и гепаран-сульфатом, но не хондроидин-сульфатом, кератан-сульфатом или гиалуроновой кислотой. При обработке ЭТ ферментом гепаритиназой, разрушающей ГАГ, хламидии теряют способность прикрепляться к чувствительным клеткам. С другой стороны, последующая обработка их гепаран-сульфатом восстанавливает способность ЭТ к прикреплению к клеткам. Очевидно, ГАГ служат связующим звеном между поверхностными белками хламидий и лигандом на поверхности клетки-хозяина. Таким образом, на начальном этапе адгезии обра-

зуется тримолекулярная сэндвич-структура, в которой ГАГ нековалентно связывает белок хламидий с рецептором на поверхности клетки. Su et al. (1996) предполагают, что этим белком является MOMP.

Ряд исследователей изучили структуру ГАГ и их значение у разных штаммов *C. trachomatis* и *C. psittaci*. Полученные данные подтвердили роль ГАГ в первичной адгезии хламидий на поверхности клеток (Chen, Stephens, 1994, 1997; Chen et al., 1996; Gutierrez-Martin et al., 1997) (рис. 3.8). Данная модель предполагает, что гепаран-сульфаты – молекулы хламидийного происхождения, которые находятся на поверхности ЭТ. Однако большинство бактерий не могут синтезировать гликозаминогликаны. Вопрос о том, синтезируются ли гепаран-сульфаты самими хламидиями или происходят из клетки-хозяина, не считается окончательно решенным. Дело в том, что в последние годы способность хламидий синтезировать ГАГ и ЭГЛ подверглась сомнению, поскольку при полной расшифровке генома хламидий не было обнаружено генов, кодирующих необходимые ферменты для сборки этих сложных молекул (Stephens et al., 1998; Read et al, 2000). Вполне вероятно, что в синтезе ГАГ хламидий принимает участие ферментный аппарат клетки-хозяина. В эукариотных клетках ГАГ синтезируются в аппарате Гольджи, с которым цитоплазматическое включение, содержащее внутриклеточные хламидии, плотно взаимодействует (Jackson et al., 1991; Hackstadt et al., 1995). По крайней мере, два поверхностных протеина хламидий могут связывать ГАГ – это MOMP и OmcB (Stephens, 1994; Ting et al., 1995; Su et al., 1996).

Участие ГАГ в прикреплении к клеткам-хозяевам варьирует у различных видов и штаммов хламидий. Гепаран-сульфат служит в качестве рецептора для *C. pneumoniae*. Растворимый гепарин и гепаран-сульфат подавляли прикрепление *C. pneumoniae* к эпителиальным



**Рисунок 3.8.** Гипотетическая модель прикрепления хламидий к чувствительной клетке посредством гликозаминогликана (ГАГ). (По данным Zhang, Stephens, 1992; Chen, Stephens, 1994, 1997; Su et al., 1996; Gutierrez-Martin et al., 1997).

клеткам человека культуры HEp-2, соответственно, на 90% и 50%. Хондроидин-сульфаты А и С, а также кератан-сульфат не оказывали эффект на прикрепление и инфицирование клеток HEp-2. Удаление гепаран-сульфата с поверхности клеток с помощью ферментов существенно снижало инфекционность хламидий. Характерно, что мутантные клетки яичника китайского хомячка, лишённые гепаран-сульфата, гораздо менее чувствительны к инфекции *C. pneumoniae*, чем нормальные аналогичные клетки (Wuppermann et al., 2000).

Прикрепление и формирование включений у LGV-биовара *C. trachomatis* подавляются в равной степени, если их предварительно обработать ГАГ, связав при этом необходимые рецепторы. Влияние гепаран-сульфатов на *C. trachomatis*, биовара *Trachoma* и на *C. psittaci*, штамм GPIC, несколько иное. Прикрепление подавляется незначительно, тогда как развитие продуктивной инфекции не происходит. Различные механизмы прикрепления двух биоваров *C. trachomatis* к чувствительным клеткам объясняются различиями их биологических свойств *in vivo*. Репродукция биовара *Trachoma* происходит в супрануклеарной, апикальной зоне поляризованного эпителия. Поглощение и высвобождение осуществляются через апикальную поверхность клетки, которая содержит мало гепаран-сульфата. Биовар LGV, как более инвазивный, проникает в подслизистую, поражает клетку со стороны базальной и латеральных поверхностей, где гепаран-сульфатов намного больше. Из этого следует, что у некоторых хламидий существуют другие механизмы прикрепления к клетке-хозяину, не связанные с ГАГ (Su, Caldwell, 1998). Однако ГАГ все же необходимы для внедрения и развития инфекции (Zhang, Stephens, 1992; Chen, Stephens, 1997; Davis, Wyrick, 1997; Gutierrez-Martin et al., 1997). Подобные механизмы встречаются и в процессе внедрения в клетку других внутриклеточных паразитов. Так, герпесовирус ветряной оспы (*Varicella-zoster*) прикрепляется к клетке посредством гепаран-сульфатного протеогликана. Этот этап необходим лишь для стабилизации вируса на поверхности клетки таким образом, чтобы он мог взаимодействовать с рецептором, необходимым для внедрения в клетку – маннозой-6-фосфатом (Zhu et al., 1995). В случае хламидий гепаран-сульфаты могут инициировать электростатическое прикрепление к клеточной поверхности, где впоследствии для внедрения в клетку необходимо необратимое, ковалентное взаимодействие между лигандом и рецептором.

Экзогликолипид (ЭГЛ) (в англоязычном варианте – GLXA) – родоспецифический антиген, который реагирует с сывороткой людей, зараженных хламидийной инфекцией (Stuart, MacDonald, 1989). ЭГЛ был выделен из ЭТ и из надосадочной жидкости при центрифугировании суспензии зараженных клеток. С помощью иммунофлуоресценции присутствие ЭГЛ было продемонстрировано в хламидийных включениях и цитоплазме инфицированных клеток (Stuart et al., 1991). Хотя по своим свойствам ЭГЛ близок к липополисахаридам, химически он является гликолипидом, состоящим из C17 и C18 жирных кислот и углеводного иммунодоминантного остатка полигулозы, который по строению напоминает гликолипид алгинат (MacDonald, 1984; Stuart et al., 1987). Размер молекулы ЭГЛ примерно соответствует размеру молекул белков, молекулярной массой 30-60 kDa, что было показано с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия. По всей видимости, ЭГЛ играет важную роль в патогенезе хламидиоза и в иммунном ответе на хламидии, поскольку антиидиотипические моноклональные антитела к ЭГЛ обладают протективными свойствами при введении их животным перед заражением хламидиями. (An et al., 1997; Gerard et al., 1997).



### 3.3.2. Нуклеоид

У представителей *Chlamydiales*, как и у других прокариотов, генетический материал не окружен мембраной. Они не имеют ядра, как все эукариоты. Геном хламидий заключен в одну хромосому, которая представляет собой одну двухцепочную молекулу ДНК, находящуюся в комплексе с гистоноподобными белками и собранную в компактное ядерное образование – нуклеоид. При электронной микроскопии нуклеоид, который представляет собой электронноплотное образование в центре клетки, хорошо виден у ЭТ и ПТ, но отсутствует как морфологическая структура у РТ (рис. 3.1).

Пространственная и структурная организация нуклеоида хламидий неизвестна. Wagar и Stephens (1988), а затем Solbrig с соавторами (1990) показали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с доцецилсульфатом натрия, что в состав нуклеоида хламидий входят два богатых лизином и аргинином гистоноподобных белка – Hc1 и Hc2. У *Chlamydiales* имеются гены *hctA* и *hctB*, кодирующие эти белки. Эти гены удалось клонировать и определить их нуклеотидную последовательность у различных штаммов *Chlamydia* (Tao et al., 1991; Hackstadt et al., 1991; Kaul et al., 1992; Brickman et al., 1993). Они являются аналогами генов гистонов класса H1 эукариотов. Геном хламидий содержит ряд последовательностей, кодирующих белки, которые, по аналогии с прокариотными клетками, возможно, играют роль в конденсации-деконденсации хроматина и связаны с нуклеоидом – SET (CT737), SWIB (CT460), Swi/Snf2 (CT 555, CT 708). Хламидийные гистоноподобные белки Hc1 и Hc2 связываются с ДНК *in vitro* (Perara et al., 1992; Barry et al., 1993; Brickman et al., 1993; Petersen et al., 1994, 1996a, 1996b; Remacha et al., 1996).

Гистоноподобный белок Hc1 обнаружен у всех сероваров *C. trachomatis* и у Mn- и GPIC-штаммов *C. psittaci*. Молекулярный вес этого белка, определенный с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, оказался одинаковым у всех штаммов хламидий. Антитела, приготовленные к Hc1 *C. trachomatis*, серотип L2, реагировали с Hc1 всех штаммов хламидий (Hackstadt et al., 1993). Аминокислотная последовательность белка Hc1, серотипов L2 и J *C. trachomatis* идентична и обладает большой степенью гомологии со штаммом Mn *C. psittaci*, особенно в области N-конца (Kaul et al., 1992). Более консервативный C-конец Hc1 связывается с ДНК, тогда как близко к N-концу расположен сайт протеин-протеин димеризации. Гистонный гомолог Hc2 обнаружен у штамма GPIC и не обнаружен у штамма Mn *C. psittaci*. У *C. trachomatis* миграция Hc2 при электрофорезе в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия находится в зоне Mr от 23000 до 32000, в зависимости от серовара и биовара. Столь значительная разница молекулярных масс одного и того же белка у близких микроорганизмов объясняется внутренними делециями. В результате в области N-окончания кодируются множественные пентамерные повторения трех алифатических аминокислотных остатков (обычно валина или аланина) и двух основных остатков (лизина и аргинина). У Hc2 именно N-конец связывается с ДНК, а не C-конец, как у Hc1. Следующие цепочкой пентамерные остатки в этой области молекулы формируют перекрученную спиральную структуру, которая подходит к «большой борозде» двойной спирали ДНК. Остатки лизина формируют положительный заряд, который взаимодействует с отрицательным зарядом фосфатно-пентозного остова ДНК (Brickman et al., 1993).

Наличие у хламидий гистонных белков было подтверждено в экспериментах по клонированию хламидийных генов *hctA* и *hctB*, которые при экспрессии в *E. coli* вызывают конформационные изменения ДНК. Значительные различия между этими белками в способе взаимодействия

с ДНК изучены в электронномикроскопических исследованиях (Barry et al., 1992; Barry et al., 1993; Christiansen et al., 1993; Petersen et al., 1996a; Remacha et al., 1996). Действие двух гистоноподобных белков хламидий на ДНК различно. Hc1 вызывает образование сферического конденсированного нуклеоида, который наблюдается в ЭТ. Hc2 формирует менее компактные структуры. Hc2 имеет большую аффинность (т.е. большее сродство) с линейной, релаксированной ДНК и РНК и более эффективно подавляет синтез РНК и белка, чем Hc1. Hc1 одинаково хорошо связывается с линейной и суперскрученной (суперспирализованной) ДНК. По-видимому, Hc1 в основном ответственен за «упаковку» ДНК в ЭТ, тогда как Hc2 регулирует стадийспецифическую экспрессию генов.

Количество гистонных белков составляет 4-7% от всех белков, обнаруживаемых в ЭТ хламидий. Этого достаточно, чтобы связать примерно каждую из 100 нуклеотидных пар в геноме хламидий. Точные места связывания гистонов с ДНК, а также распознаваемые гистонами последовательности и конформации ДНК у хламидий неизвестны. Kauf и соавторы (1996) установили, что Hc1 связывается с ДНК скрытой плазмиды в сайте, удаленном примерно на 500 пар нуклеотидов вверх от места начала репликации. С ДНК хромосомы Hc1 связывается в сайте выше гена *hctA*, кодирующего Hc1. Эти два сайта плазмидной и геномной ДНК имеют общий участок в 24 пары нуклеотидов, с высоким содержанием аденина-тимина, с которым Hc1 связывается *in vitro*.

Функции хламидийных гистоноподобных белков до конца не изучены. Способность рекомбинантных хламидийных гистонов подавлять синтез нуклеиновых кислот и белков в *E. coli*, а также вызывать плотную конденсацию ДНК и изменять синтез РНК в системе транскрипции/трансляции *in vitro* предполагает их ведущую роль в поддержании метаболического покоя в ЭТ. Гистоны также играют специфическую роль в экспрессии генов. Индукция *hctA*-гена в *E. coli* не влияет на экспрессию *OmpC*, но уменьшает экспрессию *OmpF* – факт, означающий уменьшение суперспирализации кольцевой хромосомы *E. coli*. Аналогично, экспрессия промотора *proU*, который появляется при сильно скрученном состоянии хромосомы, уменьшается. Barry и соавторы (1993) обнаружили, что ДНК скрытой хламидийной плазмиды находится в релаксированном состоянии через 36 ч после заражения, когда в клетке присутствуют гистоны в субструктурных количествах, и в скрученном состоянии — через 12 ч, когда гистонов нет. Solbrig и соавторы (1990) показали, что хламидийные плазмиды находятся в более суперспирализованном состоянии в ЭТ, нежели в РТ, когда хромосомная ДНК плотно упакована в нуклеоид. Возможно, гистоны, присутствуя в субструктурных количествах на поздних стадиях цикла (когда РТ еще не превратились в ЭТ и не сформировался нуклеоид), обеспечивают раскручивание специфических участков ДНК, чтобы обеспечить экспрессию генов, необходимых для завершения цикла развития. Действуют ли гистоны подобным образом на ранних стадиях жизненного цикла хламидий – неизвестно. Хотя внеклеточные ЭТ метаболически инертны, многие хламидийные протеины синтезируются буквально в течение минут после внедрения в клетку-хозяина, задолго до того, как компактный, электронноплотный нуклеоид исчезает. Быстрая экспрессия генов, необходимых на ранней стадии жизненного цикла, обеспечивается селективным связыванием гистоноподобных белков. Они могут действовать опосредованно, «оголяя» промоторы соответствующих генов, или непосредственно, обеспечивая экспрессию через уменьшение скручивания отдельных участков ДНК. Количество генов, начинающих действовать в первый час после внедрения хламидий в клетку, весьма велико, что говорит об изменении взаимодействия между гистоноподобными белками и ДНК сразу после внедрения.

Нерешенным остается вопрос, каким образом клетка избавляется от гистонов, когда ЭТ превращается в РТ. Kaul и соавторы (1997) предположили, что по мере превращения ЭТ в РТ гистоноподобные белки подвергаются протеолизу предполагаемыми гистонспецифическими протеазами, в частности EUO-белком. Однако протеолитическая активность EUO *in vitro* не была подтверждена. Тот факт, что EUO продолжает синтезироваться в хламидийной клетке еще долго после того как нуклеоид исчезает, свидетельствует, что разрушение гистоноподобных белков не является его главной функцией (Zhang et al., 1998)

Геном хламидий включает ген, кодирующий пептид, гомологичный SET-домену эукариотных клеток. SET-домен позволяет хромосомассоциированным белкам связываться друг с другом, регулируя конденсацию хромосомы. Zhong и Hatch (2000) идентифицировали белок, с которым связывается SET-домен *C. trachomatis*, L2. Ген, кодирующий SET, был клонирован и экспрессирован в *E. coli* и в дрожжах. Была приготовлена кроличья антисыворотка против SET. Антитела, меченные флуорохромом, использованы для локализации SET в инфицированных L-клетках. Специфическая флуоресценция была отмечена через 15 ч после заражения и была связана исключительно с хламидиями. С помощью глутатион-S-трансферазного теста и ауторадиографии был идентифицирован пептид, который в диск-электорофорезе мигрировал вместе с небольшим (20 kDa) гистоноподобным белком – продуктом гена *hcta* *C. trachomatis*, L2.

\*\*\*

Подытоживая раздел о структурных и функциональных особенностях хламидий, их взаимодействии с клеткой-хозяином, можно говорить об уникальных патогенетических механизмах хламидийной инфекции. Эти механизмы включают стимуляцию поглощения хламидий клеткой, изменение цитоскелета, предотвращение апоптоза, изменение сигнальных путей и транспорта веществ в клетке. Благодаря новым методикам клеточной биологии, биохимии, генетики, примененным к изучению хламидий, понимание сущности хламидийной инфекции существенно продвинулось за последние годы. Однако молекулярные механизмы взаимодействия хламидий с клеткой во многом остаются неизвестными. Раскрытие их может привести к принципиально новым возможностям в плане химиотерапевтического и иммунологического воздействия на хламидийную инфекцию и к появлению эффективных, избирательных методов лекарственного и немедикаментозного лечения больных с патологией, вызванной хламидиями.

## ГЛАВА 4. ГЕНОМ *CHLAMYDIACEAE*

### 4.1. ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ХЛАМИДИЙ

Генетический код *Chlamydia trachomatis*, биовар *Trachoma*, серовар D, и *C. pneumoniae* расшифрован. Его можно получить через интернет по адресу <http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231> или на геномном сайте GenBank по кодовым номерам AE001273 и AE001363, соответственно. На веб-сайте университета Беркли (Berkeley Web site) можно найти генетическую последовательность *C. trachomatis*, LGV-биовар, серовар L2, а также геном

многих возбудителей инфекционных болезней человека, в том числе и передаваемых половым путем. Расшифровка генетического кода хламидий потребовала много усилий, затрат времени и ресурсов, однако она открыла новый этап в изучении биологических свойств этих микроорганизмов. Информация о генах хламидий позволяет лучше понять физиологию, структуру, метаболизм и регуляторные процессы, свойственные хламидиям. Будучи внутриклеточными паразитами, хламидии гораздо менее изучены, чем многие другие бактерии, вызывающие патологию человека. Наличие структурных и регуляторных последовательностей в геноме хламидий, сходных с аналогичными последовательностями, известными у других прокариотов, позволяет выдвигать гипотезы, целенаправленно планировать научные исследования. Этот путь, вероятно, относительно скоро приведет к прорыву в лечении и профилактике заболеваний, вызванных хламидиями.

Stephens (1999) сравнил генетическую последовательность *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* с летописью, которую еще предстоит прочитать, понять и перевести на язык биологических макромолекул. Геном хламидий, как древний текст, содержит полную эволюционную историю, многие страницы которой еще не поняты. Немало генов хламидий кодируют белки, функция и предназначение которых неизвестны. Геном хламидий содержит ортологи (эволюционно связанные кодирующие последовательности, имеющиеся у других видов), наличие которых позволяет по-новому взглянуть на биологию этих уникальных внутриклеточных бактерий. Рост и размножение хламидий внутри эукариотных клеток в течение длительного периода эволюции обусловили значительную филогенетическую обособленность этих микроорганизмов. Эволюция хламидий проходила по пути, отличному от свободноживущих зубактерий. С тех пор как они стали облигатными внутриклеточными паразитами, возможности обмена генами с другими бактериями путем горизонтального переноса стали весьма ограниченными. Разнообразие хламидийных белков и их отличие от аналогичных белков других микроорганизмов есть результат длительной внутренней эволюции. Изучение хламидий позволяет понять фундаментальные пути эволюции белковых макромолекул и, в частности ферментов. Поразительно, но у хламидий есть гены, весьма сходные с генами самых разнообразных организмов, таких как грамположительные и грамотрицательные бактерии, спирохеты, *Archaea* и даже животные и растения. В результате внутриклеточного паразитизма хламидии постепенно аккумулировали ряд генов, которые можно найти у эукариотных клеток, но не у бактерий. Сюда относятся гены животных и растений. Такое разнообразие генов свидетельствует о сложном пути эволюции хламидий, а анализ генома показывает, что в историческом плане хламидии не всегда были паразитами позвоночных. Можно предположить, что на ранних этапах эволюции предки хламидий были паразитами растений, хотя этот период был, вероятно, недолгим. Существует гипотеза, что вначале свободноживущие «протохламидии» стали взаимодействовать с одноклеточными организмами, постепенно приспособились к внутриклеточному существованию и «научились» использовать метаболизм хозяина для своих нужд (Amann et al., 1997; Stephens et al., 1998). Вполне возможно, что эволюция симбиозов одноклеточных в многоклеточные организмы шла параллельно с эволюцией хламидий.

#### 4.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА ХЛАМИДИЙ

Впервые генетический код был расшифрован у *C. trachomatis*, биовар *Trachoma*, штамм D/UW3/Cx и *C. pneumoniae* CWL029 (Stephens et al. 1998; Stephens, 1999). До того как выработать штамм для секвенирования, был определен профиль, образуемый фрагментами



хромосом нескольких штаммов *C. trachomatis* после разрезания ее рестрикционными эндонуклеазами. Было применено 25 эндонуклеаз. Профиль определялся с помощью диск-электрофореза в геле, в пульсирующем электромагнитном поле. Общий размер генома LGV-биовара и биовара Trachoma существенно не различался. Наблюдался полиморфизм профиля фрагментов ДНК двух биоваров после разрезания эндонуклеазами NotI, SgrAI и Sse8387I. Штамм D/UW3/Сх был выбран для секвенирования, поскольку он реагировал с антисыворотками на большинство урогенитальных изолятов *C. trachomatis*. Штамм *C. pneumoniae* CWL029 был предоставлен Американским музеем культур (American Type Culture Collection) Центров по контролю и профилактике заболеваний США (U.S. Centers for Disease Control and Prevention). ДНК выделили из очищенных хламидий и определили ее нуклеотидную последовательность. Последовательность была проверена с помощью сравнения предполагаемых сайтов эндонуклеазы BamHI с фрагментами, полученными при разрезании ДНК (полученной с помощью ПЦР). Последовательности, кодирующие белки, были определены с помощью идентификации открытых рамок считывания (ОРС) от начала до конца трансляции и путем поиска сходных последовательностей для известных белков. Было обнаружено, что штамм *C. trachomatis* V/TW5/OT имеет ДНК на 5-10 тысяч пар оснований меньше, чем другие штаммы, что объясняется делецией участка хромосомы. Эта делеция включает триптофановый оперон, вызывая характерное для данного штамма подавление роста гамма-интерфероном (Stephens, 1999).

Геном *C. trachomatis* включает 1 042 519 пар оснований в хромосомной ДНК и 7493 пары в плазмидной ДНК (Stephens et al. 1998). Геном *C. pneumoniae* включает 1 230 230 пар в хромосоме. У данного штамма плазида отсутствует (Kalman et al., 1999; Rockey et al., 2000). Место начала репликации хромосомы неясно, поскольку геном этих микроорганизмов содержит паралоги (эволюционно связанные кодирующие последовательности внутри вида) для *dnaA*, ни один из которых не является консервативным, как это часто имеет место у других бактерий. Не было обнаружено мест начала транскрипции, аналогичных имеющимся в других бактериальных геномах. С помощью компьютера было обнаружено схожее распределение оснований в ориентации транскрипции интенсивно транскрибируемых генов рибосомальных протеинов. Это позволило предположительно установить место начала репликации, локализованное примерно около 720000-ой пары нуклеотидов (Mitchell and Stephens, 1998). Невозможность идентификации с помощью статистического анализа генов хламидий, кодирующих те или иные белки, можно объяснить либо отсутствием у хламидий этих функций, либо тем, что эти последовательности недостаточно схожи с аналогичными последовательностями у других бактерий. Это вполне возможно, если учитывать филогенетическую обособленность хламидий от других эукариотов. Тем не менее сравнительный анализ последовательностей в геноме хламидий с известными последовательностями для других бактерий позволяет идентифицировать большинство генов, кодирующих соответствующие белки. На основе этой информации выдвигаются гипотезы о наличии определенных белков у хламидий и об их функции. Эти гипотезы подлежат прицельной экспериментальной проверке. Таблица 4.1 содержит информацию о генах и о предполагаемых кодируемых ими белках *C. trachomatis* в таком порядке, как они расположены в хромосоме. Геном *C. pneumoniae* очень близок к *C. trachomatis*.

Таблица 4.1.

Список генов, кодирующих белки *C. trachomatis*.Курсивом выделены гены, отсутствующие у *C. pneumoniae* (Stephens et al., 1998; Stephens, 1999)

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
1		гипотетический белок D001	39	dcd	деокситидин трифосфат деами-наза
2	gatC-Bs	Глю-тРНК-Глн-амидотрансфераза, малая субъединица	40	ruyB	Holliday-соединение ДНК
3	gatA-Bs	Глю-тРНК-Глн-амидотрансфераза, малая субъединица	41		гипотетический белок D041
4	gatB-Bs	Глю-тРНК-Глн-амидотрансфераза, большая субъединица	42	glgX	гликоген гидролаза
5		гипотетический белок D005	43		гипотетический белок D043
6		гипотетический белок D006	44	ssh	ssДНК-связующий белок
7		гипотетический белок D007	45	pepA	дейцил аминопептидаза
8	rnhB	рибонуклеаза III	46	het-B	гистоноподобный белок Het2
9	yfgA	HTH-регулятор транскрипции	47		гипотетический белок D047
10	htrB	ацилтрансфераза	48	yalL	SAM-зависимая метилтрансфераза
11		гипотетический белок D011	49		<i>гипотетический белок D049</i>
12	ybbP	белок гомолог	50		<i>гипотетический белок D050</i>
13	cydA	цитохром оксидаза, субъединица 1	51		<i>гипотетический белок D051</i>
14	cydB	цитохром оксидаза, субъединица 2	52	hemN	копропорфириноген оксидаза
15	phoH	АТФаза	53		гипотетический белок D053
16		гипотетический белок D016	54	sucA	Z-оксиглютарат дегидрогеназа E1
17		гипотетический белок D017	55	sucB	дигидролипоамид сукцинил-трансфераза
18		гипотетический белок D018	56		гипотетический белок D056
19	ileS	изолейцил тРНК синтетаз	57	gcpE	консервативный бактериальный белок
20	lepB	главная (сигнальная) пептидаза 1	58		гипотетический белок D058
21		гипотетический белок D021	59	(fcr)	ферредоксин
22	rl31	L31 рибосомальный белок	60	flhA	жгутиковый биосинтетический секреторный белок
23	prfA	фактор 1 высвобождения пептидных цепочек	61	fliA	РНК полимеразы сигма-28
24	hemK	A-специфичная ДНК метилаза	62	tyrS	тирозил-тРНК синтетаз
25	ffh	сигнальная распознавательная ГТФаза	63	gnd	б-фосфоглюконат дегидрогеназа
26	rs16	S16 рибосомальный белок	64	lepA	мембранный ГТФаза
27	trmD	тРНК (гуанин-N1) метилтрансфераза	65	(adt)	АДФ/АТФ транслоказа
28	rl19	L19 рибосомальный белок	66	ytgA Bs	гипотетический белок D066
29	rnhB	рибонуклеаза III	67		раствор-связующий белок
30	gmk	гуанилат киназа	68	ytgB Bs	АВС переносчик АТФаза
31		гипотетический белок D031	69	ytgC Bs	интегральный мембранный белок
32	metG	метионил-тРНК синтетаз	70	ytgD Bs	интегральный мембранный белок
33	recD	экзодоксирибонуклеаза V, альфа-субъединица, суперсемейство геликазы I	71	yaeM	гипотетический белок
34	ytff	катионный аминокислотный переносчик	72	yaeL	DHR-домен секретирующей металлопротеазы
35	(bpl)	биотин-белок лигаза	73		гипотетический белок D073
36		гипотетический белок D036	74	tecF	АТФаза суперсемейства АВС
37		<i>гипотетический белок D037</i>	75	DNAN	ДНК полимеразы III, субъединица «зажим»
38		гипотетический белок D038	76	smpB	консервативный бактериальный белок

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
77	yojL	гипотетический белок	120		<i>гипотетический белок D120</i>
78	folD	метилентетрагидроталат дегидрогеназа	121	araA	рибулезо-фосфат-3-эпимераза
79		гипотетический белок D079	122	efr	фактор элонгации Р
80	ltuB	CHLTR LtuB-белок	123	accB	биотин карбоксил-несущий белок
81		CHLTR T2-белок	124	accC	биотин карбоксилаза
82		гипотетический белок D082	125	rI13	L13 рибосомальный белок
83		гипотетический белок D083	126	rs9	S9 рибосомальный белок
84		фосфолипаза D суперсемейства HKD	127	ydhO	прогнозируемая гидролаза с повторяющимися остатками инвазина
85		гипотетический белок			аденилат киназа
86	rL28	L28 рибосомальный белок	128	adk	аденилат киназа
87	malQ	4-альфа-глюканотрансфераза	129	glnP	ABC аминокислотный связующий белок
88	sycE	SycE транслокационный белок			ABC аминокислотный переносчик АТФаза
89	lcrE	белок недостатка кальция E	130	glnQ	ABC аминокислотный переносчик АТФаза
90	lcrD	белок недостатка кальция D			гипотетический белок D131
91	yseU	YopU транслокационный белок	131		гипотетический белок D132
92	ychF	ГТФаза суперсемейства OGB	132		прогнозируемая рРНК метилаза
93	ribF	FAD синтаза	133		<i>гипотетический белок D134</i>
94	truB	тРНК псевдуридин 55 синтаза	134		<i>гипотетический белок D135</i>
95	rbfA	рибосом-связующий фактор А	135		прогнозируемая лизофосфолипаза (суперсемейства $\alpha/\beta$ гидролаз)
96	infB	инициальный фактор 2	136		белок суперсемейства SuA5
97	nusA	транскрипционный анти-терминальный фактор			дипептидаза
98	rs1	S1 рибосомальный белок	137	ywC	олигоэндопептид-связующий белок
99	trxB	тиоредоксин редуктаза	138		гипотетический белок
100	acpS	голо-(ацил-несущий белок) синтаза	139	oppA	препротеин транслоказа субъединица
101		гипотетический белок D101	140	ypdP	гипотетический белок D142
102		гипотетический белок D102	141	secA	гипотетический белок D143
103		гидролаза HAD суперсемейства			гипотетический белок D144
104	fab1	еноил-(ацил-несущий белок) редуктаза предшественника (NADH)	142		серин/треонин протеин-киназа
105		гипотетический белок D105	143	(pkn 1)	NAD-зависимая ДНК лигаза
106	yseC	прогнозируемая псевдоуридин синтаза	144	dnlJ	гипотетический белок D147
107	mutY	A/G-специфичная аденин гликозилаза	145		FAD-зависимая монооксигеназа
108	ybgI	гипотетический белок	146	(mhp)	прогнозируемая гидролаза (суперсемейства $\alpha/\beta$ -fold)
109		CHLPS гипотетический белок	147		рибосомальный белок L33
110	groEL	белок теплового шока-60 чаперонин	148	rI33	гипотетический белок
111	groES	белок теплового шока-10 чаперонин	149	yeiW	ABC переносчик АТФаза
112	pepF	олигоэндопептидаза	150	yeiV	гипотетический белок D153
113	clpB	Clp протеаза АТФаза/чапероза	151		<i>фосфолипаза D суперсемейства HKD</i>
114		гипотетический белок D114	152		<i>фосфолипаза D суперсемейства HKD</i>
115		<i>гипотетический белок D115</i>	153		<i>гипотетический белок CT155</i>
116		<i>гипотетический белок D116</i>	154		<i>фосфолипаза D суперсемейства HKD</i>
117		<i>гипотетический белок D117</i>	155		<i>фосфолипаза D суперсемейства HKD</i>
118		<i>гипотетический белок D118</i>	156		<i>фосфолипаза D суперсемейства HKD</i>
119	incA	CHLPS-белок А мембраны включения	157		<i>гипотетический белок D159</i>
			158		
			159		

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
160		гипотетический белок D160	205	pfkA	пиродифосфат-фруктоза-6-фосфат-1-фосфотрансфераза
161		гипотетический белок D161			
162		гипотетический белок D162	206		прогнозируемая ацилтрансфераза (альфа/бета-гидролаза)
163		гипотетический белок D163			
164		гипотетический белок D164	207	pfkA	пиродифосфат-фруктоза-6-фосфат-1-фосфотрансфераза
165		гипотетический белок D165			
166		гипотетический белок D166	208	gseA	трансфераза 3-деокси-D-манно-2-окулозонной кислоты (Kdo)
167		гипотетический белок D167			
168		гипотетический белок D168			
169	trpR	HTH Трp-оперон регулятор	209	leuS	лейцил-tРНК синтетаза
170	trpB	триптофан синтаза, бета-цепь	210	hemL	глутамат-1-полуальдегид 2,1-аминомутаза
171	trpA	триптофан синтаза, альфа-цепь	211	yqgE	гипотетический белок
172		гипотетический белок D172	212	yqde	гипотетический белок
173		гипотетический белок D173	213	gpiA	рибозо-5-фосфатизомераза А
174		гипотетический белок D174	214		гипотетический белок D214
175	oppA	олигопептид-связующий белок	215	dhnA	прогнозируемая альдолаза
176	dsbB	оксидоредуктаза дисульфидных мостиков	216	xasA	аминокислотный (глутамат) переносчик
177	dsbG	чаперонин дисульфидных мостиков	217	ydaO	АТФаза суперсемейства РР-цикл
178		гипотетический белок D178	218	surE	кислая фосфатаза
179		гипотетический белок D179	219	ubiA	4-гидроксibenзоат октафенилтрансфераза
180	tauB	АВС переносчик АТФаза	220	ubiX	декарбоксилаза фениакриловой кислоты
181		гипотетический белок D181			
182	kdsB	синтетаза СМР-2-кето-3-деоксиокулонозной кислоты	221		гипотетический белок
183	pyrG	СТР синтетаза	222		CHLTR гипотетический белок
184	yqgF	гипотетический белок	223		гипотетический белок D223
185	zwf	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	224		гипотетический белок D224
186	(DevB)	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (семейства DevB)	225		гипотетический белок D225
187	dnaX	ДНК полимеразы, III субъединица гамма-и тау (неактивная)	226		гипотетический белок D226
188	tdk	тимидилат киназа	227		гипотетический белок D227
189	gyrA	ДНК гираза, субъединица А	228		гипотетический белок D228
190	gyrB	ДНК гираза, субъединица В	229		гипотетический белок D229
191		гипотетический белок D191	230		нейтральный аминокислотный (глутамат) переносчик
192		гипотетический белок D192	231		натрий-зависимый аминокислотный переносчик
193	tgt	гуенин tРНК рибозилтрансфераза	232	incB	CHLPS-белок мембраны включения
194	mgfE	переносчик Mg <sup>++</sup> с GBS-домейнами	233	incC	CHLPS-белок мембраны включения
195		гипотетический белок D195	234		гипотетический белок D234
196		гипотетический белок D196	235		cAMP-связующий белок
197	(gcp)	0-синалогликопротеин эндолептидаза	236	acpP	ацил-несущий белок
198	oppA	олигопептид-связующий белок	237	fabG	3-оксоацил-(ацил-несущий белок) редуктаза
199	oppB	олигопептид пермеаза белок	238	fabD	малонил coA-(ацил-несущий белок) трансацетилаза
200	oppC	олигопептид пермеаза белок	239	fabH	3-оксоацил-(ацил-несущий белок) синтаза III
201	oppD	олигопептид транспорт АТФаза	240	recR	S4 цинк «пальцевый» белок
202	oppF	олигопептид транспорт АТФаза	241	yaeT	белок наружной мембраны
203		гипотетический белок D203	242		гипотетический белок D242
204	ybhI	дикарбоксилат переносчик			



Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
243	lpxD	UDP-3-О-(3-гидроксимиристоил) глюкозамин N-ацилтрансфераза	280	(nqr4)	NADH-убихинон оксидоредуктаза, субъединица 4
244		гипотетический белок D244	281	(nqr5)	NADH-убихинон оксидоредуктаза, субъединица 5
245	pdhA-Bs	пируватдегидрогеназа E1 альфа	282	gcsH	глицин-расщепляющий системный белок
246	pdhB-Bs	пируватдегидрогеназа E1 бета	283		гипотетический белок D283
247	pdhC-Bs	дигидролипоамид ацетилтрансфераза	284		фосфолипаза D суперсемейства HKD
248	glgP	гликоген фосфорилаза	285	lplA	липоат-белок лигаза
249		гипотетический белок D249	286	clpC	Clp протеаза АТФаза/чаперон
250	dnaA	копия иницирующий АТФаза	287	ycbF	АТФаза суперсемейства PP-цикл
251		60kD внутренний мембранный белок	288		гипотетический белок D288
252	lgt	пролипопротеин диацилглицерил трансфераза	289		гипотетический белок D289
253		гипотетический белок D253	290	(ptsN)	PtsN-белок (азотный регулятор IIA, слитый с НТН доменом)
254		гипотетический белок	291	ptsN	белок регулятор азота IIA
255		гипотетический белок	292	dut	диоксиридин 5'-трифосфат нуклеотидогидролаза
256		CBS домен	293	accD	ацетил-СоА карбоксилазы карбоксилтрансфераза, бета-субъединица
257	yph()	NiFS-связанный пиридоксал фосфат-зависимый фермент	294	(sodM)	супероксиддисмутаза(Mn)
258		протенин фосфатаза семейства PP2C	295	yhxB-Bs	фосфоманномутаза
259		гипотетический белок D260	296		гипотетический белок D296
260	dnaQ	ДНК полимеразы III, эпсилон-цепь -3'-5' экзонуклеаза	297	rnc	рибонуклеаза III
261		гипотетический белок D262	298	sms	АТФаза, прогнозируемая АТФ-зависимая протеаза
262		гипотетический белок D263	299	hemC	порфириноген деаминаза
263	msbA	АВС переносчик АТФаза	300		гипотетический белок D300
264	accA	ацетил-СоА карбоксилаза карбоксилтрансфераза, альфа-субъединица	301	(pknD)	серин/треонин протеин киназа
265		гипотетический белок D266	302	valS	валил-тРНК синтетаза
266		интегрированный фактор хозяина	303		гипотетический белок D303
267	himD	N-ацетилмурамоил L-аланин амидаза	304	atpK	V-тип АТФ синтаза, субъединица K
268	amiA	UDP-N-ацетилмурамоил Ala-D-Glu-2,6-диаминопимелат лигаза	305	atpI	V-тип АТФ синтаза, субъединица I
269	murE	пенициллин-связующий белок	306	atpD	V-тип АТФ синтаза, субъединица D
270	pbp	транслюколаза/транспептидаза	307	atpB	V-тип АТФ синтаза, субъединица B
271		гипотетический белок D271	308	atpA	V-тип АТФ синтаза, субъединица A
272	yabC	метилтрансфераза (семейства PBP2B)	309		гипотетический белок D309
273		гипотетический белок D273	310	atpE	АТФ синтаза V-типа, субъединица E
274		гипотетический белок D274	311		гипотетический белок D311
275	unaA	АТФаза инициации репликации	312	(fer)	прогнозируемый ферредоксин
276		гипотетический белок D276	313	tal	трансальдолаза
277		гипотетический белок D277	314	rpoC	РНК полимеразы, бета-цепь
278	(nqr2)	NADH-убихинон оксидоредуктаза, субъединица 2	315	rpoB	РНК полимеразы, бета-цепь
279	(nqr3)	NADH-убихинон оксидоредуктаза, субъединица 3	316	rI7	L7/L12 рибосомальный белок
			317	rI10	L10 рибосомальный белок

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
318	rl1	L1 рибосомальный белок	363	asd	аспартат-сероальдегид дегидрогеназа
319	rl11	L11 рибосомальный белок	364	dapB	дигидродипиколинат редуктаза
320	nusG	транскрипционный антитерминальный фактор	365		гипотетический белок D365
321	secE	пребелок транслоказа субъединица	366	aroA	3-фосфошикимат 1-карбоксивинилтрансфераза
322	tufA/B	фактор элонгации TU	367	aroL	шикимат киназа II
323	infA	иницирующий фактор 1	368	aroC	хорисомат синтаза
324		гипотетический белок D324	369	aroB	3-дегидрокинат синтаза
325		гипотетический белок	370	aroE	шикимат 5-дегидрогеназа
326		гипотетический белок D326	371		гипотетический белок D371
327	trpC	<i>N</i> -(5'-фосфорибозил) антранилат изомераза	372		гипотетический белок D372
328	triA	триозофосфатизомераза	373		гипотетический белок D373
329	xseA	экзодоксирибонуклеаза VII	374	arcD	аргинин/орнитин антипортёр
330		гипотетический белок D330	375		прогнозируемая d-аминокислотная дегидрогеназа
331	dxs	транскетолаза	376	mdh	малат дегидрогеназа
332	pykF	пируваткиназа	377	ltuA	CHLTR LruA
333	uvrA	АТФаза суперсемейства ABC	378	pgi	глюкозо 6-фосфатизомераза
334	dnaX	ДНК полимеразы III, субъединица гамма-и тау-АТФаза	379	hflX	АТФаза суперсемейства OGB
335	yhaB	гипотетический белок	380	phnP	железо-зависимая гидролаза
336	ptsI	фосфоенолпируват-белок фосфотрансфераза	381	artG	аргинин-связующий белок
337	ptsH	фосфонесущий белок Hpr	382	aroG	фосфо-2-дегидро-3-деоксигептонат альдолаза
338		гипотетический белок D338	383		гипотетический белок D383
339		гипотетический белок D339	384		гипотетический белок D384
340	pdhA/B-Bs	пируватдегидрогеназа (альфа-и бета-синтез)	385	yeff	прогнозируемая гидролаза семейства HIT
341	dnaJ	кофактор белка теплового шока-70	386		предполагаемая железо-зависимая гидролаза
342	rs21	S21 рибосомальный белок	387		гипотетический белок D387
343		O-сиалогликопротеин эндопептидаза (неактивная)	388		гипотетический белок D388
344	lon	АТФ-зависимая серин протеаза	389		гипотетический белок D389
345		гипотетический белок D345	390	aspC	аспартат аминотрансфераза
346	elaC	арил-сульфат сульфогидролаза/гликосульфатаза	391		гипотетический белок D391
347	xerC/D	интеграза/рекомбиназа	392	yprS	CHLTR гипотетический белок YprS
348	yijK	ABC переносчик АТФаза	393	proS	пролил-тРНК синтетаза
349	maf	гипотетический белок	394	hrcA-Bs	HTH регулятор транскрипции
350		гипотетический белок D350	395	grpE	кофактор
351		гипотетический белок D351	396	dnaK	чаперонин белка теплового шока-70
352		гипотетический белок D352	397	yacB	рибонуклеаза, содержащая домен S1
353	def	полипептид деформилаза	398		гипотетический белок
354	ksgA	диметиладенозин трансфераза	399	yrbH	прогнозируемая фосфатизомераза сахаров
355		гипотетический белок D355	400	sucB	дигидролипоамид сукцинилтрансфераза E2
356	yyaL	гипотетический белок	401	glT-Bs	протон/натрий глутамат симпорт-белок
357		гипотетический белок D357	402	ycaH	АТФаза
358		гипотетический белок D358	403	yifH	pРНК метилаза семейства SpoU
359		гипотетический белок			
360		гипотетический белок D360			
361	dapA	дигидродипиколинат синтаза			
362	lysC	аспартокиназа			

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
404		прогнозируемая SAM-зависимая метилтрансфераза	444	omeA	15 kDa kDa богатый цистеином комплексный липопротеин наружной мембраны
405	ribC	рибофлавин синтаза			
406	yhaD	гипотетический белок	445	gltX	глутамил-тРНК синтаза
407	ksaA	ДНК-супрессорный белок	446	euo	CHLPS Euo белок-гомолог экзонуклеаза суперсемейства DHH
408	lspA	липопротеин сигнальная пептидаза II	447	recJ	мембранные белки транспорта
409		аминокислотная пермеаза	448	secD&secF	протеинов SecD и SecF
410	pep B	полиА полимеразы			
411	lpxB	липид А дисахарид синтаза	449		гипотетический белок D449
412	pmpA	предполагаемый белок А наружной мембраны	450	yaeS	гипотетический белок
413	pmpB	предполагаемый белок В наружной мембраны	451	cdsA	фосфатидат цитидилтрансфераза
414	pmpC	предполагаемый белок С наружной мембраны	452	cmk	цитидилат киназа
415	yebL	раствор-связующий белок	453	plsC	1-ацил-sn-глицерол-3-фосфатацилтрансфераза
416		ABC переносчик АТФаза	454	argS	аргинил-тРНК-синтаза
417		ABC переносчик, мембранный компонент	455	murA	UDP-N-ацетилглюкозамин 1-карбоксивинилтрансфераза
418	yhbZ	ГТФаза суперсемейства OGB	456		гипотетический белок D456
419	rlt27	L27 рибосомальный белок	457	yebC	гипотетический белок
420	rlt21	L21 рибосомальный белок	458	yhhY	аминогруппа ацетилтрансфераза
421		гипотетический белок D421	459	prfB	фактор 2 высвобождения пептидной цепи
422		прогнозируемый железозермент	460		SWIB (YM74) белок
423		CBS-домен	461	yaeI	кальциеврин-фосфогидролаза
424	rsbV-Bs	анти-сигма фактор	462	ygbP	сахар-нуклеотид пирофосфорилаза
425		гипотетический белок D425	463	truA	тРНК псевдоурдилат синтаза
426		Fe-S кластер-содержащая оксидоредуктаза	464		фосфогликолат фосфатаза (суперсемейства HAD)
427		гипотетический белок	465		гипотетический белок D465
428	ubiE	возможная убихинон метилтрансфераза	466		гипотетический белок D466
429		гипотетический белок D429	467	atoS	2-компонент регуляторной системно-сенсорной гистидин киназы
430	dapF	диаминопимелат эписмераза	468	atoC	2-компонент сигма-54 взаимодействующего регулятора
431	clpP	АТФ-зависимая протеаза, каталитическая субъединица	469		гипотетический белок D469
432	glyA	серин гидроксиметилтрансфераза	470		гипотетический белок D470
433		гипотетический белок D433	471		гипотетический белок D471
434	yghB	гипотетический белок	472	yagE	гипотетический белок
435	cysJ	сульфит редуктаза	473	yidD	гипотетический белок
436	rs10	S10 рибосомальный белок	474		гипотетический белок D474
437	fusA	фактор элонгации G	475	pheT	фенилаланил-тРНК синтаза, бета-цепь
438	rs7	S7 рибосомальный белок	476		гипотетический белок D476
439	rs12	S12 рибосомальный белок	477	ada	метилованная ДНК протеин-цистеин метилтрансфераза
440		гипотетический белок D440	478	oppC	олигопептид пермеаза протеаза
441	tsp	tail-специфичная DHR-домен-протеаза	479	oppB	олигопептид пермеаза протеаза
442	crpA	15kDa цистеин-богатый белок	480	dppA	дипептид-связующий липопротеин
443	omeB	60 kDa богатый цистеином комплексный белок наружной мембраны	481		гипотетический белок D481
			482		гипотетический белок D482

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
483		гипотетический белок D483	527	rl4	L4 рибосомальный белок
484		гипотетический белок D484	528	rl3	L3 рибосомальный белок
485	hemZ	феррохелатаза	529		гипотетический белок D504
486	iliY	глутамин-связующий белок	530	fmt	метионил-тРНК формилтрансфераза
487	yhhF	метилаза семейства YhhF	531	lpxA	ацил-(ацил-несущий белок) UDP-GlcNAc о-ацилтрансфераза (3R)-гидроксимиристоил-(ацил-несущий белок) дегидролаза
488		гипотетический белок D488	532	fabZ	UDP-3-0-(3-гидроксимиристоил) GleN Ac деацетилаза
489	glgC	глюкозо-1-фосфатаденилилтрансфераза	533	lpxC	аропопротеин N-ацилтрансфераза
490		гипотетический белок D490	534	cutE	ацил-CoA тиоэстераза
491	rho	транскрипция терминальный фактор РНК геликаза	535	yciA	ДНК полимеразы III, эpsilon-цепь -3'-5' экзонуклеаза
492	yacE	прогнозируемая АТФаза или киназа	536	DNAQ	прогнозируемая АТФаза или киназа
493	polA	ДНК полимеразы I	537	yjeE	гипотетический белок D538
494	sohB	мембранный-связанный серин протеаза	538		тиоредоксин
495	(adt)	АДФ/АТФ транслоказа	539	trxA	SpoU family рРНК метилаза
496	pgsA	CDP-диацилглицерол-глицерол-3-фосфат3-фосфатидилтрансфераза	540	yibK	пептидил-пролил цис-транс изомераза FKBP-типа
497	DNAB	репликативная ДНК геликаза	541	mip	аспартил-тРНК синтетазы
498	gidA	FAD-зависимая оксидоредуктаза	542	aspS	гистидил-тРНК синтетазы
499	lplA	липоат белок лигазы	543	hisS	гексозофосфат-переносчик
500	ndk	нуклеозид дифосфаткиназа (NDK)	544	uhpC	ДНК полимеразы III, каталитическая субъединица
501	ruvA	ДНК геликаза Holliday-соединения	545	DNAE	гипотетический белок D546
502	ruvC	эндонуклеаза Holliday-соединения	546		гипотетический белок D547
503		гипотетический белок D503	547		гипотетический белок D548
504		гипотетический белок D504	548		серин-фосфорилирующая гистидинкиназа
505	garA	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа	549	rsbW-Bs	гипотетический белок D550
506	rl17	L17 рибосомальный белок	550		пенициллин-связующий белок
507	rpoA	РНК полимеразы альфа-цепь	551	dacC	5-карбокисептидаза
508	rs11	S11 рибосомальный белок	552		гипотетический белок D552
509	rs13	S13 рибосомальный белок	553	fmu	прогнозируемая рРНК метилаза
510	secY	SecY транслоказа субъединица	554	bmQ	аминокислот-транспортнесущий белок боковых цепей
511	rl15	L15 рибосомальный белок	555		геликаза семейства SWI/SNF
512	rs5	S5 рибосомальный белок	556		гипотетический белок D556
513	rl18	L18 рибосомальный белок	557	lpdA	липоамид дегидрогеназа
514	rl16	L16 рибосомальный белок	558	lipA	липидная кислая синтетазы
515	rs8	S8 рибосомальный белок	559	yscJ	YopI транслокационный белок
516	rl5	L5 рибосомальный белок	560		гипотетический белок D560
517	rl24	L24 рибосомальный белок	561	yscL	YopL транслокационный белок
518	rl14	R14 рибосомальный белок	562	yscR	YopR транслокационный белок
519	rs17	S17 рибосомальный белок	563	yscS	YopS/FltQ транслокационный белок
520	rl29	L29 рибосомальный белок	564	yscT	YopT транслокационный белок
521	rl16	L16 рибосомальный белок	565		гипотетический белок D565
522	rs3	S3 рибосомальный белок	566		гипотетический белок D566
523	rl22	L22 рибосомальный белок			
524	rs19	S19 рибосомальный белок			
525	rl2	L2 рибосомальный белок			
526	rl23	L23 рибосомальный белок			



Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
567		гипотетический белок D567	608	urvD	геликаза суперсемейства I
568		гипотетический белок D568	609	rhoN	РНК полимеразы сигма-54
569		гипотетический белок D569	610		гипотетический белок D610
570	gspF	белок F общего секретирующего пути	611		гипотетический белок
571	gspE	АТФаза общего секретирующего пути	612	folA	дигидрофолат редуктаза
572	gspD	общий секретирующий белок/белок сборки фимбрий	613	folP	дегидроптероат синтаза
573		гипотетический белок D573	614	folX	дегидронеоптерин альдозаза
574	pepP	X-Р-аминопептидаза	615	rhoD	РНК полимеразы сигма-70 (CHLTR сигма-66)
575	mutL	прогнозируемая АТФаза ДНК-репарирующего белка	616		гипотетический белок D616
576	lerH	белок Н низкого содержания кальция	617	rs20	рибосомальный белок S20
577		гипотетический белок D577	618		<i>гипотетический белок D618</i>
578		гипотетический белок D578	619		гипотетический белок D619
579		гипотетический белок D579	620		гипотетический белок D620
580		гипотетический белок D580	621		гипотетический белок D621
581	thrS	треонил-тРНК синтаза	622		гомолог белка CHLPN 76 kD
582	minD	АТФаза разделения хромосомы	623		гомолог белка CHLPN 76 kD
583	gp6D	гомолог GP6D белка CHLTR плазмиды	624	mviN	интегральный мембранный белок MviN
584		гипотетический белок D584	625	nfo	эндонуклеаза IV - A/G-специфичная гликозилаза
585	trpS	триптофанил-тРНК синтаза	626	rs4	S4 рибосомальный белок
586	uvrB	геликаза суперсемейства II	627	yceA	гипотетический белок
587	eno	эндолаза	628	ispA	геранилгеранил пирофосфат-синтаза
588	rsbU-Bs	PP2C фосфатаза - rsbW-антагонист	629	glmU	UDP-N-ацетилглюкозаминпирофосфориллаза
589		гипотетический белок D589	630	cxpR	HTH-регулятор, соединенный с 2-х компонентным receiver-доменом
590		гипотетический белок D590	631		гипотетический белок D631
591	sdhB	сукцинат дегидрогеназа железо-сернистого белка	632		гипотетический белок D632
592	sdhA	сукцинат дегидрогеназа флавопротеин	633	hemB	дегидратаза дельта-аминолевулиной кислоты
593	sdhC	сукцинат дегидрогеназа цитохром субъединица	634	(nqr)	NADH-убихинон оксидоредуктаза, альфа-цепь
594	yefH	гидролаза суперсемейства PHP	635		гипотетический белок D635
595	dsbD	тиол : дисульфид взаимозаменяющий белок	636	gre A	фактор транскрипции и элонгации GreA
596	exbB	переносчик полисахаридов	637	tyrB	ароматическая аминокислая аминотрансфераза
597	exbD	переносчик полисахаридов	638		гипотетический белок D638
598		гипотетический белок D598	639	rec B	экзодеоксирибонуклеаза V суперсемейства I геликаз, бета-субъединица
599	tolB	переносчик полисахаридов	640	recC	экзодеоксирибонуклеаза V, гамма-субъединица
600	pal	пептидогликан-связанный липопротеин	641	ygeD	большой переносчик-facilitator
601	papQ-Bs	фосфатаза семейства инвазивное	642		гипотетический белок D642
602		гипотетический белок D602	643	topA	ДНК топоизомераза I, связанная с SWIB-доменом
603	(tsa)	тиол-специфичная антиоксидантная пероксидаза	644	yohl	прогнозируемая оксидоредуктаза
604	groEL	белок теплового шока-60	645		гипотетический белок
605	ybbC-Bs	гипотетический белок			
606	yggV	гипотетический белок			
607	unq	урацил-ДНК гликозилаза			

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
646		гипотетический белок D646	689	dppF	АТФаза транспорта дипептидов
647		гипотетический белок D647	690	dppD	АТФаза транспорта дипептидов
648		гипотетический белок D648	691	ygo3	гипотетический белок
649	ygfA	метенил-ТНФ синтетаза	692		переносчик фосфата
650	recA	рекомбинационная АТФаза	693	pgk	фосфолицерат киназа
651		гипотетический белок D651	694		гипотетический белок D694
652	recD	экзодеоксирибонуклеаза V, альфа-субъединица - суперсемейства I геликаз	695		гипотетический белок D695
			696		гипотетический белок D696
			697	nth	эндонуклеаза III, A/G-специфичная гликозилаза
653	yhbG	АВС переносчик АТФаза	698	thdF	прогнозируемая ГТФаза
654		гипотетический белок D654	699	psd	фосфатидилсерин декарбоксилаза
655	kdsA	3-деокси-D-манно-оулозонат-8-фосфатсинтетаза	700		гипотетический белок D700
656		гипотетический белок D656	701	secA	транслоказа, препротейновая субъединица
657		гипотетический белок D657	702		гипотетический белок D702
658	sfhB	прогнозируемая псевдоурдинсинтаза	703	yphC-Bs	прогнозируемая ГТФаза/GTP-связующий белок
659		гипотетический белок	704	penB	полиА полимеразы
660	girA	ДНК гиразы субъединица А	705	clpX	Clp протеаза, субъединица АТФазы
661	girB	ДНК гиразы субъединица В	706	clpP	АТФ-зависимая протеаза, каталитическая субъединица
662	hemA	глутамил-тРНК редуктаза	707	tig	запускающий фактор пептидил-пролил цис-транс изомеразы
663		гипотетический белок D663	708		геликаза семейства SWI/SNF
664		FHA-домен-содержащий белок	709	mreB	АТФаза суперсемейства HSP-70/actin
665		гипотетический белок D665	710	pckA	фосфоенолпируват карбоксикиназа
666		гипотетический белок D666	711		гипотетический белок D711
667		гипотетический белок D667	712		гипотетический белок D712
668		гипотетический белок D668	713	ompB	белок В наружной мембраны
669	yseN	АТФаза транслокации белка YopN	714	gpdA	глицерол-3-фосфат дегидрогеназа
670		гипотетический белок D670	715		UDP глюкозо-пирофосфорилаза
671		гипотетический белок D671	716		гипотетический белок D716
672	fliN	жгутиковый motor-switch-домен	717	flil	жгутико-специфичная АТФ синтаза
673	(pkn5)	серин/треонин белок киназа	718		гипотетический белок D718
674	yseC	YopC транслокационный белок	719	fliF	жгутиковый M-кольцевидный белок
675	karG	аргинин киназа (гомолог)	720	(nifU)	NifU-связанный белок
676		гипотетический белок D676	721	yfhO	NifS-связанный пиридоксалфосфат-зависимый фермент
677	frr	рибосом-освобождающий фактор	722	pgm	фосфолицерат мутаза
678	pyrH	уридин монофосфаткиназа	723	yjbC	прогнозируемая псевдоурдинсинтаза
679	tsf	фактор элонгации TS	724		гипотетический белок D724
680	rs2	S2 рибосомальный белок	725	birA	биотин-(ацетил-соА-карбоксилаза) синтетаза
681	ompA	главный белок наружной мембраны	726	rodA	rod share-детерминирующий белок
682	pbpB	пенициллин-связующий белок трансглюколаза/транспептидаза			
683		TPR-повторный белок			
684		АВС переносчик, субъединица-YCF24 (гомолог)			
685		АТФаза АВС переносчика			
686		АВС переносчик, субъединица YCF24 (гомолог)			
687	yfh()	NifS-связанный пиридоксалфосфат-зависимый фермент			
688	par B	белок разделения хромосомы			

Продолжение таблицы 4.1.

Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
727	zntA	АТФаза транспорта тяжелых металлов, Р-тип	766	niaA	тРНК изопентенилпирофосфат трансфераза
728		гипотетический белок D728	767		гипотетический белок D767
729	serS	серил-тРНК синтетеза	768		гипотетический белок D768
730	ribD	рибофлавин-специфичная деаминаза	769	ybeB	белок суперсемейства lojар
731	ribA/B	GTP-циклогидролаза/DHBP синтаза	770	fabF	3-оксоацил-(ацил-несущий-белок)-синтаза 1
732	ribE	6,7-диметил-8-рибетилломазин синтаза	771		Fe-S кластер-содержащая оксидоредуктаза
733		гипотетический белок D733	772	ppa	прогнозируемая пирофосфорилаза (суперсемейства MutT)
734		гипотетический белок D734	773	ldh-Bs	неорганическая пирофосфатаза
735		аминокислотный пермеаза	774	cysQ	лейциндегидрогеназа
736	ybeL	фосфатидилэтаноламин-связующий белок	775		прогнозируемая бифосфат-фосфатаза
737		белок SET-домена	776	aas	l-ацил-sn-глицерол-3-фосфата-цилтрансфераза
738	yycJ-Bs	металл-зависимая гидролаза	777	bio-F	2-ацилглицеро-фосфо-этаноламин ацилтрансфераза
739	ftsK	ДНК изолированный АТФаза	778	priA	8-амино-7-оксоноаноат синтаза
740	(nqr6)	NADH-убихиноноксидоредуктаза, компонент фенолгидролазы	779		примосомальная геликаза
741		<i>гипотетический белок D741</i>	780		гипотетический белок D779
742	ygcA	рРНК метилтрансфераза	781	lysS	изомераза дисульфидных мостиков
743	hetA	гистоноподобный белок Het1	782	cysS	лизил-тРНК синтетеза
744		CHLTR фосфопротеин	783		цистеинил-тРНК синтетеза
745	hemG	протопорфириноген-оксидаза	784	grpA	прогнозируемая изомераза дисульфидных мостиков (неактивная)
746	hemN	копропорфириноген-оксидаза	785		рибонуклеаза Р, белковый компонент
747	hemE	уропорфириноген-декарбоксилаза	786	rl34	рибосомальный белок L34
748	mfd	репаративная геликаза	787	rl36	рибосомальный белок L36
749	alaS	аланил-тРНК синтетеза	788	rs14	рибосомальный белок S14
750	tkkB	транскетолаза	789		гипотетический белок D788
751	amn	АМР нуклеозидаза	790		<i>гипотетический белок D789</i>
752	efp	фактор элонгации Р	791	uvrC	гипотетический белок D790
753		<i>гипотетический белок D753</i>	792	mutS	субъединица эксинуклеазы
754	ice	кальциневриновая фосфогидролаза	793		АТФаза ДНК репаративного белка
755		чаперонин белка теплового шока- (гомолог)	794	DNAG	<i>гипотетический белок D793</i>
756	murF	UDP-N-ацетилмурамоилаланил-D-глутамил-2, 6-диаминолигаза	795		ДНК примаза
757	mraY	фосфо-N-ацетилмураоил-пентапептид трансфераза	796	glyQ	гипотетический белок D795
758	murD	UDP-N-ацетилмурамоилаланил-D-глутамат лигаза	797	pgsA	глицил-тРНК синтетеза
759	nlpD	мурамидаза, инвазивный-тип	798	glgA	CDP-диацилглицерол-глицерол-3-фосфат3-фосфатидилтрансфераза
760	ftsW	белок деления клетки FtsW	799	cte	гликоген-синтаза
761	murG	UDP-GlcNAc-N-ацетилмурамил-пирофосфорил-анддекапринол-GlcNAc-трансфераза	800	pth	белок общего стресса
762	murC iddIA	UDP-N-ацетилмурамат-аланин-лигаза и D-Ala-DAla лигаза	801	rs6	пептидил-тРНК гидролаза
763		гипотетический белок	802	rs18	рибосомальный белок S6
764		гипотетический белок D764	803	rl9	рибосомальный белок S18
765	rshV-Bs	анти-сигма фактор	804	ychB	рибосомальный белок L9
					прогнозируемая гомосерин-киназа

Продолжение таблицы 4.1.

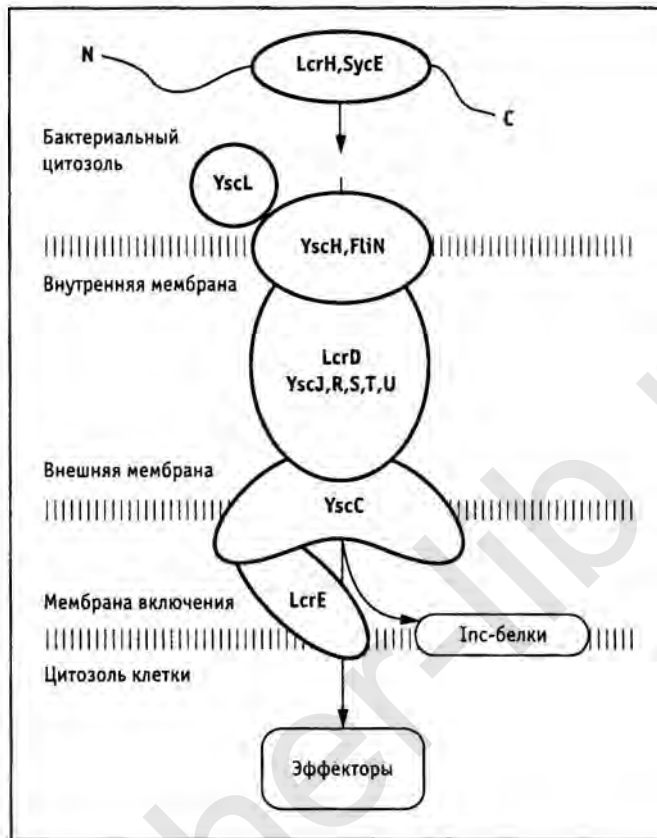
Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)	Порядковый номер гена	Название гена (если имеется)	Кодируемый белок (известный или предполагаемый)
805		гипотетический белок D805	839		гипотетический белок D839
806	ptr	инсулиназа семейства металлопротеаз	840	mesJ	АТФаза суперсемейства РР-цикл
807		глицерол-3-фосфатацилтрансфераза	841	ftsH	АТФ-зависимая цинкпротеаза
808	cafA	осевой филимент-связанный белок	842	ppp	полирибонуклеотид фосфорилаза
809		гипотетический белок D809	843	rs15	рибосомальный белок S15
810	rl32	рибосомальный белок L32	844	yfhC	цитозин деаминаза
811	plsX	неохарактеризованный белок синтеза FA/фосфолипидов	845		гипотетический белок D845
812	pmpD	белок наружной мембраны D	846		гипотетический белок D846
813		гипотетический белок D813	847		гипотетический белок D847
814		гипотетический белок D814	848		гипотетический белок D848
815	mrsA	фосфогликомутаза	849		гипотетический белок D849
816	glmS	глюкозамин-фруктозо-6-фосфатаминотрансфераза	850		гипотетический белок D850
817	tyrP	тирозин переносчик	851	map	метионин аминоклотидаза
818	tyrP	тирозин переносчик	852	yhgN	гипотетический белок
819	yceA	прогнозируемая пермеаза	853		гипотетический белок D853
820	ftsY	ГТФаза сигнального распознавательного рецептора	854		ABC переносчик, соединенный с пириимидином биосинтетическим ферментом
821	sucC	сукцинил-СоА синтетазы, бета-цель	855	fumC	фумарат дегидратаза класс II
822	sucD	сукцинил-СоА синтетазы, альфа-цель	856	yehM	сульфат пермеаза
823	htrA	мембранно-связанная серин-протеаза	857		гипотетический белок D857
824		инсулиназа семейства металлопротеаз	858		протеаза содержащий IRBP-и DHR-домен
825	yigN	гипотетический белок	859	lytB	металлопротеаза
826	pssA	CDP-диацилглицерол-глицерол-серин O-фосфатидилтрансфераза	860		гипотетический белок D860
827	nrdA	рибонуклеазид-дифосфатредуктаза, альфа-цель	861	lcrH	гипотетический белок D861
828	nrdB	рибонуклеазид-дифосфатредуктаза, бета-цель	862		белок H, реагирующий на недостаток кальция
829	yggH	прогнозируемая тРНК метилаза	863		гипотетический белок D863
830	ytqB-Bs	прогнозируемая тРНК метилаза	864	xerC/D	интеграза/рекомбиназа
831	murB	UDP-N-ацетиленолпирувоил-глюкозамин редуктаза	865		гипотетический белок D865
832		гипотетический белок D832	866	glgB	1,4 альфа-гликан ветвь фермент
833	infC	иницирующий фактор 3	867		<i>тиол-протеаза аденовирусного типа</i>
834	rl35	рибосомальный белок L35	868		<i>тиол-протеаза аденовирусного типа</i>
835	rl20	рибосомальный белок L20	869	pmpE	предполагаемый белок E наружной мембраны
836	pheS	фенилаланил-тРНК синтетазы альфа-цель	870	pmpF	предполагаемый белок F наружной мембраны
837		гипотетический белок D837	871	pmpG	предполагаемый белок G наружной мембраны
838		гипотетический белок D838	872	pmpH	предполагаемый белок H наружной мембраны
			873		<i>гипотетический белок D873</i>
			874	pmpI	предполагаемый белок I наружной мембраны
			875		<i>гипотетический белок D875</i>



В табл. 4.1 показаны гены, отсутствующие у *S. pneumoniae*. Если названия генов для хламидий не были даны, то использовались названия генов, употреблявшиеся при расшифровке генома *E. coli*. Если гены у *E. coli* отсутствовали, то применялись названия для *B. subtilis*. Гены секреторного аппарата III типа названы, как у *Yersinia* (Hueck, 1998). Названия генов, естественно, будут меняться по мере накопления генетических и биохимических данных в отношении хламидий. Функциональная принадлежность генов на сегодняшний день определяется их структурной схожестью с известными генами родственных микроорганизмов и другими параметрами, в частности функцией кодируемых ими структурных и регуляторных белков и, в особенности, ферментов. Однако эти допущения могут содержать значительный элемент неопределенности, а потому являются лишь стартовой точкой для понимания и дальнейшего изучения биологии хламидий. Нельзя механически переносить данные, полученные от других микроорганизмов, на хламидии – ввиду их уникальности в мире прокариотов. Как образно писал один из наиболее известных исследователей в области хламидиологии Ричард Стивенс, «хламидии весьма склонны обманывать своих исследователей» (Stephens, 1992).

*S. trachomatis* имеет плазмиду, которая, как предполагается, вносит свой вклад в вирулентность, однако продукты ее генов функционально себя не проявляют. Продукты хромосомных генов хламидий *CT582* и *CT583* гомологичны белкам, кодируемым плазмидными генами *ORF7* и *ORF8*. *CT582* является ортологом ParA/MinD-подобной АТФазы, участвующей в процессе деления хромосомы. Поэтому можно предположить, что эти белки вовлечены в деление хромосомы и плазмиды соответственно. В геноме хламидий обнаружены гены, кодирующие ферменты, необходимые для репликации ДНК, репарации ошибок при репликации, транскрипции и трансляции. Хламидии обладают мощным аппаратом для репарации и рекомбинации ДНК, включая ферменты, исправляющие комплементарные несоответствия (MutL, MutS и три паралога MutY-белка), комплекс эксинуклеазы UvrABCD, репаратор транскрипции TRCF, а также белки, участвующие в репарации ошибок в процессе рекомбинации – RecA, RecBCD и RecJ. Кроме того, хламидии имеют резолвазу Holliday-соединения (RuvABC) и гомологи белков семейства рекомбиназ XerC/D. Как и другие бактерии, хламидии имеют ядерную РНК-полимеразу и ортолог большой вегетативной сигма-субъединицы 70 ( $\sigma^{70}$ ) (Engel, Ganem, 1990; Koehler et al., 1990), а также ортологи специализированных факторов транскрипции  $\sigma^{28}$  и  $\sigma^{34}$ . Роль альтернативных сигма-факторов у хламидий заключается в инициации транскрипции генов, вовлеченных в стадийспецифическую активность в процессе жизненного цикла. Так,  $\sigma^{28}$  участвует в синтезе сократительных белков, регулирует активность генов, необходимых для синтеза, сборки и экспорта белков через секреторный аппарат III типа, а также цикл развития и работу жгутикового аппарата у других бактерий (рис. 4.1).

$\sigma^{54}$  представляет отдельное семейство сигма-факторов и иницирует транскрипцию путем взаимодействия с AtoC. AtoC является частью двухкомпонентной системы, действующей по типу «сенсор-преобразователь», а также включающей AtoS – мембранную гистидин-киназу. Фермент AtoS реагирует на пока еще неизвестный внешний фактор и запускает транскрипцию  $\sigma^{54}$  генов, регулируя таким образом семейство генов, связанных со стадийспецифическими белками жизненного цикла хламидий. В геноме хламидий имеется также регуляторная система антисигма-факторов, напоминающая таковую у *B. subtilis* (Dufour, Haldenwang, 1994). Эта система состоит из RsbW-подобной однодоменной гистидин-киназы,



**Рисунок 4.1.** Гипотетическая упрощенная модель секреторного аппарата III типа хламидий на основании генетического кода. Модель построена по аналогии с грамотрицательными бактериями, поскольку у хламидий большинство этих белков не обнаружено. (Rockey, et al., 2000)

двух RsbV ортологов и anRsbU-подобной протеин фосфатазы – белков, которые регулируют содержание АТФ, и белков теплового шока у *B. subtilis*. Поскольку у хламидий отсутствует гомолог s32, то предполагается, что данная система ответственна за регуляцию синтеза белков теплового шока у хламидий (Engel et al., 1990).

Одной из фенотипических особенностей хламидий является чрезвычайно плотный нуклеоид на стадии элементарного тельца (Costerton et al., 1976). Конденсация нуклеоида регулируется двумя высокощелочными ДНК-связывающими белками, которые называются гистоноподобными, поскольку их аминокислотная последовательность сходна с гистонами эукариотных клеток H1 (Wagar, Stephens, 1988; Hackstadt, 1991; Perara et al., 1992; Hackstadt et al., 1993). В дополнение к гистоноподобным протеинам, у хламидий обнаружены два белка, содержащие домены, которые имеются у эукариотных хроматин-связанных протеинов – SWI/SNF геликаз и ДНК топоизомеразы I (SWIB). По-видимому, хламидии обладают сложным механизмом конденсации-деконденсации ДНК, наподобие такового у эукариотных клеток.

4.2.1. Гены, ответственные за метаболизм

Несмотря на тот факт, что хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, геном этих микроорганизмов содержит широкий набор генов, обеспечивающих весьма широкие возможности метаболизма. Тем не менее основной (центральный) метаболизм *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* – довольно консервативен (Kalman et al., 1999; Stephens et al., 1998; Stephens, 1999). Он ориентирован на рост и размножение во внутриклеточной среде с использованием метаболического пула клетки-хозяина. В наиболее общих чертах метаболизм хламидий схематично изображен на рисунке 4.2.

На рисунке показаны возможности транспорта необходимых питательных веществ (включая две порины – OmpA, OmpB) во внутримембранные транспортные системы для ионов и аминокислот. Хламидии используют меньше транспортных систем, чем свободноживущие бактерии и полагаются на системы с широкой специфичностью. Некоторые транспортные системы, чрезвычайно консервативные для других бактерий, у хламидий отсутствуют. Так, в геноме хламидий нет генов фосфоэнолпируват-пермиаза и *pst*-оперона транспорта фосфатов, которые обнаруживаются даже у *Archaea*. Транспорт фосфатов обеспечивает альтернативная фосфат-пермиаза СТ694. У хламидий также отсутствуют аналоги бактериальных сидерофоров и их рецепторы, которые связывают и транспортируют ионы. По-видимому, хламидии получают необходимые ионы из пула клетки-хозяина.

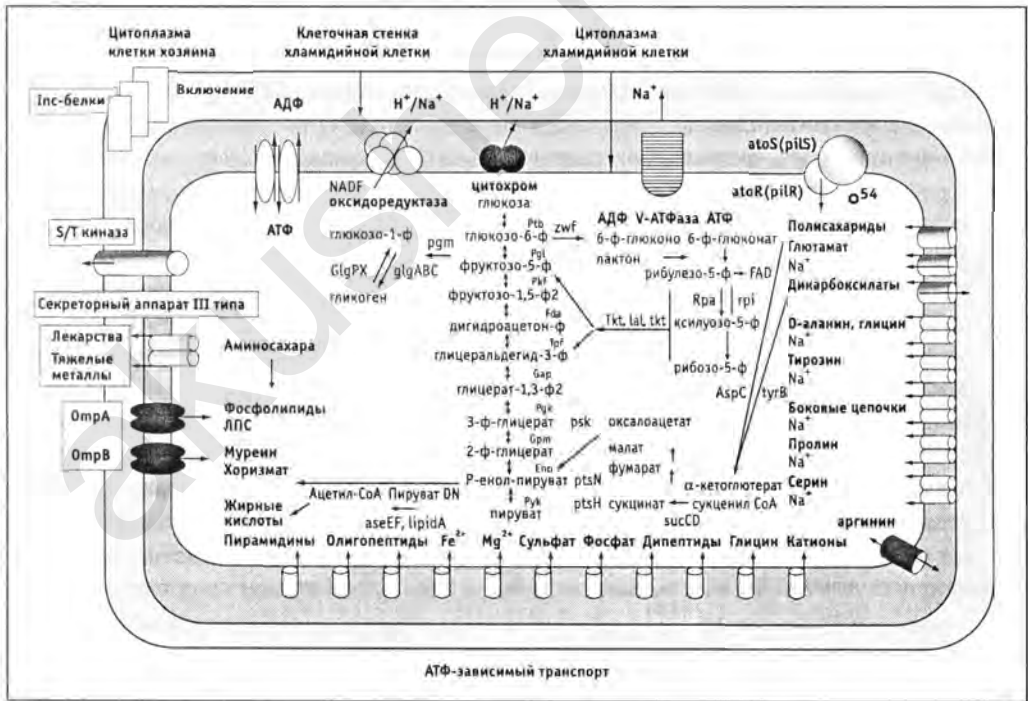


Рисунок 4.2. Показаны возможности транспорта необходимых питательных веществ, включая две порины – OmpA, OmpB, в внутримембранные транспортные системы для ионов и аминокислот. Хламидии используют меньше транспортных систем, чем свободноживущие бактерии и полагаются на системы с широкой специфичностью.

В свое время Moulder (1991) назвал хламидии «энергетическими АТФ-паразитами», поскольку предполагалось, что они получают всю необходимую им АТФ из клетки-хозяина. Геном хламидий содержит два паралога (эволюционно связанных гена внутри генома) для АДФ/ФТФ траслоказ, что подтверждает вероятность получения АТФ и, возможно, ГТФ из инфицированной клетки. Однако при полной расшифровке генома хламидий были неожиданно обнаружены гены, которые предполагают способность синтеза и использования ограниченного количества собственного АТФ. Таким образом, хламидии не являются строгими ауксотрофами в отношении АТФ. Наличие полного гликолитического пути метаболизма дополняется циклом трикарбоксильной кислоты (ТКК). И хотя ТКК-цикл – неполный, он вполне достаточен, чтобы функционировать в качестве бокового пути или при утилизации глютамата и дикарбоксилата, для которых у хламидий имеются транспортеры. Небольшое количество энергии, генерируемое за счет центральных путей метаболизма, используется хламидиями, о чем свидетельствует присутствие полного комплекса НАДФ-оксидоредуктазы, цитохрома и АТФазы V-типа. В дополнение к супероксиддисмутазе, защита от промежуточных продуктов окисления осуществляется тиол-специфическим антиоксидантом (который встречается у ряда патогенных бактерий), а также пероксидазами. (Koshiyama, Stephens, 1998; Yim et al., 1994). Примечательно, что большинство транспортных систем хламидий, таких как НАДФ-оксидоредуктаза, цитохром и АТФаза V-типа, обладают большим сродством с метаболическими системами, которые используют ионы металлов вместо ионов водорода. Это объясняется особенностями среды внутри включения, где имеется недостаток ионов водорода. Таким образом, хламидии используют  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -потенциал, обычно существующий внутри эукариотных клеток.

Как *C. trachomatis*, так и *C. pneumoniae* имеют законченный метаболический путь синтеза и распада гликогена, что свидетельствует о способности накапливать энергию в высокоэнергетических молекулах. Такая способность отвечает потребностям жизненного цикла хламидий. В частности, *C. trachomatis* продуцирует гликоген во время вегетативной стадии жизненного цикла, что предполагает глюконеогенез. Когда доступ во включение АТФ, глютамата и углеводов ограничивается (переход ретикулярных телец в элементарные), хламидии используют накопленный гликоген, и преобладают процессы гликолиза. Метаболизм гликогена имеет большое значение в персистенции хламидийной инфекции. Персистирующие формы хламидий, которые метаболически малоактивны, могут длительно сохранять жизнедеятельность, полагаясь на собственный гликоген, а не на высокоэнергетические молекулы клетки. А в таком состоянии взаимодействие с клеткой-хозяином минимальное и инфекция как бы «спит» внутри клетки, не проявляя цитопатического эффекта.

Контроль баланса гликолиза и глюконеогенеза осуществляется через уровень фосфоенолпирувата, который в свою очередь регулируется через активность генов посредством гомолога PtsN (Stephens et al., 1998). В отличие от большинства ферментов, вовлеченных в гликолитический путь, реакция фосфоэнопируват > пируват обычно необратима. Углерод может быть связан из цикла трикарбоновых кислот посредством действия фосфоэнолпируват-карбоксилкиназы. Эта реакция является ключевой для метаболизма хламидий, детали которого еще предстоит изучить.

#### 4.2.2. Гены, ответственные за структуру

Генетический код хламидий содержит последовательности, кодирующие многие белки наружной мембраны (кроме уже хорошо изученного главного белка наружной мембраны МOMP/OmpA). Это OmpB и большая группа полиморфных мембранных протеинов (Pmp). Они



расположены в кластерах. У *C. trachomatis* один кластер содержит три соприкасающихся гена (*ptpA*, *ptpB* и *ptpC*), кодирующих белки на одной нити ДНК, другой кластер содержит четыре гена, которые по два кодируются на противоположных нитях ДНК (*ptpE*, *ptpF*, *ptpG*, и *ptpH*). Ген *ptpD* локализован вдали от указанных кластеров, а ген *ptpI* локализован возле второго кластера и отделен от него участком длиной в 1084 пары нуклеотидов. Примечательно, что *C. pneumoniae* имеет 21 *ptp*-ген, хотя только 5 из них имеют рамки считывания, кодирующие конкретные белки (Grimwood et al., 1998; Kalman et al., 1999). Большое количество генов, значительный полиморфизм последовательностей нуклеотидов, объединение их в кластеры, различная локализация в геноме и различные направления кодирования указывают на рекомбинацию как на важный механизм амплификации и вариации этих генов. Большинство белков Ptp имеют лидирующие последовательности и все имеют на конце пептидной цепи фенилаланин, что может означать их окончательную локализацию во внешней мембране. Один из таких белков был обнаружен на поверхности *C. psittaci* с помощью тонкой методики иммуноэлектронной микроскопии. (Longbottom et al., 1998). Функция полиморфных мембранных белков пока не известна. Является ли их разнообразие отражением функционального полиморфизма либо представляет собой антигенную вариацию, еще предстоит выяснить.

До недавнего времени считалось, что хламидии не способны синтезировать пептидогликан (Moulder, 1993). Хотя биохимическими методами у хламидий были обнаружены пенициллинсвязывающие протеины, мурамовой кислоты обнаружено не было, даже с помощью газовой хроматографической спектрометрии (Barbour et al., 1982; Fox et al., 1990). Однако хламидии обладают полным набором генов для синтеза и сборки пептидогликана (Stephens et al., 1998). Su и соавторы (1985) обнаружили у хламидий мурамовую кислоту (хотя и в крайне малых количествах) с помощью жидкостной хроматографической спектрометрии. Мурамовая кислота содержится в РТ, тогда как в ЭТ она практически отсутствует. В составе хламидий не обнаружено белка FtsZ, необходимого для деления клетки и присутствующего у всех бактерий, геном которых расшифрован.

В геноме хламидий имеется довольно необычное семейство генов (*HKD*), кодирующих белки, которые являются ортологами суперсемейства белков, обладающих фосфолипазной активностью (фосфолипаза D) (Ponting, Kerr, 1996). Большое количество *HKD*-генов довольно необычно для бактерий и предполагает важную роль в уникальной биологии хламидий. Два из этих белков предположительно секретируются и локализуются в периплазматическом пространстве. Четыре других белка, гены которых локализованы в виде кластера, предположительно являются белками цитозоля. У млекопитающих фосфолипазы D весьма разнообразны и участвуют во многих процессах в клетке, включая внутриклеточную сигнальную трансдукцию, перестройку цитоскелета, внутривезикулярное движение мембран (Singer et al., 1997). У хламидий сходные функции могут иметь отношение к способности хламидийных включений подавлять слияние с лизосомой и модифицировать гликолипиды клетки-хозяина, а также к продукции провоспалительных цитокинов, которые участвуют в патогенезе хламидийной инфекции (Hatch, McClarty, 1998; Rasmussen et al., 1997). Интересно, что кластер цитозольных *HKD*-генов отсутствует в геноме *C. pneumoniae*, что является результатом делеции, которая захватывает также и триптофановый оперон.

Ряд экспериментальных исследований указывает на способность хламидий синтезировать и модифицировать различные углеводные полимеры (полисахариды и липополисахариды, гликолипиды, гепаран-сульфаты), а также гликолизировать MOMP (Lukacova et al.,

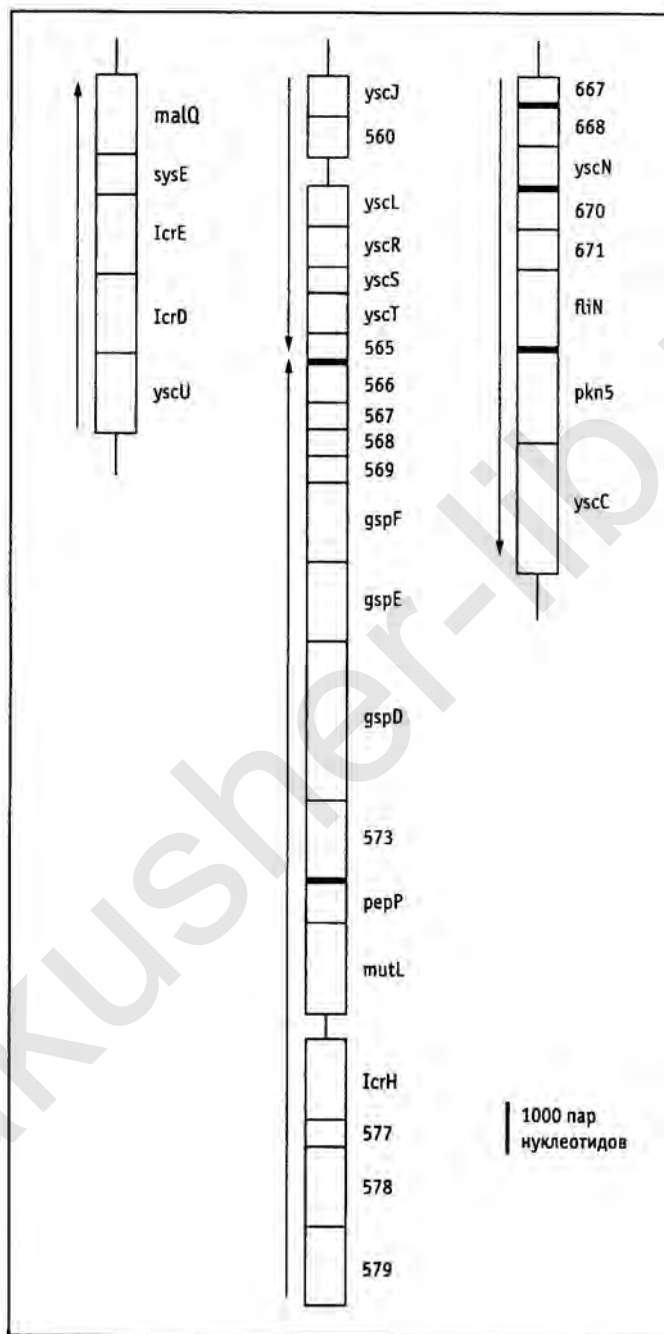
1994; Stuart et al., 1987; Swanson, Kuo, 1991; Zhang, Stephens, 1992). Тем не менее геном хламидий содержит лишь небольшое количество генов, связанных с синтезом или модификацией углеводов. Гомологов бактериальных гликозилтрансфераз или ферментов, вовлеченных в синтез капсульных липополисахаридов, у хламидий не обнаружено, за исключением гомолога белка KpsF – капсульного липополисахарида *E. coli* (функция которого неизвестна). Предполагается, что он может быть вовлечен в транспорт полисахаридов (Cieslewicz, Vimr, 1996). Имеется один потенциальный белок, сходный с N-ацетилглюкозаминтрансферазой млекопитающих. Однако других последовательностей, подтверждающих функционирование этого фермента у хламидий, не обнаружено. Другой белок имеет сходство с гликозилфосфатазой, которая участвует в сульфатировании и десульфатировании полисахаридов. Учитывая тот факт, что хламидии способны химически модифицировать липиды клетки-хозяина, так называемый хламидийный гликолипид (описанный Stuart и соавторами, 1987), по-видимому, является липидом хозяина, измененным хламидиями (Hatch, McClarty, 1998). Генетические исследования не подтверждают способность хламидий синтезировать подобные молекулы.

### 4.3. ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Так называемая секреторная система III типа, характерная для патогенных бактерий, запускается в результате контакта с клеткой-хозяином и предназначена для доставки внутрь клетки эффекторных ферментов, необходимых для инфицирования и играющих важную роль в патогенезе микробной инвазии (Huesek, 1998). Предположение о наличии подобного механизма у хламидий было сделано на основании идентификации у *C. psittaci* генов, гомологичных генам секреторного аппарата III типа других бактерий (Hsia et al., 1997). Геном хламидий содержит полный набор генов, необходимых для функционирования подобного аппарата. Наличие его у хламидий было подтверждено и морфологическими исследованиями. С помощью электронной микроскопии у хламидий были выявлены пикообразные отростки, пронизывающие мембрану включения. Эти отростки длиной примерно 90 нм и толщиной 6 нм (толщина у основания примерно 30 нм) морфологически сходны с секреторным аппаратом III типа *S. typhimurium* (Matsumoto, 1981; Nichols et al., 1985; Chang et al., 1997; Kubori et al., 1998). В отличие от генов секреторного аппарата III типа других патогенов, эти гены у хламидий локализованы в трех различных областях хромосомы. Хотя гены, кодирующие эффекторные протеины, доставляемые внутрь клетки, физически связаны между собой (рис. 4.3). Изучение продуктов этих генов важно для понимания патогенеза хламидиоза.

Несколько неожиданной находкой явилось обнаружение в геноме *Chlamydia trachomatis* двух паралогов, кодирующих мембранные тиол-протеазы, сходные с тиол-протеазами аденовирусов. Примечательно, что в геноме *Chlamydia pneumoniae* гены данных протеаз отсутствуют. Можно предположить, что они связаны с функцией и организацией Pmp-белков, поскольку эти гены локализованы рядом с одним из кластеров pmp-генов. Одной из определяющих характеристик структуры Pmp-белков является повторение глицин-глицин-аланин-изолейцин-остатков (Gly-Gly-Ala-Ile). А аденовирусная тиол-протеаза как раз и распознает свой субстрат по наличию в его молекуле повторяющихся остатков глицина (Gly-Gly) (Webster, Kemp, 1993; Stephens et al., 1998).

Хламидийный белок теплового шока массой 60 килоДальтон (Hsp60) связывают с иммунопатологическими последствиями персистирующей хламидийной инфекции. По данным



**Рисунок 4.3.** Гены секреторного аппарата III типа *C. trachomatis*. Названия генов приведены в соответствии с номенклатурой известных ортологов или обозначены номером. Стрелки показывают направление кодирования (но не обязательно транскрипции оперона). Длина отрезка соответствует 1000 парам нуклеотидов (Stephens, 1999).

генома хламидий, эти микроорганизмы имеют не один, как большинство бактерий, а три белка, которые можно отнести к семейству Hsp60-протеинов. Один из них – GroEL\_1, ген которого связан с геном второго белка – GroES, и третий Hsp60-белок – GroEL\_2, который не связан с каким-либо из белков теплового шока. Почему хламидии имеют целых три белка теплового шока и какие отличительные функции каждого из этих белков, не ясно. Белок, который выявляется серологически у больных хламидиозом и в клинико-морфологических исследованиях, связан с иммунопатологическими механизмами повреждения тканей при хламидийной инфекции – это GroEL\_1 (Cerrone et al., 1991). Отмечено, что из трех белков только GroEL\_1 не содержит остатков триптофана. Этот факт имеет большое значение в патогенезе хламидиоза, поскольку позволяет хламидиям вырабатывать Hsp60, несмотря на воздействие гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ), который создает дефицит триптофана (Beatty et al., 1994).

#### 4.4. СРАВНЕНИЕ ГЕНОМОВ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* И *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA*

Поскольку *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydoxyla pneumonia* в настоящее время относят к разным родам семейства *Chlamydiaceae*, их геномы во многом весьма сходны. Естественно, большинство генов, определяющих их структурные, метаболические и функциональные особенности, являются общими. Однако у этих микроорганизмов имеются существенные различия в биологических свойствах и способности вызывать ту или иную патологию. Имеются гены, определяющие тропизм к определенным клеткам и хозяевам и детерминирующие клиническую манифестацию заболевания для каждого вида хламидий. Различия между *C. trachomatis* и *C. pneumonia* на генетическом уровне существенны. Так, геном *C. pneumonia* больше. У этого представителя хламидий имеется около 200 генов, не имеющих гомологов в геноме *C. trachomatis*. С другой стороны, у *C. trachomatis* имеется около 70 генов, гомологи которых отсутствуют у *C. pneumonia* (табл. 4.1).

Прежде всего, это гены, определяющие видоспецифические особенности данных микроорганизмов и их патогенность и вирулентность. Определение функции этих генов представляет большой научный и практический интерес. Другие различия касаются кластеров генов, имеющих у обоих микроорганизмов. Это касается *Trp*-генов, которые у *C. pneumonia* являются более многочисленными, дополнительных генов, обеспечивающих биосинтез пурина и биотина, а также отсутствия генов биосинтеза триптофана у *C. pneumonia*. Способность *C. trachomatis* синтезировать триптофан является важным в патогенетическом аспекте, поскольку может объяснить механизм персистенции при урогенитальной хламидийной инфекции. Beatty и соавторами (1994) было показано, что при хламидийной инфекции в условиях сниженного количества триптофана, вызванного гамма-интерфероном (IFN- $\gamma$ ), происходит размножение и рост хламидийной инфекции без разрушения клетки-хозяина в течение длительного времени. Геном *C. trachomatis* содержит гены, кодирующие белки *TrpA*, *TrpB*, и *TrpC*, а также ген *TrpR* – регулятор транскрипции для триптофановых генов. Генов, кодирующих *TrpD* (антранилат фосфорибозил трансферазу) и *TrpE* (антранилат синтетазу), у хламидий не обнаружено. Клетки млекопитающих нуждаются в триптофане, который они получают извне, поскольку не способны синтезировать его предшественников – антранилат и фосфорибозил антранилат. Если создать дефицит триптофана, то рост и размножение *C. pneumonia* прекращается, тогда как *C. trachomatis* продолжает свой рост (хотя и с замедлением темпа), переходя в состояние персистенции (Summersgill et al., 1995; Allan, Pearce, 1983; Rasmussen et al., 1996).



Поскольку урогенитальные штаммы хламидий обладают способностью к ограниченному синтезу триптофана, они могут пережить воздействие IFN-γ в качестве ответного защитного механизма на внутриклеточную инфекцию. Один из возможных механизмов – использование продуктов распада клеточного триптофана в процессе кинуренинового метаболического пути под воздействием индоламин 2,3-диоксигеназы (Christen et al., 1994; Heyes et al., 1997).

## ГЛАВА 5. МЕТАБОЛИЗМ *CHLAMYDIALES*

Поскольку хламидии являются облигатными внутриклеточными паразитами, они не растут вне клеток хозяина, для них не разработаны системы переноса генов. Это сильно затрудняет изучение метаболизма хламидий. Метаболически активные ретикулярные тельца хламидий находятся в клетке в количестве, сравнимом с митохондриями. Отделить РТ хламидий от клетки хозяина полностью невозможно. Поэтому любая ферментативная активность, свойственная как про- так и эукариотам, не может быть полностью отнесена к функции хламидий в экспериментальных биохимических исследованиях. Точно так же, как неспособность обнаружить какую-либо активность в экстракте РТ, еще не означает отсутствия данного фермента у хламидий. Хламидийные ферменты могут иметь уникальные свойства и субстратную специфичность, а также функционировать только в присутствии определенных кофакторов, что затрудняет их обнаружение. Тем не менее метаболизм хламидий достаточно интенсивно изучался в последние десятилетия, что нашло свое отражение в ряде обзоров научной литературы по данной проблеме (Moulder, 1979, 1985, 1988, 1991, 1993; Stephens, 1993; McClarty, 1994). На основании этих данных была сформирована научная концепция (ставшая парадигмой) о том, что хламидии обладают ограниченными метаболическими возможностями и являются «энергетическими паразитами».

Расшифровка нуклеотидной последовательности генома *Chlamydia trachomatis*, серовар D дала возможность определить, по крайней мере потенциально, способность хламидий к осуществлению различных метаболических циклов (Stephens et al., 1998, 1999). Получить эти данные экспериментальным путем с помощью традиционных методов биохимии очень трудно, если вообще возможно. Информация о потенциальной метаболической способности хламидий поднимает ряд спорных вопросов и открывает новые направления в исследованиях свойств хламидий. Окончательный вывод о существовании определенной химической реакции должен быть сделан не на основании наличия гена, гомологичного известным у других бактерий, а на изучении рекомбинантного белка-фермента – продукта данного гена.

По своей основной функции в жизнедеятельности клетки метаболические реакции могут быть разделены на: реакции сборки, полимеризации, биосинтеза и энергетические реакции (Neidhardt et al., 1990). Реакции сборки включают химическую модификацию макромолекул (РНК, ДНК, белков, фосфолипидов, липополисахаридов [ЛПС] и пептидогликана) для последующего встраивания их в структурные компоненты клетки. Реакции полимеризации включают соединение активированных молекулярных блоков (нуклеотидов, аминокислот, жирных кислот и сахаров) в макромолекулы. Биосинтетические

Таблица 5.1.

Предшественники и продукты метаболизма у *Chlamydiales*

Путь биосинтеза	Метаболиты — предшественники	Строительные блоки	Макромолекулы
Гликолиз	Глюкозо-6-фосфат Фруктозо-6-фосфат Глицеральдегид-3-фосфат 3-фосфат глицерат Фосфоэнолпируват Пируват	АДФ-глюкоза УДФ-N-ацетилглюкозамин Глицерол-3-фосфат	Гликоген Пептидогликан Фосфолипиды
Пентозо-фосфатный	Рибозо-5-фосфат Эритрозо-4-фосфат	КДО Хоризмат	ЛПС Фолаты
Трикарбоновых кислот	Оксалоацетат Сукцинил-Коэнзим-А	Фосфоэнолпируват	Фолаты, ЛПС
Жирных кислот	2-оксоглутарат Ацетил-Коэнзим-А	Глутамат Ацетил-Коэнзим-А	Белок Жирные кислоты

Примечание: АДФ – аденин-дифосфат, УДФ – урацил-дифосфат, КДО – 3-дезоксид-0-манно-октулозонат, ЛПС – липополисахариды

реакции производят «строительные блоки» для реакций полимеризации и продуцируют различные кофакторы. В общей сложности в бактериальных клетках имеется 75 строительных блоков и коферментов, которые синтезируются из 12 метаболитов-предшественников (McClarty, 1999) (табл. 5.1).

Чтобы существовать, биологические виды, которые лишены определенных путей синтеза, должны получать данные конечные продукты из внешней среды. Энергетические реакции у бактерий продуцируют 12 исходных метаболитов и выделяют энергию (никотинамид-динуклеотид – НАД и никотинамид-динуклеотид-фосфат – НАДФ), а также запасают энергию, необходимую для биосинтеза (АТФ). И хотя бактерии чрезвычайно разнообразны в своих энергетических реакциях, биосинтетические пути от метаболитов-предшественников до строительных блоков и далее, через полимеризацию макромолекул с последующей сборкой структурных компонентов клетки у всех бактерий, в общем, схожи. Данные биохимические процессы довольно глубоко изучены на примере *Escherichia coli*. Поскольку хламидии, в отличие от свободноживущих бактерий, растут в богатой питательными веществами цитоплазме эукариотных клеток, они имеют неограниченный доступ к метаболитам, которые не надо синтезировать им самим. Однако при этом хламидии имеют широкий диапазон транспортных систем, чтобы захватывать необходимых для своего обмена веществ предшественников и посредников. В связи с этим геном *Chlamydia trachomatis* имеет гораздо меньшие размеры, по сравнению с *E. coli*, однако хламидии сохраняют способность ко многим метаболическим путям, характерным для кишечной палочки – основного объекта исследований молекулярной физиологии бактерий. В данной главе рассмотрены реакции полимеризации, биосинтеза и получения энергии на основе последних данных экспериментальных биохимических исследований и генного состава *Chlamydia trachomatis*. Окончательная сборка молекулярных компонентов хламидийной клетки из полимерных макромолекул подробно рассмотрена в главе 3 «Структурные и функциональные характеристики *Chlamydiales*».

## 5.1. СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ

С момента открытия хламидий в начале XX века и вплоть до начала 60-х годов в микробиологии шла дискуссия относительно того, являются ли хламидии вирусами или бактериями. Последняя точка в этом споре была поставлена Moulder в 1962 году в монографии *The Biochemistry of Intracellular Parasitism* («Биохимия внутриклеточного паразитизма»). Одним из наиболее весомых доказательств принадлежности хламидий к бактериям было обнаружение в их составе как ДНК, так и РНК. Позже, в результате серии изящных экспериментов было показано, что хламидии, отделенные от клетки-хозяина, способны к ограниченному синтезу ДНК, РНК и белков при наличии необходимых строительных блоков и АТФ (Hatch, 1988). В исследованиях *in situ*, когда хламидии выращивались в эукариотных клетках, было показано, что пик синтеза ДНК и РНК, а также синтеза белка приходится на время 20-30 ч, когда количество РТ максимально (McClarty, 1994). Хламидии, находящиеся как внутри клетки, так и вне ее, чувствительны к прокариотным антибиотикам, подавляющим соответственно синтез ДНК (налидиксиновая кислота), РНК (рифампицин) и белка (хлорамфеникол). Так называемые эукариотные ингибиторы синтеза ДНК, РНК и белка (т.е. действующие только на эукариотные клетки) – соответственно, афидиколин,  $\alpha$ -аманитин и циклогексимид – не подавляли синтеза макромолекул хламидийной клеткой. Эти результаты свидетельствуют о том, что хламидии имеют ферментные системы для осуществления реакций полимеризации, характерные для бактерий, и не зависят от ферментных систем, осуществляющих реакции полимеризации эукариотной клеткой-хозяином. Соответственно, геном хламидий кодирует основной набор ферментов, необходимых для репликации ДНК, транскрипции и трансляции РНК.

Хламидии кодируют достаточно ферментов, чтобы осуществлять репликацию ДНК, подобно внеклеточным бактериям, обладающим сравнительно небольшим геномом – *Mycoplasma genitalium*, *Borrelia burgdorferi* и *Treponema pallidum* (Fraser et al., 1995, 1997, 1998). У хламидий имеются гены-гомологи  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\tau$  субъединиц ДНК полимеразы III *E. coli*, а также полимеразы I, топоизомеразы типа I (*topA*) и две копии топоизомеразы типа II (*gyrAB*). Примечательно, что у хламидий отсутствует топоизомераза IV, которая участвует в процессе разделения хромосом. Ген топоизомеразы IV отсутствует также у возбудителя сифилиса – *T. pallidum*. Предполагается, что разделение хромосом у бледной трепонемы осуществляется с помощью альтернативного механизма, при котором гемиметилированная ДНК связывается с цитоплазматической мембраной. Для этого необходим фермент ДНК метилтрансфераза (*dam*). И хотя у хламидий нет ортолога для *dam* (соответственно, у них отсутствует *mutH*), у них имеется гомолог *hemK*, который имеет сродство с *yfcB*-геном *E. coli*, который кодирует гипотетическую *yfcB* аденин-специфическую метилтрансферазу (Stephens et al., 1998). Обычно источником метильных групп в этих реакциях является S-аденозилметионин (SAM). SAM синтезируется из АТФ и метионина при помощи фермента аденозилметионин синтетазы (*metK*). Поскольку у хламидий нет гена, гомологичного *metK*, вероятно, они получают SAM из клетки-хозяина.

У хламидий имеется большинство из известных путей репарации ДНК. Выявлены гомологи *uvr* – гена ультрафиолетовой эндонуклеазы, исправляющей повреждения, вызванные воздействием ультрафиолетового излучения, и *mutL/mutS*, *mutY*, устраняющие несоответствия нуклеотидов при точечных мутациях, а также *nfo*, *nth* и *ada*. В 1995 году Zhang et al. клонировали ген хламидий *recA*, участвующий в рекомбинации гомологичных хромосом. Обнаружены

также *recB*, *recC* и *recD*, что указывает на RecBCD-путь генетической рекомбинации хламидий. RecF-путь также, по-видимому, имеет место, поскольку обнаружены ортологи *recF*, *recJ* и *recR*. Однако генов *recG* и *recN* в геноме *Chlamydia trachomatis* нет, как нет и генов, кодирующих ферменты, которые необходимы для рестрикции и модификации ДНК.

В геноме хламидий есть гены, кодирующие три субъединицы РНК полимеразы ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ) и  $\sigma^{66}$ . Ранее данные гены были клонированы (Engel et al., 1990; Gu et al., 1995; Koehler et al., 1990). В дальнейшем были выявлены гомологи альтернативных сигма-факторов РНК полимеразы ( $\sigma^{24}$  и  $\sigma^{54}$ ), которые играют важную роль в экспрессии генов, регулирующих жизненный цикл хламидий. Имеются также гены, кодирующие белки, вовлеченные в процесс элонгации и терминации транскрипта (*nusA*, *nusG*, *rho*) и две копии *pspB*, вовлеченного в процессинг РНК.

Engel и Ganem (1987) показали наличие в геноме хламидий двух копий рРНК-оперона (16S-23S-5S). Внутри рРНК-оперонов хламидий нет тРНК-генов или других открытых рамок считывания. Однако ген транспортной РНК, несущей гистидин (тРНКHis), находится близко к одному из рРНК-оперонов. У хламидий, как и у большинства других бактерий, имеется полный набор генов рибосомальных белков, большинство из которых организованы в опероны (Neidhardt et al., 1990; Kaul et al., 1992; Wagar, Pang, 1992). Имеется 37 *mPHK*-генов, из которых лишь немногие собраны в кластеры более чем по два гена. Из 20 генов *mPHK* синтетазы, необходимых для синтеза белка, у хламидий имеются 18. Группой исследователей под руководством Wagar обнаружен довольно редкий у бактерий фермент глицил-тРНК синтетазы (Wagar et al., 1995). Ген глутамил-тРНК синтетазы у хламидий не обнаружен. Отсутствие данного фермента нередко встречается у бактерий. Один и тот же фермент глицил-тРНК синтетазы аминокатирует как тРНКGlu, так и тРНКGln при помощи глутамата с последующим трансаминированием с помощью Glu-тРНК аминотрансферазы, как это имеет место у бактерий, лишенных глутамил-тРНК синтетазы (Fraser et al., 1997; Tomb et al., 1997). Гомолог Glu-тРНК аминотрансферазы имеется у хламидий. У хламидий отсутствует аспарагинил-тРНК синтетазы, что встречается довольно редко в мире бактерий. Эта синтетазы также отсутствует у *Helicobacter pylori*. Показано, что архаичная бактерия *Haloferax volcanii* получает Asn-тРНКAsn из Asp-тРНКAsn путем трансаминирования (Curnow et al., 1996). Вполне вероятно, этот процесс может иметь место и у *Chlamydiales*.

## 5.2. СИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА

Наличие или отсутствие гликогена в хламидийном включении является признаком, позволяющим отличить *Chlamydia trachomatis* от других представителей *Chlamydiales*. *C. trachomatis*, в отличие от *C. psittaci* и *C. pneumoniae*, накапливает гликоген во включении. Он может быть визуализирован при окрашивании красителями, содержащими йод. Ojcius и соавторы (1998) сообщили о накоплении гликогена в клетках HeLa, инфицированных *C. psittaci*. Однако неясно, синтезируется ли данный гликоген клеткой-хозяином или самими хламидиями. У *C. psittaci* и *C. pneumoniae* обнаружены гены, необходимые для синтеза и расщепления гликогена. Вероятно, отсутствие видимой аккумуляции гликогена во включениях, образуемых этими видами хламидий, связано не с тем, что он не синтезируется, а с тем, что сразу же расщепляется, не накапливаясь в пространстве включения. Очевидно, активность генов, кодирующих ферменты, расщепляющие гликоген, по отношению к генам, кодирующим ферменты, осуществляющие синтез гликогена, у данных представителей хламидий выше.



*C. trachomatis* использует АДФ-глюкозу в качестве донора глюкозы для биосинтеза гликогена. Частишки гликогена появляются в ЭТ, но более характерны для РТ. Гликоген, который можно обнаружить внутри хламидийного включения при инфицировании клеток *C. trachomatis*, происходит из РТ, часть из которых во время роста включения разрывается (Chiappino et al., 1995).

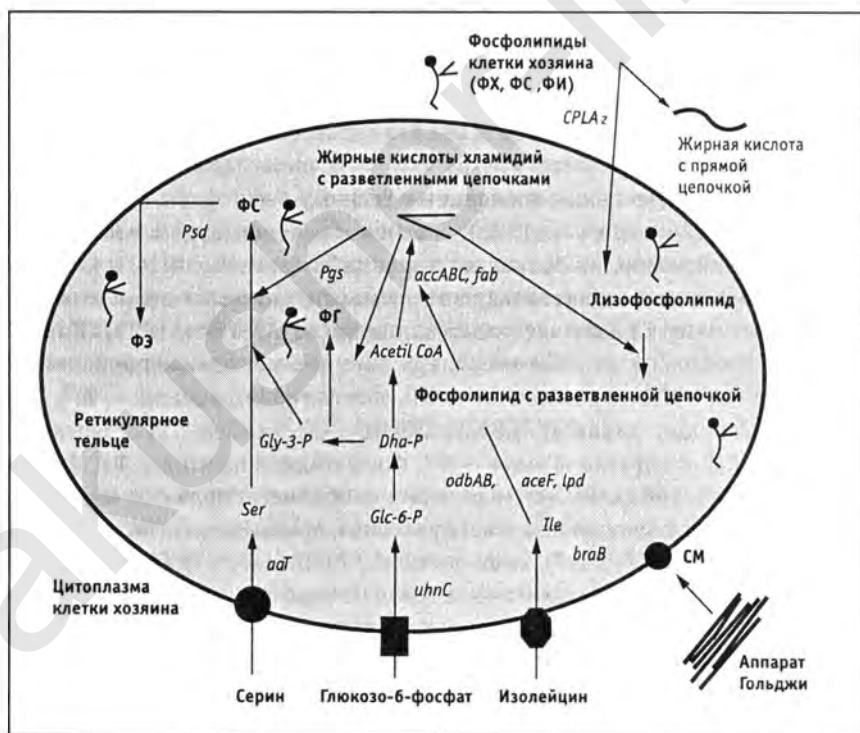
Геном *C. trachomatis* содержит гомологи генов, необходимых для синтеза гликогена из глюкозо-6-фосфата – *mrsA*, *glgC*, *glgA* и *glgB*. Также имеются ортологи ферментов, расщепляющих гликоген – гликоген гидролазы (GlgX) и гликоген фосфорилазы (GlgP). Таким образом, хламидии могут запастись глюкозу в форме собственного гликогена и использовать гликоген клетки-хозяина в случае необходимости, как источник глюкозы. У бактерий, аккумулирующих гликоген, этот процесс происходит в условиях, когда азота в среде роста недостаточно, но имеется избыток углерода (Neidhardt et al., 1990). На стадии РТ *C. trachomatis* синтез гликогена является способом поглощения глюкозы из клетки-хозяина, а на стадии ЭТ гликоген служит источником глюкозы для энергетических реакций на ранних стадиях жизненного цикла, при превращении ЭТ в РТ. Тот гликоген, который накапливается внутри включения, может быть доступен для развивающихся и делящихся хламидий только в случае высвобождения в пространство включения гликоген-расщепляющих ферментов из РТ.

### 5.3. СИНТЕЗ ЛИПИДОВ

На ранних этапах изучения метаболизма хламидий было показано, что как внутриклеточные хламидии, так и отделенные от клетки-хозяина (смесь РТ и ЭТ), способны включать радиоактивно меченные изолейцин и глюкозо-6-фосфат в собственные липиды (Gaugler et al., 1969; Reed et al., 1981). Способность использовать изолейцин в качестве предшественника липидов позволяет хламидиям синтезировать жирные кислоты с разветвленными цепочками, поскольку изолейцин служит источником атомов углерода в процессе биосинтеза разветвленных жирных кислот (Kaneda, 1991). Известно, что в дополнении к фосфолипидам, обычно содержащимся в мембранах прокариотов (фосфатидилэтаноламин – ФЭ, кардиолипин – КЛ, фосфатидилглицерол – ФГ), хламидии содержат фосфолипиды, характерные для клеточных мембран эукариотных клеток (сфингомиелин – СМ, фосфатидилхолин – ФХ, фосфатидилинозитол – ФИ, фосфатидилсерин – ФС) (Newhall, 1988). Объяснение этому необычному явлению было дано в результате исследований, проведенных в лабораториях, руководимых Hackstadt и McClarty (Hackstadt et al., 1995, 1996, 1997; Scidmore et al., 1996; Hatch, McClarty, 1998; Wylie et al., 1997). Хламидии включают сфингомиелины и глицерофосфолипиды клетки-хозяина в состав собственных мембран, задействуя при этом уникальный транспортный механизм. Hackstadt и соавторы (1996) с помощью меченных флуоресцеином предшественников СМ показали путь движения этих фосфолипидов из клетки-хозяина в ретикулярные тельца. Wylie и соавторы (1997) применили другой подход, пометив радиоактивной меткой изолейцин, и проследили движение глицерофосфолипидов из клетки в хламидии. Если СМ транспортируются в неизменном виде, то глицерофосфолипиды модифицируются во время транспорта. Жирная кислота в положении sn-2 удаляется и заменяется синтезированной хламидиями разветвленной жирной кислотой. После поглощения

хламидий клеткой, они активно модифицируют мембрану вакуоли, которая диссоциируется от эндоцитного клеточного пути и сливается с экзоцитными клеточными везикулами. Каким образом фосфолипиды клетки попадают в хламидийные мембраны, не установлено. Влияние хламидий на метаболизм липидов в эукариотной клетке может быть значимым в патогенезе атеросклероза, триггером которого может являться инфекция, вызванная *S. pneumoniae* (Russell, 1993; Davidson et al., 1998).

Хламидии обладают ферментными системами, необходимыми для синтеза *de novo*, по крайней мере, некоторых глицерофосфолипидов. Геном хламидий содержит необходимые гены для кодирования этих ферментов. Источником глицерол-3-фосфата, который требуется в качестве остова для всех глицерофосфолипидов и в качестве предшественника для концевых групп ФГ, является промежуточный продукт гликолиза – дигидроксиацетонфосфат (Stapan, Rock, 1996). Эта важная для жизнедеятельности реакция катализируется глицерол-3-фосфат дегидрогеназой (*gpsA*). При этом восстанавливается НАД<sup>+</sup>. У хламидий система синтаз жирных кислот относится ко II, или диссоциированному типу, характерному для прокариотов. Биосинтез жирных кислот осуществляется в две стадии – инициации и циклической элонгации. Биосинтез жирных кислот с разветвленными цепочками и с прямыми цепочками отличается



**Рисунок 5.1.** Схема синтеза хламидийных фосфолипидов, транспорта и модификация фосфолипидов из клетки-хозяина (по данным Hatch, McClarty, 1998; Wylie et al., 1997; Stephens et al. 1998; McClarty, 1999).

Фосфатидилэтаноламин – ФЭ, кардиолипин – КЛ, фосфатидилглицерол – ФГ, сфингомиелин – СМ, фосфатидилхоллин – ФХ, фосфатидилинозитол – ФИ, фосфатидилсерин – ФС.

на стадии инициации. Праймером синтеза прямых жирных кислот является ацетилкоэнзим А (ацетил-СоА), разветвленных – эстер-ацетил-СоА. Источником разветвленных цепочек служат разветвленные цепи аминокислот – изолейцина, лейцина или валина. Затем следует добавление двух углеродных групп из малонил-СоА. Биосинтез разветвленных жирных кислот подробно изучен у бактерий рода *Bacillus* (Kapeda, 1991). У хламидий имеются гомологи всех генов, необходимых для синтеза этих молекул. Гомолог *fabA*, который требуется для синтеза ненасыщенных жирных кислот, у хламидий отсутствует. По-видимому, у хламидий место ненасыщенных жирных кислот занимают жирные кислоты с разветвленными цепями, поскольку и те и другие увеличивают текучесть мембран. Процесс биосинтеза жирных кислот требует наличия белка-носителя ацильных групп (БНА) и много восстановительной энергии в форме НАДФ, которая поставляется в результате пентозо-фосфатного пути метаболизма. Хламидии имеют этот белок, как и ацилтрансферазы – продукты *ptsB*- и *pIsC*-генов – необходимые для переноса жирных ацильных групп от ацил-БНА к глицерол-3-фосфатному скелету глицерофосфолипидов. Процесс биосинтеза и транспорта фосфолипидов у *Chlamydiales* схематично показан на рис. 5.1.

#### 5.4. СИНТЕЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Липополисахариды (ЛПС) – иммуногенные гликолипиды, которые формируют внешний листок наружной мембраны у грамотрицательных бактерий (Raetz, 1996). Поскольку эукариотные клетки не производят ЛПС, хламидии должны обладать генетической информацией, необходимой для полного биосинтеза ЛПС. Структура липополисахарида у хламидий достаточно хорошо изучена. Это касается как липида А, так и полисахаридных участков (Brade et al., 1997; Qureshi et al., 1997). Хламидийные ЛПС относятся к грубому варианту липополисахаридов. Их базовой структурой является трисахарид-липид А-3-дезоксид-манно-октулозонат (KDO), а не дисахарид-липид А-KDO, который характерен для ЛПС бактерий кишечной группы. Липидная часть ЛПС (липид А) ответственна за эндотоксический эффект. Иммуностимулирующий эффект хламидийных ЛПС примерно в 100 раз меньше, чем ЛПС кишечных бактерий. Это обусловлено особенностями структуры ЛПС хламидий – они имеют пять жирных ацильных групп, тогда как у ЛПС многих кишечных бактерий их шесть (Ingalls et al., 1995; Qureshi et al., 1997).

Еще до полной расшифровки генома *Chlamydia trachomatis* были обнаружены и клонированы гены *kds* и *kdsB* (необходимые для синтеза KDO из арабинозо-5-фосфата и фосфоенолпирувата), а также гены *kdtA* и хламидийный гомолог *gseA* (которые требуются для прикрепления KDO к липиду А) (Belunis et al., 1992; Wylie et al., 1997b). Синтез липидной части ЛПС (липид А) хорошо изучен у *E. coli* (Raetz, 1996). Хламидии обладают способностью синтезировать дисахарид глюкозамина – остов липида А – из промежуточного продукта гликолиза фруктозо-6-фосфата. Хламидии также имеют ферменты, необходимые для реакций жирного ацилирования с помощью ацил-БНА, который служит в качестве донора ацильных групп. По некоторым данным, хламидии способны к фазовым переходам ЛПС (мягкий – грубый) (Lukacova et al., 1994). Однако гены *rfa* и *rfb* или их продукты, необходимые для фазовых переходов ЛПС, у хламидий не обнаружены.

## 5.5. СИНТЕЗ ПЕПТИДОГЛИКАНА

Хламидии имеют полный набор генов, необходимых для синтеза пептидогликана. Пептидогликан является необходимым компонентом клеточных стенок большинства эубактерий. Маркером пептидогликана является мурамовая кислота, которая содержится исключительно в надмолекулярной структуре пептидогликана (Park, 1996). У хламидий мурамовая кислота не обнаруживается в количествах, достаточных для выполнения структурной роли. Однако хламидии в некоторой степени чувствительны к пенициллину и содержат пенициллинсвязывающие белки (Barbour et al., 1982; Moulder, 1991, 1993). Пептидогликан необходим для поддержания целостности клетки, сохранения ее формы и участвует в сложных процессах клеточного деления. Поскольку у хламидий нет FtsZ – универсального белка клеточного деления, предполагается, что пептидогликан играет важную роль в делении клетки. Хламидии синтезируют пептидогликан, но в крайне незначительных количествах.

Путь биосинтеза пептидогликана интенсивно изучался у многих бактерий. Синтез проходит в две стадии. Первая заключается в сборке мономера дисахарид-пептид, а вторая – в полимеризации данного мономера на наружной поверхности цитоплазматической мембраны, с последующим связыванием вновь образованного пептидогликана с предшествующей саккулой. Ключевым предшественником является урацилдифосфат-N-ацетилглюкозамин. В хламидийном геноме имеются гомологи *glmU* и *glmS*, необходимые для превращения промежуточного продукта гликолиза глюкозо-6-фосфата в урацилдифосфат-N-ацетилглюкозамин. У хламидий есть синтетазы MurC, MurD, MurE и MurF, осуществляющие синтез пептидных остатков и так же, как транслоказа (*mgaY*) и трансфераза (*migG*), необходимые для формирования ацетилглюкозамин-муреинацетиламин (пентапептид)-пирофосфорил-андекапринола. Андекапринол (полиизопреноидный липидный носитель) необходим для транспортировки дисахарид-пентапептида через гидрофобную среду клеточных мембран. Гомологи пенициллинсвязывающих белков 2 и 3 (*Pbp2* и *Pbp3*), которые нужны для сборки муреиновой саккулы (используя ацетилглюкозамин-муреинацетиламин (пентапептид)-пирофосфорил-андекапринол в качестве субстрата), также имеются у хламидий.

Синтез пептидогликана зависит от определенного числа метаболитов, которые служат в качестве субстратов на каждом этапе. Это АТФ, фосфоэнолпируват, мезо-диаминопимеловая кислота, D-глутаминовая кислота, андекапренилфосфат, УДФ-ацетилглюкозамин, L-аланин и D-аланил-D-аланин (Park, 1996). Хламидии способны синтезировать все эти промежуточные продукты, кроме D-глутаминовой кислоты и D-аланина. У хламидий нет гомологов MurI и Alg рацематов (оптически активных ферментов) для превращения L-глутамата и L-аланина в соответствующие D-изомеры. По-видимому, хламидии получают D-аминокислоты, необходимые для биосинтеза пептидогликана, из клетки-хозяина. Возможно, это имеет место и в отношении других метаболитов, несмотря на способность к их синтезу.

## 5.6. МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ

Продолжительный период эволюции хламидий как внутриклеточных паразитов обусловил особенности метаболизма аминокислот. Эти особенности характерны для многих внутриклеточных бактерий, обладающих сравнительно небольшим геномом – *Mycoplasma hominis* et



*genitalium*, *Ureaplasma urealiticum*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*. Биосинтетические способности у них ограничены, тогда как транспортные системы, необходимые для доставки метаболитов из клетки-хозяина, представлены довольно широко (Fraser et al., 1995, 1997, 1998). Это относится и к аминокислотам – строительным блокам белков. Исследования показали, что потребность хламидий в аминокислотах клетки-хозяина зависит от штамма (Hatch, 1988; Moulder, 1991). *C. trachomatis* обладает небольшим количеством генов, кодирующих ферменты для биосинтеза аминокислот, и значительным числом генов ферментов-транспортёров с различной субстратной специфичностью (*aat* – нейтральный аминокислотный транспортёр; *braB* – транспортёр аминокислот с разветвленными цепочками; *hasA* – аминокислотный носильщик, а также *opp*-оперон – транспортная система для олигопептидов). В сочетании с большим количеством протеаз и пептидаз данные ферментные системы обеспечивают потребности хламидий в аминокислотах (McClarty, 1999). Пути биосинтеза аминокислот у хламидий часто являются прерванными. Их конечные продукты используются как предшественники в других биосинтетических путях. Продукт гена *glyA* – серин гидроксиметилтрансфераза – катализирует реакцию, которая является главным источником глицина и C1 групп, связанных с носителем H4-фолатом (CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>-фолатом) (Green et al., 1996). Поскольку глицин в избытке имеется в цитоплазме клетки-хозяина, то образование CH<sub>2</sub>-H<sub>4</sub>-фолата – ключевого предшественника метаболизма фолатов – более важно для жизнедеятельности хламидий, чем образование глицина. Путь биосинтеза ароматических аминокислот у хламидий не завершается образованием фенилаланина и/или тирозина, а прерывается на хоризмате – ключевом предшественнике синтеза фолатов и убихинона. Аналогично биосинтез лизина заканчивается на мезо-диаминопимелате – компоненте пентапептидного остатка пептидогликана (McClarty, 1999).

Две трансаминазы с широкой специфичностью – *aspC* и *tyrB*, которые обычно вовлечены в биосинтез аминокислот тирозина, фенилаланина и аспартата, у хламидий играют важную роль в поддержании баланса дикарбоксилата (2-оксиглутарата и оксалоацетата) и пула аминокислот (глутамата и аспартата). Продукт гена *dhIE* – лейцингидрогеназа, которая является широкоспецифичной гидрогеназой семейства Glu/Leu/Phe/Val дегидрогеназ, является весьма важным ферментом, поскольку вовлечена в продукцию разветвленных цепей α-кетокислот, необходимых для инициации синтеза разветвленных жирных кислот (Kaneda, 1991). Фермент глутаматдегидрогеназа при определенных условиях может ассимилировать NH<sub>3</sub> группы. Лейцин гидрогеназа и глутаматдегидрогеназа объединяют метаболизм углерода и азота и вместе с продуктом гена *pts* регулируют экспрессию нескольких ключевых генов центрального метаболизма.

У хламидий имеются гомологи TrpA, TrpB и TrpC – последних трех ферментов биосинтеза триптофана, и TrpR – репрессор триптофана. Как известно, триптофан связан с цитокином гамма-интерфероном (IFN-γ). Влияние IFN-γ на рост и развитие хламидий интенсивно изучалось. Была установлена способность данного интерферона блокировать размножение внутриклеточных паразитов, в том числе и хламидий (Beatty et al., 1994; Entrican et al., 1998). Механизм этого блокирования состоит в том, что при обработке клеток культуры IFN-γ индуцируется синтез фермента индоламин-2,3-деоксигеназы, который разлагает триптофан до кинуренина. В результате хламидии оказываются в среде с недостатком триптофана. Ранее предполагалось, что хламидии не способны синтезировать триптофан, однако это не так. Хламидии потенциально могут осуществлять синтез триптофана. Возможно,

они не могут накапливать достаточное его количество, когда потребность в триптофане в момент интенсивного роста и размножения сильно возрастает. Путь биосинтеза триптофана у хламидий атипичный. У них отсутствуют гомологи некоторых генов, необходимых для синтеза. Промежуточный продукт хоризмат может синтезироваться хламидиями. Однако гомологи ферментов TrpE и TrpD, необходимых для дальнейшего превращения хоризмата в фосфорибозил-антранилат, у хламидий отсутствуют. Фосфорибозил-антранилат в дальнейшем превращается в триптофан путем последующего воздействия TrpC и TrpA/B, гомологи которых у хламидий имеются. Вероятно, недостающее звено может быть заполнено другими, ранее неизвестными ферментами с аналогичной активностью. Для синтеза триптофана обязателен фосфорибозилпирофосфат (PRPP) как источник остатков фосфорибозила. PRPP синтезируется из АТФ и рибозо-5-фосфата. Эта реакция катализируется PRPP-синтазой – продуктом гена *prs* (Neuhard, Kelln, 1996; Zalkin, Nygaard, 1996). Гомолог гена *prs* у хламидий отсутствует. Хламидии не могут синтезировать нуклеотиды, биосинтетический путь которых требует PRPP в качестве предшественника. Какого-либо носителя для транспорта заряженной молекулы PRPP также не выявлено. Триптофан является для млекопитающих незаменимой аминокислотой, которая не синтезируется клетками и может быть получена только с пищей. Поэтому возможность для хламидий компенсировать отсутствие TrpE, TrpD за счет получения фосфорибозил-антранилата из клетки-хозяина исключается. Тем более, что индуцированная IFN- $\gamma$ -деградация триптофана не приводит к образованию фосфорибозил-антранилата. О том, что хламидии потенциально могут синтезировать триптофан, свидетельствует наличие у *C. trachomatis* гомолога TrpR – апорепрессора. Когда триптофан связывается с апорепрессором, он изменяет его конформацию таким образом, что репрессор может взаимодействовать с регуляторной областью оперона генов, контролирующей синтез триптофана. При этом экспрессия генов снижается. Данные гены (*trp*-оперон, *aroH*, *trpR*, *aro* и *mtr*) изучены у *E. coli*, и все они имеют гомологов у *C. trachomatis*, серовар D. Примечательно, что у *Chlamydomypha pneumonia* и *Chlamydia muridarum* (возбудитель мышинной пневмонии) гены биосинтеза триптофана отсутствуют.

## 5.7. МЕТАБОЛИЗМ КОФАКТОРОВ

Все клетки нуждаются в так называемых кофакторах – низкомолекулярных соединениях, необходимых для проявления активности определенных ферментов. Для своей жизнедеятельности клетки должны либо их синтезировать, либо получать из внешней среды. Для этого необходимы соответствующие транспортные системы. Хламидии обладают способностью к биосинтезу некоторых кофакторов, в частности фолиевой кислоты (McClarty, 1994). Поскольку все представители рода *Chlamydia* чувствительны к сульфаниламидам, то предполагается, что они могут синтезировать фолаты *de novo*. Представители рода *Chlamydomypha* (*C. pneumoniae* и *C. psittaci*, кроме штамма 6BC) нечувствительны к сульфаниламидам. Ранее считалось, что они не могут синтезировать фолаты. Исследования Fan и соавторов, (1991) показали, что *C. psittaci* (штамм френсис) способна синтезировать фолаты *de novo*, при условии роста в клетках, культивируемых в условиях дефицита фолиевой кислоты.

Гомологи нескольких (но не всех) генов, необходимых для биосинтеза фолатов, содержатся в геноме *C. trachomatis*. Гомологи *folE* (ГТФ циклогидраза I) и *pabA*, *pabB*, *pabC* (4-амино-4-деоксихоризмат синтаза [гетеродимер] и лиаза) у хламидий отсутствуют, тогда как гомологи

*foIX*, *folK* и *folP* (соответственно, дигидронеоптерин альдолаза, 6-гидрокси-метил-дигидронеоптерин пирофосфокиназа и дигидроптероат синтаза) у хламидий имеются. Это предполагает, что хламидии должны получать дигидроптерин и пара-амионбензойную кислоту из клетки-хозяина. Чтобы обеспечить рост и размножение хламидий, клетка должна иметь достаточное количество этих продуктов для обеспечения синтеза фолатов у хламидий. Фолаты клетки-хозяина могут быть гидролизваны, продукты транспортированы в хламидийную клетку, где могут быть вновь собраны фолатные молекулы. Транспортные системы, способные переносить дигидронеоптерин и пара-амионбензойную кислоту, известны у многих бактерий (Green et al., 1996). И гидронеоптерин, и пара-амионбензойная кислота являются субстратами для дигидроптероат синтазы – фермента, который ингибируется сульфаниламидами. Этот фермент катализирует синтез дигидроптероата – непосредственного предшественника дигидрофолата. В отличие от *E. coli*, хламидии не имеют гомолога дигидрофолат синтазы (*folC*). Каким образом у хламидий происходит присоединение глутамата к дигидроптероату, не известно. В геноме хламидий имеются также гомологи для четырех генов *folA*, *fold*, *glyA*, *fmt*, кодирующих ферменты, обеспечивающие синтез и модификацию дериватов С1-фолата. Конечные продукты синтеза фолатов – СНО-Н<sub>4</sub>-фолат и СН<sub>2</sub>-Н<sub>4</sub>-фолат служат в качестве С1 доноров при образовании формилметионина и тимидилата.

*C. trachomatis* обладает способностью к биосинтезу других, кроме фолатов, кофакторов. Пути метаболизма гема, рибофлавина, липоата являются полностью завершенными и аналогичны таковым у *E. coli*. В путях синтеза биотина и убихинона отсутствуют некоторые существенные ферментные системы, хотя фермент, катализирующий присоединение к апоэнзиму, имеется. У *C. pneumoniae* имеется полный путь биосинтеза биотина (Kalman et al., 2000). Синтез пиримидиновых нуклеотидов (НАД/НАДФ), пантотеновой кислоты, аденозил-кобаламина и коэнзима у хламидий вообще отсутствует (McClarty, 1999). Кофакторы, которые не образуются хламидийной клеткой, должны быть доставлены извне. Для этого необходимо наличие специальных транспортных систем. У хламидий имеется много ферментов, требующих соответствующих кофакторов. Это цитохром *bd* оксидаза и сукцинатдегидрогеназа (требуется гем); пируват дегидрогеназа (требуются тиамин-пирофосфат – ТПФ, флавинаденин динуклеотид – ФАД, коэнзим А, никотинамидадениндинуклеотид – НАД и липоат); ацетил-КоА карбоксилаза (требуется биотин и коэнзим А) и транскетолаза (требуется ТПФ). Не ясно, почему хламидии сохранили способность к синтезу многих коферментов, если они могут получить их из клетки-хозяина. Возможно, это объясняется тем, что период внутриклеточного паразитизма, в масштабах биологической эволюции, был у них относительно недолгим.

## 5.8. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ

Все живые организмы нуждаются в пуриновых и пиримидиновых нуклеотидах для синтеза нуклеиновых кислот и преобразования энергии. Нуклеотиды могут синтезироваться *de novo* или с использованием утилизации уже имеющихся молекул (Neuhard, Kelln, 1996; Zalkin, Nygaard, 1996). Большинство бактериальных клеток может осуществлять оба пути метаболизма нуклеотидов, однако имеются бактерии, у которых преобладает тот или иной путь. Нуклеотиды в значительном количестве содержатся только внутри клетки, поскольку во внеклеточной среде они быстро распадаются. Поэтому, чтобы выжить во внеклеточной среде хозяина, паразит должен обладать способностью к биосинтезу нуклеотидов.

Метаболизм нуклеотидов у хламидий достаточно хорошо изучен. Для его изучения применялись различные подходы. Были использованы РТ, отделенные от клеток и находящиеся внутри клетки-хозяина. При этом применялись мутантные клеточные культуры, у которых нарушен собственный метаболизм нуклеотидов (Hatch, 1975, 1988; Hayashi et al., 1996; McClarty, 1994; McClarty, Tipples, 1991). В результате этих исследований было показано, что хламидии не могут синтезировать нуклеотиды *de novo*, а также не могут их утилизировать. Был сделан вывод, что хламидии являются ауксотрофами в отношении рибонуклеотидов (рибонуклеозид-трифосфаты – РТФ). В последующих исследованиях было показано, что хотя хламидии могут получить из клетки все четыре РТФ (АТФ, ГТФ, ЦТФ и УТФ), они являются ауксотрофами в отношении трех из них – АТФ, ГТФ и УТФ. Что касается цитозин-трифосфата – ЦТФ, то он может быть синтезирован хламидийной клеткой (Tipples, McClarty, 1993). ЦТФ может быть синтезирован *de novo* в реакции, катализируемой ЦТФ синтетазой. Ген *pyrG*, кодирующий хламидийную ЦТФ синтетазу, был клонирован и охарактеризован несколькими группами исследователей у обычного (дикого) штамма *Chlamydia trachomatis* и у мутантного штамма (резистентного к действию циклопентенилцитозина – ингибитора ЦТФ синтетазы). У хламидий имеется РТФ транспортная система. Продукт гена *adt2* – гомолог транслоказы – обладает способностью к транспорту нуклеозид-трифосфатов у *E. coli* (Tipples, McClarty, 1995; Wylie et al., 1996, McClarty, 1999).

В ряде исследований было показано, что хламидии не способны транспортировать дезоксирибонуклеотиды (дезоксирибонуклеозид-трифосфаты – ДТФ) из клетки-хозяина. Речь идет о dATФ, dГТФ, dТТФ и dЦТФ (Hatch, 1988; McClarty, Tipples, 1991; Moulder, 1991). Три ДТФ (dATФ, dГТФ, и dЦТФ) продуцируются путем реакции восстановления из соответствующих рибонуклеотидов. Эта реакция катализируется рибонуклеотид редуктазой (Reichard, 1993, 1997). Четвертый – дезокситимозин-трифосфат (dTТФ) синтезируется из урацил-трифосфата (УТФ) под воздействием рибонуклеотид редуктазы и тимидилат синтазы (Montfort, Weichsel, 1997). Существование этих двух ферментов у хламидий доказано биохимическими методами (Fan et al., 1991; Tipples, McClarty, 1991).

Геном хламидий содержит весьма небольшое число генов, кодирующих ферменты для синтеза нуклеотидов. У хламидий отсутствуют гомологи генов, необходимых для биосинтеза *de novo* и/или утилизации нуклеотидов. В частности, отсутствует PRPP синтаза, фермент абсолютно необходимый для синтеза и утилизации нуклеотидов. По сути дела *Chlamydia trachomatis*, серовар D – первый, и пока единственный, известный представитель мира бактерий, у которого отсутствуют гены синтеза нуклеотидов. Характерно, что у других представителей семейства *Chlamydiales* – *Chlamydia pneumoniae* и *Chlamydia muridarum* имеется ряд генов, катализирующих урацил-уридин-утилизацию и превращение АТФ в ГТФ. Даже у бактерий, имеющих маленький геном, таких как *Mycoplasma genitalium*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, имеется полный набор генов для обеспечения всеми нуклеотидами с использованием утилизации (Fraser et al., 1995, 1997, 1998). Невозможность синтезировать и утилизировать нуклеотиды является ключевым свойством, определяющим облигатный внутриклеточный паразитизм хламидий (McClarty, 1999).

У хламидий имеются гомологи специфических монофосфат киназ (*amk*, *cmk*, *gmk*, *pyrH* и *tmk*), способных восстанавливать нуклеотид монофосфата до дифосфатов. Имеется также гомолог неспецифической (универсальной) дифосфат киназы (*ndk*). Вместе это дает хламидиям возможность реутилизировать рибонуклеиновые и дезоксирибонуклеиновые моно-



и дифосфаты из обмена нуклеиновых кислот и из побочных продуктов энергетических реакций. Это также дает возможность утилизировать рибонуклеиновые моно- и дифосфаты, полученные из клетки-хозяина. У хламидий имеются гомологи, кодирующие две субъединицы рибонуклеотид редуктазы (NrdA и NrdB) и тиоредоксин (*Trx*) – источники для восстановления эквивалентов рибонуклеотидов. Однако гены, кодирующие тимидин синтазу (*thyA*) и тимидин киназу (*tk*), у *C. trachomatis* не обнаружены. На сегодняшний день достоверно известны два пути получения тимидин-трифосфата (ТТФ) – либо с помощью тимидин киназы (путь утилизации), либо с помощью тимидин синтазы (путь синтеза *de novo*). Однако могут существовать и другие пути синтеза тимидиновых нуклеотидов, поскольку гомологи тимидин киназы и синтазы отсутствуют у ряда бактерий, не являющихся облигатными внутриклеточными паразитами – у *Helicobacter pylori*, *Treponema pallidum*, *Synechocystis* (Fraser et al., 1998; Kaneko et al., 1996; Tomb et al., 1997). Биосинтез тимидиновых нуклеотидов является мишенью для действия многих химиопрепаратов – триметоприма, метотрексата, сульфаниламидов, фторурацила. Поэтому изучение особенностей метаболизма тимидиновых нуклеотидов у хламидий может открыть пути к новым антибактериальным средствам для лечения хламидиоза. Метаболизм нуклеотидов у хламидий схематично показан на рис. 5.2.

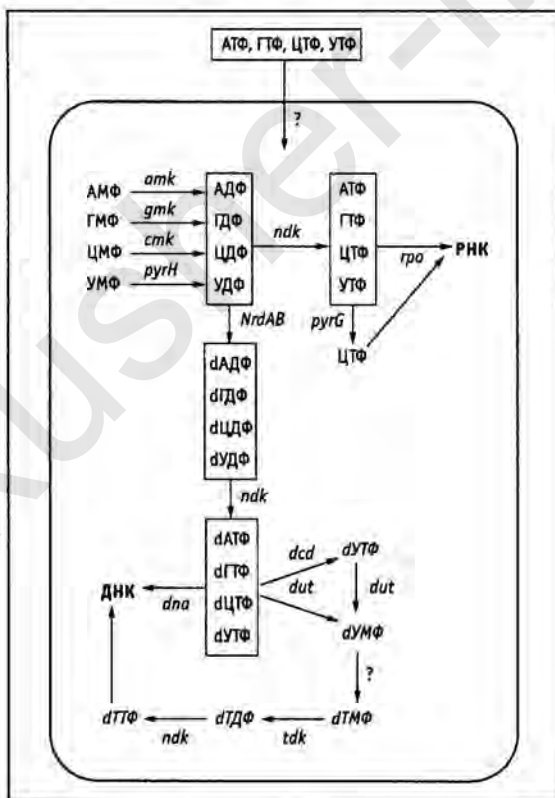


Рисунок 5.2. Схема метаболизма нуклеотидов у *Chlamydiales*. Знак вопроса означает реакции, для которых не обнаружено генов, кодирующих соответствующие ферменты (McClarty, 1999).

## 5.9. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ (ЦЕНТРАЛЬНЫЙ) МЕТАБОЛИЗМ

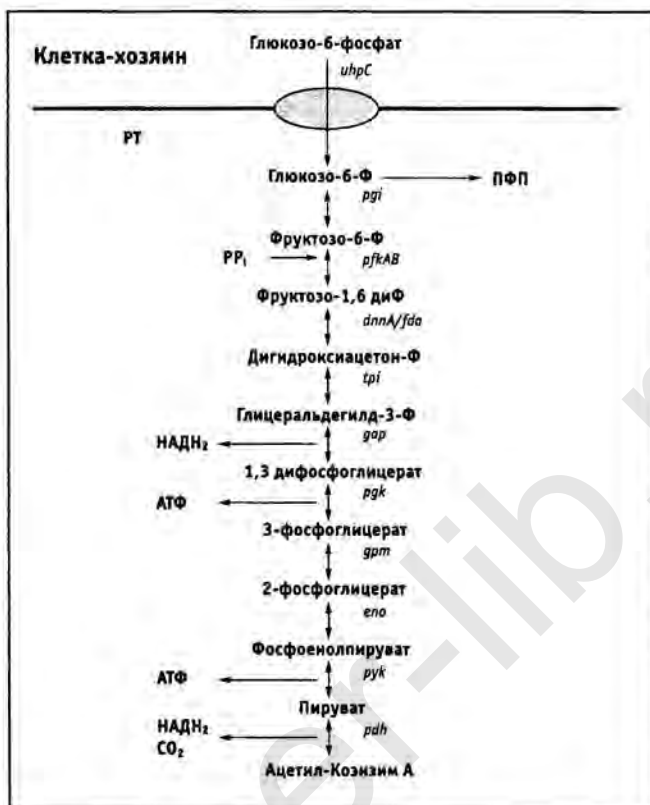
В результате энергетических реакций синтезируются ключевые метаболиты-предшественники для основных биосинтетических путей (табл. 5.1), и происходит превращение энергии, необходимой для биосинтеза и полимеризации. Многие из этих предшественников, такие как АТФ, НАДФ, ацетилкоэнзим А, фосфоэнолпируват (ФЭП), известны как высокоэнергетические молекулы, способные запасать большое количество химической энергии, расходуемой затем в реакциях метаболизма. Данные последних лет существенно расширили и углубили понимание энергетических реакций у хламидий и изменили некоторые представления (господствовавшие многие годы) об их центральном метаболизме. В 1962 году Moulder выдвинул гипотезу «энергетического паразитизма» хламидий. В самых общих чертах суть этой гипотезы сводилась к тому, что хламидии зависят от АТФ и других высокоэнергетических молекул, которые генерируются клеткой-хозяином в результате диссимиляции глюкозы. В последующие годы данная концепция получила экспериментальное подтверждение (Hatch, 1988; Moulder, 1991). Многочисленными исследованиями было установлено, что хотя хламидии частично способны к трем центральным путям метаболизма углеводов, они не обладают достаточным набором ферментов, необходимых для производства АТФ. Поскольку у хламидий не удалось обнаружить флавопротеины или цитохромы, был сделан вывод о неспособности их производить АТФ путем окислительного фосфорилирования (Alien, Bovarnick, 1957, 1962; Moulder, 1991). Еще одним свидетельством в пользу концепции энергетического паразитизма явилось открытие Hatch и соавторами (1982) АТФ/АДФ транслоказы, сходной с той, которая обнаруживается в митохондриях, хлоропластах, а также у *Rickettsia prowazekii* (Fiore et al., 1998; Mohlmann et al., 1998; Krause et al., 1985). Изучение свойств этой транслоказы показало, что она может получать АТФ из клетки хозяина в обмен на АДФ, полученный от хламидий. Геном хламидий содержит два паралога *adt1*, *adt2*, кодирующих АТФ/АДФ-транслокатор. Один из этих генов – *adt1* имеет особо близкую гомологию с хлоропластом *Arabidopsis thaliana* и транслокатором риккетсий, который был клонирован и охарактеризован Krause и соавторами (1985). Продукт второго гена – *adt2* – является транспортером нуклеотид-трифосфатов у хламидий. Высокоэнергетические промежуточные продукты метаболизма содержатся в межклеточной среде в весьма низких концентрациях. Энергетическая зависимость хламидий может быть одной из основных причин, а возможно, и одним из важных следствий облигатного внутриклеточного паразитизма этих бактерий (McClarty, 1999).

Все 12 метаболитов-предшественников синтезируются в результате каскада химических реакций, которые принято называть «центральный метаболизм» (Neidhardt et al., 1990). Эти реакции идут по нескольким метаболическим путям. Метаболический путь Embden-Meyerhoff-Parnas (ЕМР), который превращает глюкозо-6-фосфат в пируват; пентозофосфатный путь (ПФП), который окисляет глюкозо-6-фосфат до CO<sub>2</sub>; цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), где ацетил-Коэнзим А окисляется до CO<sub>2</sub>. Реакции, которые соединяют данные пути, например катализируемое пируват дегидрогеназой превращение пирувата в ацетил-Коэнзим А, называются связующими реакциями. Метаболиты-предшественники производятся в результате энергетических реакций и используются затем для биосинтеза необходимых компонентов макромолекул. Шесть из двенадцати основных предшественников получаются в результате ЕМР-пути, два происходят от ПФП, и три – от ЦТК. Оставшийся один является продуктом связующей реакции, катализируемой пируват дегидрогеназой.

Хламидии не обладают гексокиназной активностью, у них нет гомологов гексокиназы (Vender, Moulder, 1967). Хламидии имеют ферменты, которые используются бактериями для транспорта сахаров – неспецифические компоненты системы фосфоэнолпируват-фосфотрасферазы (ФФТ) – фермент 1 (pts1) и Hpr (ptsH) (Postma et al., 1996). Что касается специфического компонента – фосфогистидин-сахар фосфотрансферазы IIA, то эти гомологи у хламидий не обнаружены. Имеется два гомолога азотного регулятора (фермент IIA-NTR). У *E. coli* данный фермент вовлечен в каскад сигнальной трансдукции, объединяющей обмен углерода и азота, а не в транспорт сахаров. Система фосфоэнолпируват-фосфотрасферазы у хламидий участвует в регуляции экспрессии генов. Один из гомологов фермента IIA-NTR содержит спиралевидный остаток, что предполагает его способность связываться с ДНК.

Хламидии обладают транспортерами для углеводов. Один из них – *sodTi*, транспортирует дикарбоновые кислоты для цикла трикарбоновых кислот. Другой – *uphC*, является транспортером гексозо-фосфатов (Island et al., 1992). Поскольку хламидии имеют мало ферментов, способных метаболизировать другие сахара, кроме глюкозы, то продукт гена *uphC*, вероятнее всего, используется для доставки именно глюкозо-6-фосфата из клетки-хозяина. Глюкозо-6-фосфат служит основным источником энергии для хламидий. Поскольку хламидии находятся во внутриклеточной среде, то они всегда легко могут получить глюкозо-6-фосфат, в отличие от большинства свободноживущих бактерий, которым необходимы гексокиназы и/или ФФТ. Таким образом, у хламидий отсутствует первая реакция гликолитического пути.

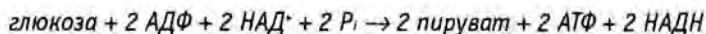
Гликолитический путь метаболизма является универсальным и присущ многим клеточным формам жизни. Поэтому ферменты, вовлеченные в гликолиз, довольно консервативны и сходны у многих микроорганизмов (Fothergill-Gilmore, Michels, 1993; Fraenkel, 1996). У хламидий отсутствует только гексокиназа, однако другие ферменты для гликолиза имеются (рис. 5.3). Глюкозо-6-фосфат, полученный из клетки-хозяина, катаболизируется до пирувата. Для этого требуются АДФ, НАД<sup>+</sup>, и неорганический фосфат (Pi). У хламидий есть гомолог фосфат пермиазы (*ugo4*), что позволяет им получать фосфатные ионы из цитоплазмы клетки-хозяина. Метаболиты-предшественники, получаемые в результате EMP-пути – это глюкозо-6-фосфат, фруктозо-6-фосфат, тримозо-6-фосфат, 3-фосфоглицерат, фосфоэнолпируват и пируват. Кроме того, производится АТФ и НАДН<sup>+</sup>Н<sup>-</sup>. За исключением фосфофруктокиназы и фруктозо-1,6-бифосфат альдолазы, все хламидийные гликолитические ферменты проявляют высокую степень гомологии с аналогичными ферментами прокариотов и эукариотов. Вместо типичной, зубактериальной фосфофруктокиназы, хламидии содержат гомолог фермента, который использует неорганический фосфат (PPi) в качестве донора фосфатных групп (рис. 5.3). Такая киназа найдена у некоторых бактерий, простейших и растений, в частности, у *Treponema pallidum* и *Borrelia burgdorferi* (Carlisle et al., 1990; Bruchhaus et al., 1996; Fraser et al., 1997, 1998; Mertens, 1991; Todd et al., 1995). В отличие от АТФ-зависимой фосфофруктокиназы, которая катализирует необратимую реакцию, PPi-зависимая фосфофруктокиназа катализирует обратимую реакцию. Таким образом, один фермент может участвовать как в гликолизе, так и в глюконеогенезе (Fothergill-Gilmore, Michels, 1993; Mertens, 1991). У большинства организмов обратная реакция катализируется фруктозо-1,6-бифосфатазой. Использование неорганического фосфата вместо АТФ позволяет хламидиям «экономить» и меняет их гликолитический баланс. Фруктозо-1,6-бифосфат альдолаза катализирует расщепление фруктозо-1,6-бифосфата глицеральдегид-3-фосфата и дигидроацетона (Fraenkel, 1996). В зависимости от механизма реакции выделяют две формы данной



**Рисунок 5.3.** Гликолиз у *Chlamydiales*. Две первичные реакции гликолиза, утилизирующие АТФ, отсутствуют у хламидий (McClarty, 1999).

альдозазы – класс 1 и класс 2. У хламидий эта альдозаза имеет высокую степень гомологии (60 %) с подобным ферментом у *E. coli*, который принадлежит к классу 1 (Thomson et al., 1998).

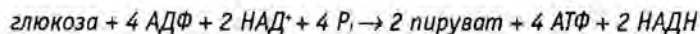
Важной особенностью гликолиза является фосфорилирование – формирование АТФ в реакции между АДФ и фосфорилирующим предшественником энергетического пути метаболизма. Реакции, в результате которых генерируется АТФ, катализируются 3-фосфоглицерат киназой и пируват киназой. Оба эти фермента хламидий клонированы, а полученные рекомбинантные продукты оказались функционально активными. У большинства организмов суммарное уравнение гликолиза можно выразить так:



Фактически генерируется 4 молекулы АТФ – по две от каждой триозной части ЕМР-пути. Две из этих молекул АТФ используются в первичных реакциях (гексокиназа и фосфофруктокиназа), поэтому окончательный выход – две молекулы АТФ. Хламидии, в отличие от многих других организмов, не утилизируют АТФ в первичных реакциях гликолиза. Одна молекула АТФ



«экономится», потому что глюкозо-6-фосфат хламидии получают от хозяина, а другая – потому что в качестве фосфатного донора для фруктозо-1,6-бисфосфата используется неорганический фосфат. Таким образом, у хламидий суммарное уравнение гликолиза выглядит так:



Общий выход – 4 молекулы АТФ (McClarty, 1999). Таким образом, хламидии, используя условия внутриклеточного существования, чрезвычайно эффективно осуществляют энергетический метаболизм.

Пентозофосфатный путь состоит из двух ветвей. Окислительная ветвь, осуществляемая ферментами, продуктами генов *zwf* и *gnd*, генерирует НАДФН<sub>2</sub>, который является основным источником энергии в биосинтезе. Неокислительная ветвь (*tkt*, *tal*, *rpi*, *rpe*) генерирует пентозо-фосфат и эритрозо-4-фосфат – два из двенадцати основных метаболитов-предшественников. У хламидий имеются гомологи всех ферментов пентозофосфатного цикла, за исключением б-фосфоглюконолактоназы (рис. 5.4). Мутационный анализ у *E. coli* показал, что ген

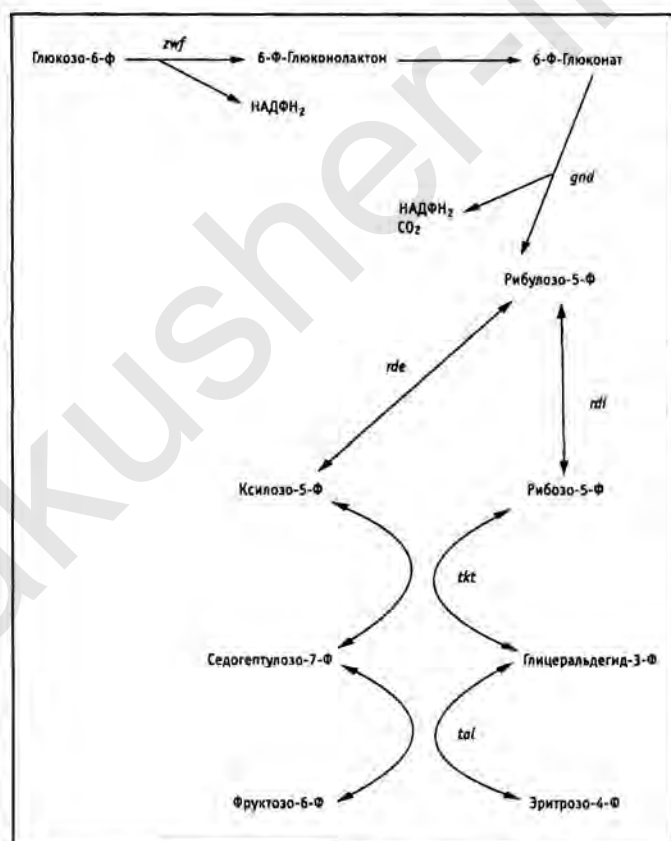
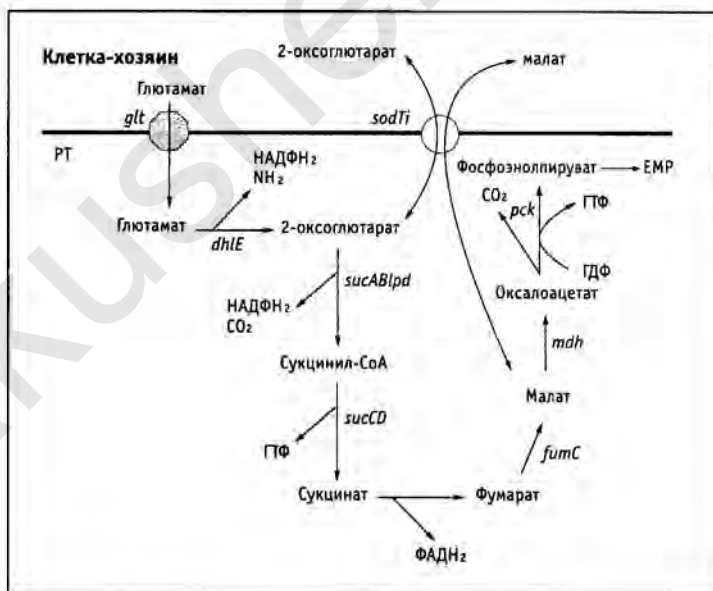


Рисунок 5.4. Пентозофосфатный путь метаболизма у *Chlamydiales* (McClarty, 1999).

pgl не является жизненно необходимым для бактерий, поскольку данная лактозная реакция может осуществляться неферментативным способом с достаточно большой скоростью (Fraenkel, 1996). Еще в 1965 году Moulder и соавторы обнаружили глюкозо-6-фосфат дегидрогеназу и 6-фосфоглюконат дегидрогеназу у *C. psittaci*. Гомолог гена *zwfy* у *C. trachomatis* был клонирован, последовательность его расшифрована, а рекомбинантный продукт в *E. coli* обладал специфической активностью (Wylie et al., 1996).

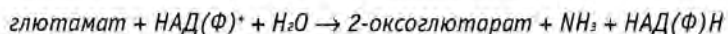
Цикл трикарбоновых кислот выполняет две важные функции. Одна – полное окисление ацетил-Коэнзима А, дающее три молекулы НАДН и одну молекулу ФАДН<sub>2</sub> (Cronan, Laporte, 1996). Непрерывный замкнутый путь метаболизма трикарбоновых кислот зависит от быстрого реокисления этих восстановленных кофакторов. Реокисление НАДН и ФАДН<sub>2</sub> сопровождается восстановлением органических метаболитов (ферментация) или транспортом электронов через дыхательную цепь (дыхание). У многих организмов пути ферментации сопровождаются восстановлением пирувата до лактата. Хотя хламидии не имеют лактат дегидрогеназы, они обладают глицерол 3-фосфат дегидрогеназой, которая регенерирует НАД<sup>+</sup>. Как и у большинства других организмов, транспорт электронов по дыхательной цепи играет главную роль в регенерации НАД<sup>+</sup> у хламидий. Второй функцией цикла трикарбоновых кислот является продукция оксалоацетата, 2-оксоглутарата и сукцинил-Коэнзима А – трех из основных метаболитов-предшественников. У хламидий цикл трикарбоновых кислот неполный (рис. 5.5). Само по себе это не является необычным, поскольку неполный цикл трикарбоновых кислот характерен для многих аэробных бактерий. У хламидий отсутствуют три фермента – цитрат синтаза (*gltA*), аконитаза (*acn*) и изоцитрат дегидрогеназа (*icd*). В ре-



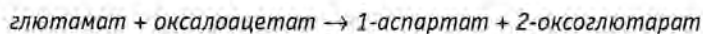
**Рисунок 5.5.** Цикл трикарбоновых кислот у *Chlamydiales*. Цикл неполный. В цикл не вступает ацетил СоА, поэтому используются альтернативные источники углерода для поддержания цикла – SodT1 «эксценджер» и глутамат дегидрогеназа (Glt). (McClarty, 1999).

зультате отсутствия этих ферментов ацетил-Коэнзим А (ацетил CoA) не может присоединиться к циклу. Цикл начинается с 2-оксоглутарата и оканчивается оксалоацетатом.

Чтобы цикл трикарбоновых кислот продолжался, необходим доступ углерода. У хламидий это осуществляется двумя путями. Первый путь, это когда 2-оксоглутарат поступает из клетки-хозяина. У хламидий имеется гомолог дикарбоксилат транслокатора *sodTi*. Поразительно, но хламидийный фермент *SodTi* имеет большую степень гомологии с подобным ферментом в хлоропластах растения шпинат (*Spinacia oleracea*) (Weber et al., 1995). У шпината транслокатор *SodTi* транспортирует дикарбоксилаты в хлоропласт для синтеза глутамата. Аналогичный транслокатор имеется на внутренней мембране митохондрий (Bisaccia et al., 1988). Он также был обнаружен у бактерии *E. coli* (Pos et al., 1998). У хламидий данный транслокатор транспортирует 2-оксоглутарат из клетки-хозяина (McClarty, 1999). Это позволяет углероду входить в ЦТК. Затем 2-оксоглутарат окисляется до оксалоацетата. Получаемый таким образом оксалоацетат может быть транспортирован в клетку-хозяина. В этом случае «урезанный» ЦТК может продолжаться между цитоплазмой клетки-хозяина и цитоплазмой ретикулярного тельца (рис. 5.5). За каждые пять «оборотов» цикла одна молекула 2-оксоглутарата, полученная от хозяина, полностью окисляется до CO<sub>2</sub>. За каждый оборот цикла с помощью реакций, катализируемых 2-оксиглутарат дегидрогеназой, малат дегидрогеназой и сукцинат дегидрогеназой соответственно, генерируются две молекулы НАДФН<sub>2</sub> и одна молекула ФАДН<sub>2</sub>. Кроме того, с помощью фосфорилирования на субстратном уровне генерируется гуанин-трифосфат (ГТФ), когда сукцинил-Коэнзим А превращается в сукцинат, который катализируется сукцинат тиюкиназой. Оксалоацетат у хламидий может также превращаться в малат с помощью малат дегидрогеназы (*Mdh*). Примечательно, что хламидийная малат дегидрогеназа весьма близка по структуре к ферментам хлоропластов растений. При активации растительной малат дегидрогеназы ее дисульфидные мостики восстанавливаются тиоридоксином. Вполне возможно, что и у хламидий существует подобный механизм регуляции активности данного фермента, если исходить из особенностей жизненного цикла хламидий, в котором чередуются метаболически активные и «спящие» фазы. Второй путь, по которому химические группы, содержащие углерод, могут из клетки-хозяина попасть в ЦТК, связан с глутаматом. В 60-х годах было показано, что *C. psittaci* может деаминировать глутамат до 2-оксиглутарата, который затем декарбоксилируется до сукцината (Weiss, 1967). Глутамат может быть получен из клетки-хозяина с помощью переносчика (транспортера) *AaaT*. Хламидии имеют ген *dhlE*, который кодирует дегидрогеназу, принадлежащую к семейству *Glu/Leu/Phe/Val* дегидрогеназ. Фермент *DhlE* (точнее его гомолог у хламидий), имеет сниженную субстратную специфичность, что позволяет ему катализировать реакции с глутаматом, лейцином, фенилаланином и валином. Реакция, катализируемая глутамат дегидрогеназой, выглядит так:



Полученный таким образом 2-оксиглутарат может войти в ЦТК и окисляться до оксалоацетата, давая НАДН, ФАДН и ГТФ. Кроме того, реакции трансаминирования, катализируемые продуктами генов *aspC* и *tyrB*, могут образовывать 2-оксоглутарат из глутамата:



глутамат + ароматическая кислота → ароматическая аминокислота + 2-оксоглутарат

Однако эти реакции не являются источником углерода, поскольку требуется акцептор аминогрупп.

### 5.10. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ

Для большинства клеток необходимо образование глюкозы. При росте бактерий на средах, в которых содержатся углеводы, отличные от гексоз, глюкоза образуется в результате процесса, который известен как глюконеогенез. Предшественниками глюкозы являются лактат, пируват, глицерол и большинство аминокислот. Из всех реакций гликолиза только три являются необратимыми и, соответственно, должны быть обойдены в результате глюконеогенеза. Это реакции, катализируемые гексокиназой, фосфофруктокиназой (ФФК) и пируват киназой. Хламидии не имеют гексокиназы, но имеют гомолог ФФК, который катализирует обратимую реакцию с неорганическим фосфатом (PPi) – как донором фосфатной группы. Таким образом, у хламидий нет необходимости в обходной реакции. Ортолог фосфоэнолпируват карбоксикиназы (pckA) имеется в геноме хламидий. Он катализирует следующую реакцию:

ГТФ + оксалоацетат → ГДФ + фосфоэнолпируват + CO<sub>2</sub>

Эта реакция обходит необратимую пируваткиназную реакцию и производит фосфоэнолпируват (ФЭП) и другие гликолитические промежуточные продукты из дикарбоксилатов. У хламидий она является единственным связующим звеном между циклом трикарбоновых кислот и гликолитическим путем EMP (рис. 5.5). Теоретически можно предположить, что при наличии ФЭП карбоксикиназы, переносчика глутамата (AaaT), широкоспецифичной дегидрогеназы (DhIE), ферментов ЦТК и EMP-пути, а также PPi-зависимой фосфофруктокиназы хламидии используют глутамат в качестве источника углерода и энергии (McClarty, 1999).

### 5.11. ДЫХАНИЕ

Дыхание играет ключевую роль в регенерации НАД<sup>+</sup> из НАДН. Дыхательная цепь состоит из связанных с мембраной ферментов (дегидрогеназ, редуктаз) и носителей электронов (хиноновый пул). Электроны перемещаются через дегидрогеназы от веществ доноров (НАДН) на хиноновый пул, из которого они через редуктазы передаются акцепторам (O<sub>2</sub>). Важным свойством дыхательных цепей является то, что они генерируют градиент протонного электрохимического потенциала через цитоплазматическую мембрану (Gennis, Stewart, 1996). Этот градиент используется мембранными протеинами для транспорта растворенных веществ и для генерации АТФ. Долгое время считалось, что хламидии не имеют цепи транспорта электронов, поскольку еще в пятидесятых годах было показано, что хламидии (*C. psittaci*), отделенные от клеток хозяина, не способны потреблять кислород, и у них не было обнаружено флавопротеинов и цитохромных дыхательных ферментов (Alien, Vovanick, 1957, 1962). В 90-е годы, благодаря исследованиям метаболизма хламидий и расшифровке генома некоторых представителей *Chlamydiales*, данные представления были пересмотрены. Хламидии обладают



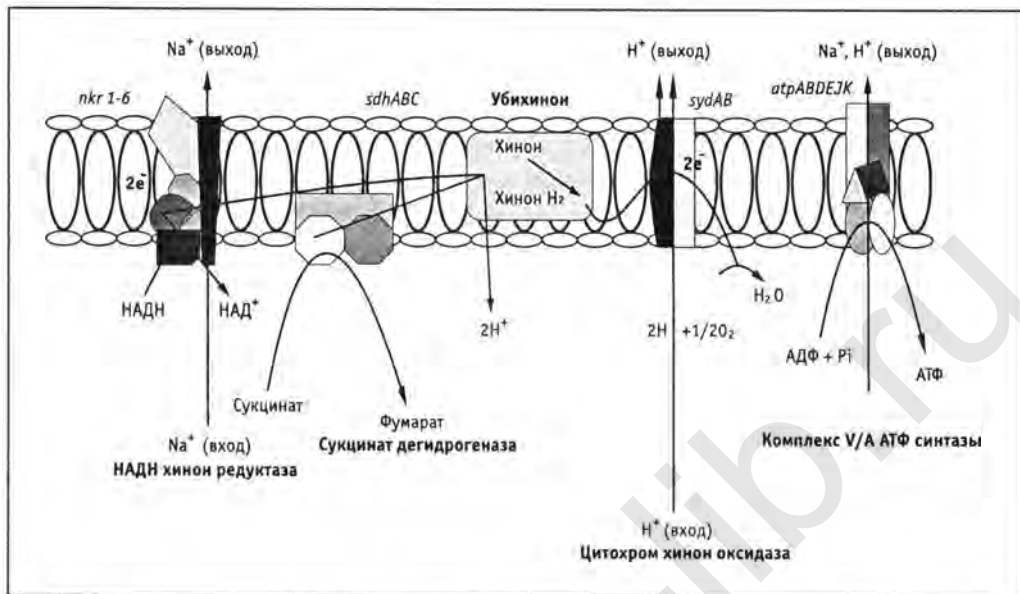


Рисунок 5.6. Гипотетическая схема ферментов дыхательной цепи и комплекса АТФ синтазы у *Chlamydiales*. Показана способность создавать ионный градиент  $H^+$  и  $Na^+$  и использовать его для синтеза АТФ (McClarty, 1999).

всеми компонентами, необходимыми для сборки и функционирования транспортной системы электронов. Гипотетическая схема дыхательной цепи хламидий показана на рис. 5.6.

Хламидии содержат небольшое количество гомологов ферментов биосинтетического пути убихинона. По-видимому, этот жирорастворимый носитель электронов они получают от хозяина. Имеются и другие источники электронов. Сукцинатдегидрогеназа – ключевой фермент цикла трикарбоновых кислот – катализирует реакцию сукцинат  $\Gamma$  фумарат, в результате которой происходит восстановление убихинона. Данный фермент не является связующим звеном дыхательной цепи и при этой реакции не происходит высвобождение протонов (Gennis, Stewart, 1996). Сукцинатдегидрогеназа – сложный фермент, состоящий из трех (у некоторых организмов – четырех) субъединиц. В состав данного фермента входят ковалентно связанные ФАД, железо-сернистый кластер и цитохром b. У хламидий имеются гомологи всех этих субъединиц.

Вероятнее всего, первичным донором электронов у хламидий выступает НАДН, который генерируется в результате цикла трикарбоновых кислот. Геном хламидий содержит гомологи всех шести субъединиц, которые входят в состав сегмента дыхательной цепи, связанного с  $Na^+$ -зависимой НАДН-хинон редуктазой (NQR-1) бактерии *Vibrio alginolyticus*, обнаруживаемой в морской воде (Hayashi et al., 1996; Nakayama et al., 1998). У *V. alginolyticus* все шесть субъединиц кодируются одним *nqr*-опероном,  $\alpha$ -субъединица, кодируемая геном *nqr6*, обладает активностью НАДН гидрогеназы и содержит одну молекулу ФАД на каждую молекулу субъединицы. Данная  $\alpha$ -субъединица прямо участвует в генерации Ду и транслокации  $Na^+$ . Схожие НАДН-хинон редуктазы, которые транспортируют ион  $Na^+$ , были обнаружены у ряда морских грамотрицательных и галофильных бактерий (Unemoto, Hayashi, 1993).

Примечательно, что у хламидий все эти шесть генов не объединены в один оперон. Субъединицы 2, 3, 4 и 5 находятся в одном опероне, тогда как субъединицы 1 и 6 кодируются отдельными генами. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей было обнаружено, что  $\text{Na}^+$ -зависимый NQR-1-комплекс (NDH-1) отличается от соответствующих  $\text{H}^+$ -зависимых ферментов у прокариотов и эукариотов. В отличие от NQR-1 (NDH-1) *E. coli*, данный ферментный комплекс у хламидий, вероятно, является переносчиком  $\text{Na}^+$ , а не  $\text{H}^+$ , если учесть гомологию с *V. alginolyticus* (Harold, Maloney, 1996; Unemoto, Hayashi, 1993). Градиент ионов  $\text{Na}^+$  необходим для функционирования  $\text{Na}^+$ -зависимой транспортной системы аминокислот (*braB* и *dagA*). Данный градиент может быть создан с помощью натрий-зависимой АТФазы или  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -носильщика (antiporter), однако у хламидий нет генов, кодирующих  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -носильщик.

В дыхательной цепи хламидий терминальным акцептором электронов является кислород. Геном хламидий содержит ортологи дыхательных оксидаз – цитохрома bd (*cydA*, *cydB*), которые имеются у *E. coli* (Gennis, Stewart, 1996). Две субъединицы данного фермента кодируются у хламидий одним опероном. Фермент содержит три протетические группы гема: гем b558, гем b559 и гем d. Цитохром bd является хинол оксидазой и местом транслокации одного протона на каждый электрон, участвуя в создании градиента  $\text{H}^+$  (PMF – proton motive force). Из исследований *E. coli* известно, что данный цитохром проявляет максимальную активность при микроаэрофильных условиях (Gennis, Stewart, 1996).

Таким образом, очевидно, что хламидии обладают как  $\text{Na}^+$ , так и  $\text{H}^+$  «насосом», который черпает энергию из окислительно-восстановительных реакций дыхательной цепи. Окисление НАДН с помощью никотин-хинон редуктазы 1 генерирует натриевый и протонный градиент ( $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$  и  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ). Оба градиента участвуют в транспорте растворенных в цитозоле клетки-хозяина питательных веществ. Кроме того, электрохимический потенциал, создаваемый  $\text{H}^+$ -градиентом, используется для синтеза АТФ.

## 5.12. КОМПЛЕКС АТФАЗЫ

Хламидийный геном содержит гомологи комплекса АТФазы V1V0-типа (рис. 5.6). V-АТФаза принадлежит к тому же классу АТФаз, что и более известная F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ синтаза, которая содержится в зубактериях, а также в митохондриях и хлоропластах эукариотов (Finbow, Harrison, 1997; Harold, Maloney, 1996). Главная функция F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ синтазы – использовать градиент ионов  $\text{H}^+$  для синтеза АТФ (окислительное фосфорилирование). V-АТФаза, которая вначале была обнаружена в эндомембранных системах эукариотов, наоборот, создает чрезмембранный  $\text{H}^+$ -градиент путем гидролиза АТФ. Этот градиент нужен для транспорта растворенных веществ и снижения pH внутри эндомембранных систем. В физиологических условиях V-АТФаза эукариотов не может работать в обратном направлении, то есть синтез АТФ за счет  $\text{H}^+$ -градиента невозможен. Однако у *Archaea* была обнаружена АТФаза, близкая по своей первичной структуре к V-АТФазам, но которая, подобно F-АТФ синтазам, синтезирует АТФ. Данная АТФаза получила название А-АТФ синтазы. Примечательно, что гомолог V-АТФазы обнаружен у энтерококков (*Enterococcus hirae*). Данный V-АТФазный комплекс участвует в вытеснении  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}^+$ -АТФаза). Энтерококки содержат также и типичный комплекс F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ синтазы (Solioz, Davies, 1994; Takase et al., 1994).

Комплекс АТФазы у хламидий имеет сходство с АТФазами эукариотных вакуолей, представителей *Archaea* и двух спирохет – *Treponema pallidum* и *Borrelia burgdorferi*. Геном *C. tra-*

*chomatis* имеет один оперон V/A-АТФазы, в состав которого входят семь генов. Порядок расположения генов совпадает с таковым у аналогичного оперона *B. burgdorferi* и у одного из двух оперонов, кодирующих гомолог V-АТФазы у *T. pallidum* (субъединицы E, ORF, A, B, D, I, K) (Fraser et al., 1997; 1998). У обеих спирохет отсутствует транспортная цепь электронов. Функция V-АТФазы заключается в удалении протонов из цитоплазмы, чтобы создать тем самым H<sup>+</sup>-градиент. Этот градиент затем используется H<sup>+</sup>-зависимыми транспортными системами. Вторая V/A-АТФаза, имеющаяся у *T. pallidum*, использует Na<sup>+</sup>-градиент для синтеза АТФ точно так же, как FOF1-АТФ синтаза использует H<sup>+</sup>. В этом *C. trachomatis* проявляет сходство с *T. pallidum*, поскольку хламидии также используют Na<sup>+</sup>-градиент для синтеза АТФ, так как имеют никотин-хинон редуктазу 1. Подобные сходства казалось бы отдаленных друг от друга в эволюционном смысле бактерий, возможно, объясняют некоторые сходные черты патогенеза хламидиоза и сифилиса – хронический характер течения с чередованием активных и латентных фаз и склонностью к персистенции (Чеботарев, 2002).

Протеолипидная субъединица К комплекса АТФазы вовлечена в транслокацию H<sup>+</sup> и играет ключевую роль в том, как будет функционировать данный комплекс – как АТФаза или/и как МТА синтаза (Hilario, Gogarten, 1998). Протеолипидная субъединица V-АТФаз так же, как и некоторых А-АТФаз, приблизительно в два раза больше, чем протеолипидная единица, обнаруживаемая в FOF1-АТФазы. Это увеличение размеров является результатом дубликации и слияния генов. Важные химические группы протеолипида, связанные с функционированием F-АТФ синтазы, были заменены в результате эволюции (что привело к возникновению протеолипида V-АТФазы) либо сохранились, как в случае А-АТФазы/синтазы архаичных микроорганизмов (*Archaea*). Предположение о потенциальной способности комплекса V/A-АТФазы хламидий функционировать в качестве АТФ синтазы, обосновывается анализом первичной структуры различных протеолипидных субъединиц (McClarty, 1999). Этот анализ показывает, что у хламидий, как и у *Archaea*, химические группы, необходимые для функционирования комплекса АТФазы в качестве АТФ синтазы, сохранены. Таким образом, хламидии способны осуществлять реакции окислительного фосфорилирования, используя Na<sup>+</sup>- и/или H<sup>+</sup>-градиент для синтеза АТФ.

\*\*\*

В последние годы изучение метаболизма и расшифровка генома некоторых представителей семейства *Chlamydiales* заставили пересмотреть укоренившиеся взгляды на хламидии как на бактерии-ауксотрофы с весьма ограниченными метаболическими возможностями (McClarty, 1999), что является причиной (или следствием) их облигатного внутриклеточного паразитизма. Оказалось, что наряду с внеклеточными бактериями, хламидии обладают рядом метаболических путей, превышая метаболические возможности свободноживущих бактерий, имеющих небольшой геном – *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi*. Это касается синтеза жирных кислот, кофакторов, цикла трикарбоновых кислот и цепи транспорта электронов. Почему же все-таки хламидии, в отличие от вышеперечисленных бактерий, являются облигатными внутриклеточными паразитами? И можно ли в принципе создать бесклеточную среду для роста хламидий? Однозначного ответа на эти вопросы пока нет. Возможно установление природы сигналов, регулирующих превращение элементарных телец в ретикулярные и обратно, прольет свет на эти фундаментальные вопросы биологии хламидий.

Хламидии весьма ограничены в способности синтезировать и утилизировать нуклеотиды. По сути, они являются ауксотрофами нуклеотидов. Низкая концентрация нуклеотидов в межклеточной среде и высокая в цитозоле эукариотных клеток вынуждает хламидии быть внутриклеточными паразитами. Кроме того, хламидии должны получать извне глюкозо-6-фосфат и глютамат для своей жизнедеятельности. Теоретически можно создать достаточные концентрации этих веществ в бесклеточной питательной среде, хотя это чрезвычайно трудно, исходя из их нестабильности. Создание бесклеточной системы роста хламидий позволило бы провести экспериментальные исследования по метаболизму, изучить свойства продуктов генов, а также механизмы действия этиотропных препаратов.

## ГЛАВА 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ

Хламидийная инфекция представляет собой весьма разнообразную группу болезней (более 20), вызванных представителями *Chlamydiales*. Ее значение в инфекционной патологии человека определяется длительным персистирующим течением, постепенно развивающимися многоочаговыми поражениями систем и органов и их медико-социальными последствиями (Мавров, 1982; Шаткин, Мавров, 1983; Мавров, 1994; 2001; Schachter, 1999).

Хламидиоз – одна из наиболее распространенных инфекций человека. Только *C. pneumoniae* инфицировано 60–70% населения земного шара, хотя в подавляющем большинстве случаев инфекция протекает бессимптомно. (Grayston et al., 1992). *C. trachomatis* вызывает трахому, в зоне эндемического распространения которой живет 400 миллионов человек. Трахома является главной причиной приобретенной слепоты в современном мире, которой можно было бы избежать при своевременном лечении. Считается, что в мире живет не менее 6 миллионов слепых в результате трахомы (Thylefors et al., 1995). *C. trachomatis* является самым распространенным бактериальным патогеном среди болезней, передающихся половым путем (World Health Organization, 1996).

Представители *Chlamydiales* вызывают разнообразную патологию у широкого спектра животных – млекопитающих, сумчатых, птиц и одноклеточных амёб. Некоторые из зоонозных хламидий могут также вызывать инфекции у людей (*Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila psittaci*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila abortus*, *Waddlia chondrophila*). Особое место в патологии человека принадлежит *C. psittaci*, вызывающей пситтакоз (орнитоз). Как было установлено в результате обширных полевых исследований, *C. psittaci* поражена значительная часть популяции многих видов диких птиц (Meyer, 1967; Ксенц, Ксенц, 1990; Herrmann et al., 2000). У большинства птиц в естественных условиях инфекция протекает бессимптомно, поскольку птицы с клиническими проявлениями в природе быстро погибают. При массовой ловле и перевозке диких птиц равновесие между паразитом и хозяином нарушается, и могут возникнуть вспышки заболевания с последующим заражением людей.

*Chlamydophila pneumoniae* вызывает вялотекущую пневмонию у людей при скученности (военнослужащие, студенты и т.д.). У детей и пожилых людей, истощенных сопутствующими заболеваниями, течение хламидийной пневмонии может приобретать тяжелый характер. Часто наблюдается смешанное инфицирование с *Mycoplasma pneumoniae*. Финский исследователь



P. Siakku первым высказал предположение, что *C. pneumoniae*, возможно, играет роль пускового механизма в развитии атеросклероза (Saikku et al., 1988; Saikku et al., 1992). У больных атеросклерозом обнаруживаются более высокие титры антител. В пораженных сосудах обнаруживаются антигены и ДНК хламидий (Kuo et al., 1993; Mavrov et al., 1994; Рудык, 2002).

## 6.1. ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

### 6.1.1. Клинико-эпидемиологические особенности уrogenитальных хламидиозов

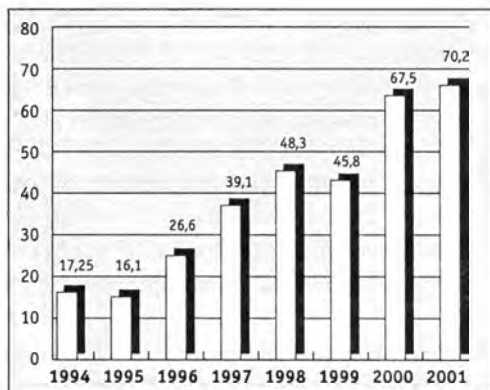
Уrogenитальные хламидиозы представляют группу заболеваний, вызываемых *Chlamydia trachomatis* и передаваемых половым путем. Уrogenитальная хламидийная инфекция чаще всего проявляется (Шаткин, Мавров, 1983):

- у мужчин — уретритом, простатитом, эпидидимитом, орхитом, бесплодием, венерической лимфогранулемой, болезнью Рейтера, конъюнктивитом, спорадической трахомой, проктитом, фарингитом;
- у женщин — цервицитом, уретритом, циститом, бартолинитом, эндометритом, сальпингитом, пельвиоперитонитом, перигепатитом, бесплодием, венерической лимфогранулемой, болезнью Рейтера, конъюнктивитом, спорадической трахомой, фарингитом, проктитом;
- у детей (в том числе новорожденных) — конъюнктивитом, спорадической трахомой, ринитом, назофарингитом, отитом, пневмонией, вульвовагинитом, гастроэнтеритом, проктитом.

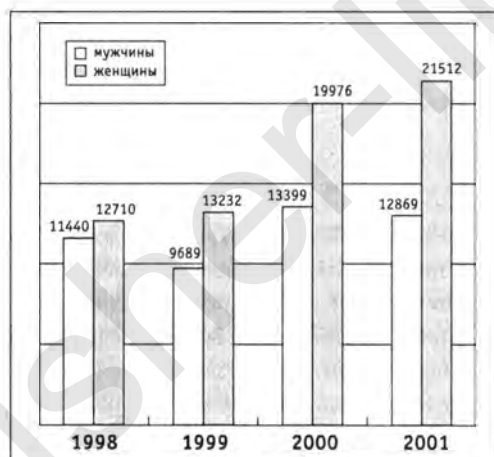
По данным Всемирной Организации здравоохранения, в мире ежегодно вновь заражается *C. trachomatis* половым путем 90 миллионов человек (World Health Organization, 1996). Из них 4 миллиона до недавнего времени выявлялись на территории США (Centers for Disease Control and Prevention, 1993). В последние годы благодаря программам массового скрининга и лечения генитального хламидиоза среди подростков, беременных женщин и женщин, прерывающих беременность, а также среди военнослужащих и заключенных удалось существенно снизить заболеваемость хламидиозом в США (за 7 лет более чем в пять раз). Так, в 2000 году в США зарегистрировано 702093 случая генитального хламидиоза (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Однако среди некоторых групп населения США распространенность хламидиоза выросла. Так, среди мужчин-гомосексуалистов в Сиэтле (штат Вашингтон), распространенность хламидиоза увеличилась в два раза (с 4,0% в 1994 году до 7,6% в 1999). Показано, что среди данной популяции больных хламидиозом наиболее часто циркулировали серовары *C. trachomatis* G (47,9%) и D (29,6%) (Geisler et al. 2002).

Уrogenитальный хламидиоз получил широкое распространение в государствах, ранее входивших в состав СССР. Анализ заболеваемости показывает, что в Украине из года в год увеличивается количество вновь зарегистрированных случаев хламидиоза (Mavrov, Bondarenko, 2002) (рис. 6.1).

По данным Министерства здравоохранения Украины, с 1993 по 1998 год в Украине количество инфицированных *C. trachomatis* мужчин увеличилось на 62,5%, а женщин — на 107% (Vinograd, 2000). В 1998 году в Украине было зарегистрировано 11 440 мужчин и 12 710 женщин, больных уrogenитальным хламидиозом (всего 24150). В 2001 году было



**Рисунок 6.1.** Интенсивный показатель заболеваемости урогенитальным хламидиозом в Украине. Количество ежегодно регистрируемых случаев в пересчете на 100 000 населения (Данные Министерства здравоохранения Украины).



**Рисунок 6.2.** Абсолютные ежегодные цифры регистрации урогенитального хламидиоза в Украине в 1998-2001 годах. Среди мужчин количество заболевших увеличилось на 12,5%, а среди женщин – на 69,3% (в 5,5 раза быстрее). (Данные Министерства здравоохранения Украины).

зарегистрировано 34 381 больных хламидиозом (12 869 мужчин и 21 512 женщин). В пересчете на интенсивный показатель заболеваемости (на 100 000 населения) это составило: всего – 70,2; мужчины – 56,5; женщины – 81,9. За 1999-2001 годы частота регистрируемых случаев хламидийной инфекции в целом по Украине увеличилась на 42,4% (среди мужчин на 12,5%, а среди женщин – на 69,3%). Таким образом, рост заболеваемости среди женщин происходил в 5,5 раза быстрее. Цифры абсолютной регистрации хламидиоза в Украине говорят о том, что в последние годы количество заболевших вырастает, в основном, за счет женщин (рис. 6.2).

Есть основания полагать, что данная статистика не вполне отражает распространенность хламидиоза в Украине. Регистрация его не полная. Об этом свидетельствует крайне неравномерное распределение заболеваемости по регионам (Гутнев, 2002) (табл. 6.1).

Естественно, какими бы ни были различия между регионами (например, между Херсонской и Черниговской областями), распространенность урогенитального хламидиоза в этих областях не может отличаться в 1792 раза! Все дело в наличии необходимой лабораторной диагностики и в выполнении приказов об обязательной регистрации хламидиоза в каждом конкретном регионе.

По данным Института дерматологии и венерологии АМН Украины, хламидии выявляются у 50-60% мужчин, больных уретритом, у 80% – эпидидимитом, у 15% – простатитом. Эти микроорганизмы выявляются у 40% женщин с различными гинекологическими заболеваниями. Около 30% женщин, посещающих кожно-венерологические учреждения, имеют цервицит или уретроцистит, вызванный хламидиями, а у имеющих половых партнеров – мужчин с воспалительными поражениями мочеполовых органов, частота их обнаружения достигает 40-70% (Кутовая, 1987; Соколов, 1990; Мавров, 1994). По данным Виноград (2000), среди женщин с воспалительными проявлениями со стороны мочеполовых органов хламидийная инфекция обнаруживалась в западных регионах Украины в 46% случаев и у 39% мужчин с уретритами. Среди доноров серологические маркеры хламидиоза обнаруживаются в 2-5% случаев.

В России *Chlamydia trachomatis* инфицирована значительная часть населения всех возрастов. В 1998 году в Российской Федерации было зарегистрировано 166111 больных генитальным хламидиозом (Аковбян, Gomborg, 2000; Кубанова, 2002). Заболеваемость в целом по России в 1995 году составила 90,2 на 100000 населения, в 2000 году – 126,2 (рост на 40%). (рис. 6.3).

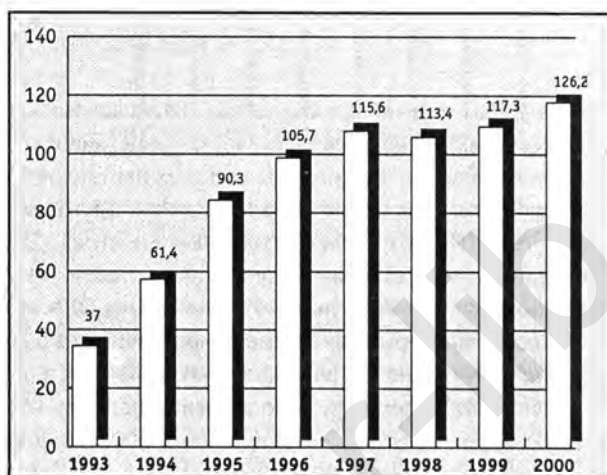
Соотношение заболевших мужчин и женщин примерно 1:2. Наибольшая заболеваемость в возрастной группе 20-29 лет. В 1998 году она составила 259 на 100000 среди мужчин и 490 – среди женщин. В отдельных регионах заболеваемость хламидиозом может значительно превышать средние данные по стране. Так, в Новосибирске в 1999 году заболеваемость урогенитальным хламидиозом составила 317 на 100000 всего населения (Khryanin,

Таблица 6.1.

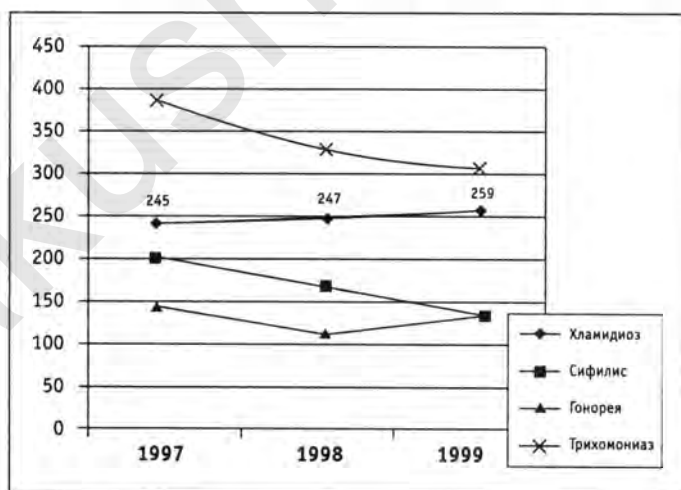
**Заболеваемость хламидийными инфекциями, передаваемыми половым путем в некоторых областях Украины в 2000 году (Данные МЗ Украины, 2001).**

Регион	Всего		Мужчины		Женщины	
	Абс. число	На 100 тыс.	Абс. число	На 100 тыс.	Абс. число	На 100 тыс.
Украина	33375	67,5	13399	58,3	19976	75,4
Киев	5927	227,8	1794	146,7	4133	299,8
Херсонская обл.	4384	358,3	999	174,5	3385	520,0
Севастополь	1424	365,5	650	356,1	774	373,8
Черниговская обл.	3	0,2	1	0,2	2	0,3
Сумская обл.	25	1,9	17	2,8	8	1,1
Черкасская обл.	54	3,7	12	1,8	42	5,3
Кировоградская обл.	46	4,0	29	5,5	17	2,7

Reshetnikov, 2000). Динамику заболеваемости хламидиозом, в сравнении с сифилисом, гонореей и трихомонозом, можно проследить на примере данных по Санкт-Петербургу – второму по величине городу России с населением более 5 миллионов человек (рис. 6.4). Хламидиоз в Петербурге является вторым по частоте регистрации венерическим заболеванием после трихомоноза (Savitcheva et al., 2000). В 1999 году на хламидиоз в Петербурге было обследовано 56575 пациентов. У 12242 (21,6%) была установлена инфекция.



**Рисунок 6.3.** Интенсивный показатель заболеваемости урогенитальным хламидиозом в России. Количество ежегодно регистрируемых случаев в пересчете на 100000 населения (Данные Министерства здравоохранения России).



**Рисунок 6.4.** Интенсивный показатель заболеваемости хламидиозом, сифилисом, гонореей и трихомонозом в Санкт-Петербурге. Количество ежегодно регистрируемых случаев в пересчете на 100000 населения (Данные Министерства здравоохранения России).



Исследования распространенности хламидийной инфекции в странах бывшего СССР многочисленны. Это в основном данные обследования лиц, обратившихся за помощью в специализированные учреждения: кабинеты анонимного обследования и лечения, центры планирования семьи, гинекологические клиники, детские кабинеты при кожно-венерологических диспансерах и детских поликлиниках. В России частота выявления *C. trachomatis* у пациентов кабинетов анонимного обследования составляет 3-24% (Ремезов и соавт., 1995; Никулин и соавт., 1998). Амозов и соавт. (1997) выявили хламидиоз у 20% мужчин и у 13% женщин в анонимном кабинете. У гинекологических больных с воспалительными заболеваниями хламидиоз диагностировался российскими авторами у 23-40% (Коршунова, 1993; Малинина, 1997). У девочек и мальчиков (до 14 лет) с воспалительными процессами мочеполовой сферы хламидии были обнаружены у 62% и 87% соответственно, а у детей дошкольного и раннего школьного возраста – у 11% и 6% соответственно (Богданова и соавт., 1998; Малова, 1999). Малова и Сокольников (2001) выявили хламидиоз у 126 (67,4%) из 187 мальчиков в возрасте до 12 лет, обратившихся в детский кабинет УГИ за 3 года. Доля смешанной хламидийной инфекции у мальчиков составила 38,9%. У 25 (19,8%) мальчиков хламидийная инфекция УГТ протекала бессимптомно.

Вышеприведенные статистические данные не отражают истинной распространенности хламидийной инфекции в общей популяции. Скрининговых исследований среди населения России и других стран бывшего Советского Союза крайне мало (Прилепская, 1998). Было проведено репрезентативное выборочное популяционное исследование распространенности инфицирования *C. trachomatis* среди жителей Новосибирска. При помощи иммуноферментного анализа определялись сывороточные маркеры (IgM и IgG). У 18,6% взрослого населения Новосибирска выявлен высокий уровень серопозитивности, что свидетельствует о текущем инфицировании *C. trachomatis* либо об инфекции, имевшей место в прошлом. Частота выявления ранних антихламидийных антител класса IgM у женщин (15%) – в 2 раза выше, чем у мужчин (7,8%). Отмечалось значительное превышение частоты выявления *C. trachomatis* у лиц, родившихся в 1930-1949 гг., по сравнению с лицами, родившимися в 1950-1969 гг. Обнаружена закономерность в выявлении антихламидийных антител в зависимости от месяца обследования: пик регистрации повышенных титров IgM-антител к *C. trachomatis* приходился на июль-сентябрь (Хрянин и соавт., 2001).

В Азербайджане, среди жителей Баку, *C. trachomatis* инфицировано более 10% населения. Отмечено, что возрастная структура больных хламидиозом женщин и мужчин сходная. В обеих половых группах преобладают лица в возрасте 30-39 и 40-49 лет. Максимальная частота выявления хламидийной инфекции отмечалась среди бесплодных супружеских пар и больных с урологическими заболеваниями. Отмечен высокий уровень хламидиоза среди беременных женщин и новорожденных детей (Джавад-Заде, 2000). В Белоруссии мочеполовой хламидиоз регистрируется с 1996 года, когда было выявлено 2382 случая. В 1997 зарегистрировано 2995 случаев, в 1998 – 3691, а в 1999 – 4897. Рост за три года – более чем на 50% (Karabanov et al., 2000). Учитывая, что население Белоруссии составляет примерно 10 миллионов человек, интенсивный показатель заболеваемости сравним с Украиной (около 50 на 100 000). В Эстонии хламидийная инфекция подлежит регистрации с 1991 года. С этого времени по 1995 год количество регистрируемых случаев резко возрастало (с 26,8 до 360,4 на 100 000 населения). Это связано, прежде

всего, с возрастанием возможностей лабораторной диагностики и развитием системы тотального медицинского страхования в стране (Poder, 2000). В последние годы наступила стабилизация заболеваемости на относительно высоком уровне: 234,8 – в 1999 году.

В восточной Европе заболеваемость хламидиозом довольно высокая. В Румынии в 1988-1996 гг. обследовали 2230 пациентов (проживающих в Бухаресте) с генитальными инфекциями. Частота выявления *C. trachomatis* – 33,8%. Наибольший процент инфицированных хламидиями составили больные с клиническими признаками цервицита (56,2%) и негонококковыми уретритами (36%), а также пациенты в возрасте 31-35 лет, холостые, имевшие в анамнезе инфекции мочеполовых путей (Vizitiu et al, 1996). В Польше инфекция, вызванная *Chlamydia trachomatis*, не подлежит регистрации. В стране с 1979 года регистрируются негонококковые уретриты. В 1998 году было зарегистрировано 2229 случаев негонококкового уретрита. По оценкам Dajek (2000), не менее 50% из них – хламидийной этиологии. Количество выявляемых случаев хламидиоза от общего числа обследованных снизилось с 1993 по 1999 год с 11,6% до 3,8%, что может косвенно свидетельствовать об уменьшении распространенности. В Венгрии все беременные подлежат скринингу на хламидиоз. Из менее чем 10000 обследованных на хламидиоз в 1998 году инфекция выявлена у 6,3% (Deak and Nagy, 2000).

Источником возбудителя урогенитальных хламидиозов являются инфицированные хламидиями мочеполовые органы человека, представляющие естественную среду обитания *Chlamydia trachomatis* (размножается в клетках столбчатого эпителия слизистой оболочки). Разносчиками инфекции служат мужчины и женщины как с манифестными, так и с бессимптомно протекающими формами хламидиоза. Наибольшая частота персистентных или латентных форм инфекции, не сопровождающихся клиническими симптомами, определяется у женщин при локализации хламидий в канале шейки матки. Инфекцию чаще всего распространяют невыявленные, нелеченные или неправильно леченные больные с вялотекущими воспалительными процессами или вообще без таковых.

Хламидийная урогенитальная инфекция передается половым путем. Как и при других инфекциях, большое значение в распространении урогенитальной хламидийной инфекции имеет половое поведение. Хламидийные уретриты у мужчин возникают более чем в 60% случаев после случайных половых сношений. Частота хламидийных цервицитов у женщин, имеющих беспорядочные половые связи со многими партнерами, в 26 раз превышает число случаев цервицита той же этиологии среди женщин, имеющих одного полового партнера и избегающих случайных половых связей (Мавров, 2001). Неполовой путь передачи (загрязненные инфицированными выделениями руки, белье, предметы туалета) существенного эпидемиологического значения не имеет, хотя и требует учета. У инфицированных мужчин первично поражается мочеиспускательный канал, а затем и другие органы (предстательная железа, семенные пузырьки, придатки). У инфицированных женщин чаще всего поражается канал шейки матки, после чего может возникнуть и восходящая инфекция, захватывающая матку, маточные трубы, яичники, а также брюшину. Низкое расположение наружного отверстия мочеиспускательного канала, узкое влагалище, особенно у нерожавших женщин, создают условия для первичного инфицирования парауретральных протоков и крипт. Хламидии из мочеиспускательного канала способны проникать в мочевой пузырь, вызывая цистит. Отмечена также возможность заноса хламидий с выделениями из шейки матки в прямую кишку. При перверсных половых сношениях передача хламидийной

инфекции происходит орогенитальным и аногенитальным путями. Хламидийные фарингиты и проктиты у гетеросексуальных партнеров, а также проктиты у мужчин-гомосексуалистов особенно часто характеризуются клинически бессимптомным течением.

Следует отметить, что достоверных данных о естественной невосприимчивости к урогенитальной хламидийной инфекции или о возникновении эффективного иммунитета после излечения не имеется. Нет также объективных сведений о роли других, ранее перенесенных хламидийных инфекций, в том числе и генерализованных хламидиозов человека, на восприимчивость к урогенитальному инфицированию. В то же время доказана возможность возникновения реинфекции у лиц, продолжающих половые сношения со случайными партнерами, а также рецидивов инфекции как следствия неадекватной терапии.

Показатели частоты урогенитальных хламидиозов у мужчин и женщин зависят от социокультурных факторов и стереотипов полового поведения в данной популяции. Согласно количественным характеристикам выявленных случаев хламидиоза в Украине, можно отметить, что соотношение между мужчинами и женщинами, инфицированными хламидиями, составляет примерно 3:5. Возрастные показатели заболеваемости свидетельствуют о преимущественном распространении хламидийной инфекции у мужчин и женщин от 20 до 35 лет. Отмечается и тенденция к увеличению заболеваемости у женщин более молодого возраста, что связано с изменениями в сексуальном поведении этой группы населения. Если в начале 80-х годов средний возраст больных хламидиозом был равен 25 годам, то в конце 90-х он составил для мужчин 22,5 и для женщин – 21,2 года (Мавров, 2001). Участились случаи хламидиоза у детей, не достигших половой зрелости, особенно уретритов у мальчиков и вагинитов, цервицитов и проктитов у девочек (при исключении полового пути передачи инфекции). Подобные случаи являются результатом персистентной инфекции, приобретенной в перинатальный период, при прохождении через родовые пути.

Нет единого мнения в отношении влияния на вероятность заражения и тяжесть клинического течения урогенитальных хламидиозов таких факторов, как противозачаточные средства, менструальный цикл, беременность. В то же время известно, что в экспериментальных условиях экзогенные гормональные препараты стероидного ряда способны активировать хламидийную инфекцию. При приеме контрацептивных препаратов в период между 1-й и 4-й неделями менструального цикла повышается частота выделения хламидий в культуре клеток из шейки матки. Имеются данные об увеличении риска развития негонококковых воспалительных заболеваний органов малого таза при использовании в качестве противозачаточных средств внутриматочных спиралей (Mardh, 1987).

### 6.1.2. Уретрит

Наибольшее распространение имеет первичный хламидийный уретрит, составляющий среди уретритов у разных групп мужчин в экономически развитых странах от 25% до 70%. Этиологическим агентом у 20-60% мужчин, больных венерическими уретритами в Украине, является *C. trachomatis* (Мавров, 1990). Постгонорейные уретриты имеют хламидийную этиологию в 60-70% случаев (Соина и соавт, 1989; Zhao, 1991). В 28-40% наблюдений хламидии обнаруживают у больных трихомонозом (Делекторский и соавт. 1989), в 20-70% – у больных гонореей (Бакалова, 1992; Милтинш, Раджус, 1983; Harms et al. 1994). Хламидии, сочетаясь с патогенными микроорганизмами другой природы (*Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*),

нередко являются одним из возбудителей уретритов смешанной этиологии. Хламидийно-гонококковый уретрит у мужчин выявляется у 10-40% больных с первичным диагнозом гонореи. От 20% до 76% постгонорейных уретритов имеют хламидийную этиологию (Мавров, 2001). Хламидиоз у больных ранними формами сифилиса выявляется более чем в 20% случаев (Мавров, Бондаренко, 1996; Бондаренко, 1996). Более чем у 50% больных хламидии вступают в ассоциации с другими возбудителями венерических инфекций. В частности, у 49,3% – с гонококками, у 38% – с микоплазмами, у 32% – с трихомонадами, у 25,2% – с вирусом герпеса (Мавров, 1988; Бондаренко, 2000). Способствует такому состоянию постоянный обмен возбудителями венерических инфекций. Это необходимо учитывать при диагностике и назначении лечения.

### 6.1.3. Простатит, эпидидимит

Хламидийный уретрит нередко осложняется восходящей инфекцией, являясь причиной 20-40% хронических простатитов (Ильин и соавт., 1991; Шаткин, Мавров, 1983; Maruta 1992). Хламидийному уретриту часто сопутствует простатит, признаки которого при целенаправленном обследовании больных выявляются у 30-40% больных хламидиозом. Клиника уретропростатита является весьма характерной для хламидийных поражений мочеполовых органов у мужчин. У 15% мужчин одновременно с хламидийным уретритом и простатитом выявляется везикулит. Частым проявлением урогенитального хламидиоза у мужчин является и хламидийный эпидидимит. По данным Hoosen et al (1993), этиологической причиной острых эпидидимитов в 34% случаев является *C. trachomatis*. При гистологическом исследовании препаратов, взятых от больных хламидийным эпидидимитом, установлено, что воспалительный процесс характеризуется деструктивными процессами с активной пролиферацией (Hori, Tsutsumi, 1995). Достоверная этиологическая взаимосвязь хламидий с острым эпидидимитом или орхоэпидидимитом у мужчин моложе 35 лет была установлена многочисленными исследованиями, и она может достигать до 85% случаев. При сочетании или последовательном возникновении везикулита, простатита, дифферентита, эпидидимита и орхита развиваются нарушение половой функции и патологические изменения эякулята. У каждого пятого больного, перенесшего эпидидимит, развивается вторичное бесплодие (Мавров, 1991; Hipp, Alfold, 1982). На ультраструктурном уровне была показана возможность хламидий прикрепляться к головке, шейке и проксимальной части талии сперматозоидов. Эти исследования объясняют роль сперматозоидов как переносчиков хламидийной инфекции в матку, маточные трубы и брюшную полость (Patton et al. 1993; Мавров, 1995).

### 6.1.4. Воспалительные заболевания половых органов у женщин

Хламидийная инфекция обнаружена у 30-40% женщин, страдающих воспалительными заболеваниями мочеполовой системы (Мавров, 1994). *C. trachomatis*, обладая выраженным тропизмом преимущественно к цилиндрическому и переходному эпителию, из канала шейки матки распространяется на полость матки, вызывая восходящую инфекцию (Шатилов, 1994). По данным различных авторов, *C. trachomatis* обнаруживали в эндометрии в 2,5-17,3% случаев (Elias et al. 1996; Stern et al. 1996), в фаллопиевых трубах при острых и хронических сальпингитах – в 13-48,1% случаев (Bevan et al. 1995). Показана роль хламидий в этиологии вагинитов, бартолинитов, проктитов. Определена роль *C. trachomatis* в развитии



пельвиоперитонита и перигепатита (синдром Фитца-Хью-Куртиса) (van der Laan et al, 1995). При обследовании пациентов с хламидийными конъюнктивитами у 54% мужчин и 74% женщин была обнаружена урогенитальная хламидийная инфекция. При этом у 70% этих же мужчин и у 80% женщин она была бессимптомной (Postema et al 1996). Инфицирование хламидиями шейки матки и мочеиспускательного канала достоверно установлено у 30% половых партнерш мужчин с уретритом. Хламидийная инфекция шейки матки выявляется более чем у 70% половых партнерш мужчин с хламидийным уретритом. Цервициты хламидийной этиологии определяются у 12-60% пациенток венерологических учреждений, у 20% гинекологических больных и у 2-14% женщин при профилактических обследованиях (Barnett, Brundage, 2001). При смешанном инфицировании половых органов у больных установлена значительная частота хламидийно-гонорейных (до 63%), хламидийно-трихомонадных и хламидийно-кандидозных инфекций шейки матки.

Шейка матки является наиболее частым первичным очагом урогенитальной хламидийной инфекции у женщин. *C. trachomatis* обычно не размножается в многослойном сквамозном эпителии влагалища, обладая выраженным тропизмом к столбчатому (цилиндрическому) эпителию. Однако нельзя исключить возможность инфицирования хламидиями влагалищной части шейки матки и влагалища под влиянием гормональных и травматических факторов (Paavonen, Lehtinen, 1996). *C. trachomatis* была выявлена у 20% женщин с бактериальным вагинозом (Joesoef et al, 1996; Keane et al, 1997; Morris et al 2001). Хламидийный эндоцервицит часто сочетается с хламидийным уретритом. Установлена хламидийная инфекция парауретральных протоков и складок по бокам наружного отверстия мочеиспускательного канала (крипт), а также хламидийная этиология бартолинитов (Мавров и соавт., 1982).

Хламидийную этиологию эндометритов установили P. Mardh et al (1981). При экспериментальном моделировании на обезьянах и клинико-лабораторном изучении урогенитальной инфекции доказано каналикулярное (по эндометрию) распространение хламидий из шейки матки в маточные трубы (Meller, Mardh, 1980). Gump et al. (1981) описали хламидийный эндометрит у женщины, перенесшей спонтанный аборт. Ранее было установлено достоверное повышение риска развития родовой лихорадки и послеродового эндометрита у женщин, инфицированных хламидиями (Wager et al., 1980).

### 6.1.5. Рак шейки матки

Существует предположение, согласно которому половое инфицирование *C. trachomatis* связано с образованием цервикальных опухолей. При обследовании женщин с дисплазией шейки матки и карциномой *C. trachomatis* обнаружили в 21% случаев (Kharsany et al. 1993.). Получены серозидемиологические доказательства того, что инфекция, вызванная *C. trachomatis*, является фактором риска развития плоскоклеточного рака шейки матки. Koskela et al (2000) проведено проспективное серозидемиологическое исследование с участием 530000 женщин. При сопоставлении данных 3 банков сывороток крови и зарегистрированных случаев раковых заболеваний показано, что приблизительно за 5 лет, прошедших после забора образцов сывороток, в Финляндии, Норвегии и Швеции были выявлены 182 женщины с инвазивной цервикальной карциномой. Выявление антител к *C. trachomatis* ассоциировалось с повышенным риском развития плоскоклеточного рака. Не выявлено корреляции между возникновением рака и наличием антител к *C. pneumoniae*. Anttila et al (2000) получены серозидемиологические доказательства существования ассоциации между предшествовавшей хламидийной инфекцией

и возникновением карциномы яичника. Продемонстрирована повышенная частота обнаружения антител к *C. trachomatis* у пациенток с эндометриозом. В недавних исследованиях финских авторов *Chlamydia trachomatis*, серотип G наиболее прочно ассоциируется с карциномой шейки матки. Одновременное инфицирование серотипами I и D еще больше увеличивает риск заболеть раком шейки матки (Schachter, 2000; Anttila et al, 2001).

### 6.1.6. Реактивные артриты (спондилоартропатии)

Инфицированные *C. trachomatis* мочеполовые органы также являются источником возбудителя хламидийных инфекций человека другой локализации. Болезнь Рейтера (урোসиновидный или уроокулосиновидный синдром) вызывают хламидии, которые первично поражают мочеполовые органы (уретрит, простатит, цервицит), суставы, и в ряде случаев – конъюнктиву. Следует особо выделить этиологическую роль хламидий при болезни Рейтера, когда их выделяют из урогенитального тракта у 60-80% больных (Мавров, 1997). Согласно литературным данным (Ковалев, Ильин, 1993), у 4-6% мужчин, больных хламидийным уретритом, развивается болезнь Рейтера, или уроокулосиновидный синдром, протекающий с тяжелым рецидивирующим поражением суставов. Этиологическая взаимосвязь хламидий со спорадической формой болезни Рейтера (более чем в половине случаев) устанавливается выделением этих микроорганизмов из мочеиспускательного канала, суставов и конъюнктивального мешка больных, а также выявлением серологических показателей хламидийной инфекции и экспериментальным моделированием (Шубин и соавт. 1986; Панасюк и соавт. 1998). В последние годы, в связи с применением высокочувствительных и специфических методов молекулярной диагностики (полимеразная цепная реакция, лигазная цепная реакция), появились сообщения об обнаружении хламидийной ДНК и РНК в синовиальной ткани и суставной жидкости у таких больных (Taylor-Robinson et al. 1992; Gaston, 2000; Гастон, 2001). Путь распространения хламидий из мочеполовых органов в суставы определяется как «метастатический», а развитие суставной патологии рассматривается в связи с генетической предрасположенностью. По биологическим и антигенным свойствам хламидии, вызвавшие этот синдром, отличаются от большинства урогенитальных штаммов, выделяемых при локализованных воспалительных процессах в мочеполовой системе. Видимо, с этим связано возникновение патологии лишь у 2-4% больных НГУ (Шубин и соавт. 1986; Панасюк и соавт. 1998).

В последние годы наблюдается заметное учащение реактивных артритов хламидийной этиологии. Болезнь Рейтера стала самой частой формой острых полиартритов у мужчин сексуально активного возраста. Впрочем, она встречается и у женщин, детей и лиц преклонного возраста (Мавров, 1997). В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины проблемы поражений опорно-двигательного аппарата, связанные с хламидийной инфекцией, изучаются с конца 70-х годов. Накоплены данные по диагностике, клинике и течению, разработаны оригинальные методы терапии этого заболевания, реабилитации больных. Получены новые данные, касающиеся нарушений кальциевого обмена у пациентов с болезнью Рейтера. Установлено, что в период обострения заболевания наблюдается достоверно повышенный уровень кальция в эритроцитах, снижение его экскреции с мочой на фоне нормального уровня в плазме крови, по сравнению с практически здоровыми лицами (Савоськина, 1993). Изучение состояния обмена антагонистов кальция-магния и фосфора показало, что в период обострения болезни Рейтера наблюдается дефицит магния, который выражается в снижении его суточной экскре-

ции с мочой, снижении Mg/Ca-коэффициента мочи и Mg/Ca-соотношения в эритроцитах. Такие нарушения происходили на фоне снижения экскреции фосфора с мочой у обследованных больных. При исследовании уровня кальций-регулирующих гормонов (паратормона и кальцитонина) в плазме крови больных наблюдается достоверное повышение уровня этих гормонов (Мавров и соавт., 1998). Полученные данные указывают на тот факт, что при болезни Рейтера в ходе развития патологического процесса происходит перестройка систем гомеостаза кальция. Она влечет за собой изменения в метаболических реакциях организма, требующих терапевтической коррекции. При рентгенологическом исследовании пораженных суставов выявлены: у 68% больных – диффузный остеопороз; у 44% – периостальные наслоения; у 36% – деформирующий артроз; у 32% – увеличение объема периартикулярных тканей; у 12% – сужение межсуставных щелей; у 8% – очаговый остеопороз; у 8% – кистоподобное просветление в эпифизах; у 6% – вывих и подвывих мелких суставов стоп и кистей.

У женщин эта патология диагностируется реже, однако в последние годы участились случаи реактивной спондилоартропатии у женщин, больных хламидиозом. Lange et al (1998) обследовали на инфекции мочеполовых путей 32 женщин с анкилозирующим спондилитом и 33 женщин такого же возраста, страдающих болезнью Крона (терминальный илеит). Наличие уретрита обнаружили у 15 из 32 пациенток с анкилозирующим спондилитом, у 4 пациенток уретрит сочетался с вагинитом. Во всех случаях была выделена *Chlamydia trachomatis*. При анализе различных клинических характеристик пациенток (в группе с урогенитальной инфекцией и в группе неинфицированных), СОЭ было гораздо выше у инфицированных женщин. К тому же, в группе инфицированных оказалась значительно выше частота энтеропатии, а также вовлечения в патологический процесс позвоночника и показателей С-реактивного белка.

### 6.1.7. Поражения нервной системы

В ряде случаев у больных осложненными формами хламидиоза, в том числе и болезнью Рейтера, наблюдаются поражения ЦНС – менингиты, менингоэнцефалиты, невриты черепно-мозговых нервов. Мавров, Лошак, Клетной (1985) наблюдали больных болезнью Рейтера и клиническими проявлениями поражения VIII пары черепно-мозговых нервов. Кроме жалоб, свойственных этой болезни, пациенты указывали на шум в ушах, снижение слуха, головокружение, шаткость при ходьбе, головную боль. В анамнезе ЛОР-заболеваний не было. На аудиограмме определялось двустороннее поражение слуха по звуковоспринимающему типу, с преобладанием процесса в левом ухе. При исследовании вестибулярного аппарата этого больного отмечался медленно угасающий нистагмод, отклонение тела влево в положении Ромберга. Магниторезонансная томография выявила стволовые нарушения, обусловленные хламидийной инфекцией. Подтверждением этому служит восстановление слуха после противохламидийной этиотропной терапии. У пациентов с болезнью Рейтера нередко выявляют невриты периферических нервов. При болезни Рейтера задолго до изменения суставов отмечаются симптомы астении и элементы соматогенной депрессии: повышенная утомляемость, раздражительность, а также симптомы, связанные с изменениями вегетативной нервной системы: повышенная потливость, бледность кожных покровов, нарушение рефлекторных реакций. Включение психофармакологических средств в комплексную терапию хламидиоза облегчает состояние больных, способствует действию болеутоляющих и этиотропных средств, снимает чувство напряженности, беспокойства и других реактивных психических изменений.

### 6.1.8. Бесплодие

Основываясь на многочисленных исследованиях, можно утверждать, что существует прямая связь урогенитальных хламидиозов с бесплодием (Савичева и соавт. 1990; Иванова и соавт. 1990; Панкратова и соавт. 1990; Мавров, 1994). Несомненный интерес представляют данные о связи хламидий с бесплодием и нарушением сперматогенеза у мужчин, а у женщин – о способности этих микроорганизмов вызывать воспалительные спаечные и облитерирующие процессы в маточных трубах, приводя к трубному бесплодию (Мавров, 1995). Активно протекающая хроническая хламидийная инфекция вызывает снижение репродуктивной способности у 20% мужчин, а развитие мужского бесплодия – у 10% больных. При этом чаще наблюдалась экскреторно-токсическая форма бесплодия с увеличением pH и вязкости эякулята, снижением подвижности сперматозоонов. Реже происходило уменьшение количества сперматозоонов и увеличение процента патологических форм спермиев. Нарушение репродуктивной функции мужчин при хламидиозе коррелирует с длительностью, тяжестью проявлений заболевания и вовлечением в патологический процесс предстательной железы, семенных пузырьков и придатков яичек. Снижение фертильности эякулята особенно часто наблюдалось при смешанной хламидийно-уреаплазменной инфекции. При анализе причин вторичного бесплодия у женщин, больных мочеполовым хламидиозом, установлено преимущественное действие факторов, возникающих в результате воспалительного процесса и его последствий в репродуктивных органах. Наиболее частым синдромом среди бесплодных женщин был хронический сальпингит (58%). Хламидийные сальпингиты у 15% женщин привели к тубэктомии и в 43% случаев осложнялись непроходимостью маточных труб. Развитие трубного бесплодия зависит от длительности и выраженности воспалительного и иных процессов при сальпингите. Здесь могут играть роль множество экзогенных и эндогенных факторов, конечный баланс которых либо компенсирует сальпингит, либо способствует его персистенции с последующим нарушением структуры и функции маточных труб. Проведенные исследования показали, что в патогенезе нарушений репродуктивной функции при хламидиозе, кроме механического фактора (который является ведущим), имеет место и эндокринный фактор (возникающий под влиянием нарушения нейрогуморальной регуляции овуляторной и других функций гонад).

### 6.1.9. Венерическая лимфогранулема

Венерическая лимфогранулема (лимфогранулема паховая, болезнь Дюрана-Николя-Фавра) впервые была описана в 1786 году Джоном Хантером (John Hunter). Возбудитель был впервые выделен в 1930 году путем заражения обезьяны материалом из бубона. В 1933 году удалось получить заражение у мышей. Тогда же был описан жизненный цикл и подчеркнута сходство с возбудителем пситтакоза. Венерическая лимфогранулема вызывается LGV-биовариантом вида *C. trachomatis* (серотипы L1, L2, L2a, L3), который проявляет выраженный лимфотропизм. Венерическая лимфогранулема широко распространена в странах с тропическим или субтропическим климатом. В европейских странах и США заболеваемость около 0,1 на 100000. Большая часть случаев регистрируется в портовых городах (Schachter, 1999). Чаще болеют мужчины, поскольку у женщин инфекция нередко не проявляется клинически. Резервуаром инфекции могут быть мужчины-гомосексуалисты, у которых наблюдаются атипичные формы в виде проктитов.



На территории Украины заболевание регистрируется в качестве завозной или эпидемиологически связанной с ней инфекции. Венерическая лимфогранулема передается преимущественно половым путем. Значительную роль в распространении этой инфекции играют инфицированные женщины с малосимптомным проявлением болезни. Возбудитель сохраняется в эпителиальных клетках шейки матки и прямой кишки.

По клиническому течению венерическая лимфогранулема значительно отличается от других заболеваний, вызванных хламидиями. Поскольку возбудитель обладает лимфотропизмом, местом его размножения является не столько слизистая оболочка, сколько лимфоидная ткань и подслизистая основа. У мужчин первичный аффект в виде небольшой, поверхностной язвы возникает на головке полового члена – реже в уретре или на *truncus penis*. У гомосексуалистов часто поражается прямая кишка, у женщин – половые губы, преддверие и стенка влагалища. Язвы обычно безболезненные и могут замечаться не сразу, что увеличивает риск передачи инфекции. Могут быть экстрагенитальные первичные язвы (пальцы рук, язык). Вторичные поражения представляют собой лимфоаденопатию паховых и бедренных узлов, которые развиваются через 1-6 недель после первичной язвы (в зависимости от вирулентности возбудителя). Бубоны либо изъязвляются, либо спонтанно разрешаются. Частота бубонов у мужчин выше в связи с особенностями лимфооттока из мест первичных очагов. У женщин чаще поражаются не видимые сквозь поверхность кожи ретроперитонеальные лимфоузлы. В период лимфоаденита могут быть общие явления (температура, лейкоцитоз), боли различной локализации и иррадиации. Разрушающиеся бубоны, располагающиеся в паховой или заднепроходной областях, могут существовать годами. На поздних стадиях болезни происходит замещение пораженных тканей фиброматозной тканью, иногда с образованием обширных стягивающих рубцов (Schachter, Osoba, 1983). Последствия могут быть в виде уретральных и ректальных стриктур, фистул полового члена и ректовагинальных фистул. Описаны системные поражения при венерической лимфогранулеме – менингиты, артриты, пневмонии и конъюнктивиты. Диагноз подтвержден очень высокими титрами микрореакции иммунофлуоресценции (титры более чем 1:1000) (Schachter, 1997).

### 6.1.10. Офтальмохламидиоз

Хламидии, обитающие в мочеполовых органах и вызывающие местные воспалительные заболевания, являются также возбудителями офтальмохламидиоза, протекающего по типу конъюнктивита с включениями или спорадической трахомы. Глазная хламидийная инфекция у взрослых, как правило, является результатом непосредственного заноса возбудителя из половых органов с помощью загрязненных рук. Инфицирование глаз может произойти в водных резервуарах общественного пользования («бассейновый», «банный» конъюнктивит) с недостаточно хлорированной водой или через постельное белье и предметы туалета, загрязненные выделениями из мочеполовых органов.

Трахома и конъюнктивит (кератоконъюнктивит) с включениями являются полярными проявлениями единого офтальмохламидиоза. Сохранение различных названий для этих клинических форм глазной инфекции традиционно в медицинской практике. На территориях широкого распространения эндемичной трахомы, поражающей до настоящего времени около 500 млн. человек, эта инфекция распространяется преимущественно контактным путем. В условиях широкой циркуляции возбудителя и повторного инфицирования она протекает с наиболее тяжелыми поражениями, включая образование паннуса на роговице и интенсивное рубцевание

конъюнктивы. При переносе возбудителя из половых органов на глаз возникают различные клинические проявления – от доброкачественного конъюнктивита с включениями до синдрома, схожего с трахомой (Mordhorst, 1977). Хламидийная офтальмоинфекция нередко является первым показателем наличия у больного или у его полового партнера урогенитальной инфекции той же этиологии. Известны случаи профессионального заболевания врачей-венерологов, гинекологов, окулистов. Наиболее частой клинической формой офтальмохламидиоза является хламидийный конъюнктивит новорожденных.

### 6.1.11. Хламидиозы у детей

Инфицирование хламидиями беременных женщин – частая причина перинатальных инфекций. Хламидийная инфекция, локализующаяся в женских мочеполовых органах, предрасполагает к возникновению различных хламидиозов у новорожденных. Установлена высокая частота инфицирования новорожденных при родах (более 50%). Хламидии, обитающие в эпителии, выстилающем канал шейки матки, могут проникнуть в различные полости новорожденного при прохождении его через родовые пути и индуцировать развитие хламидийной инфекции различной локализации. При каналикулярном распространении возбудителя через носослезный проток возникают: ринит, назофарингит, евстахиит, острый отит, а также более глубокие поражения дыхательной системы. Примерно у 50% новорожденных от инфицированных матерей возникает хламидийный конъюнктивит, ринит, назофарингит, пневмония. На потенциальную возможность вертикальной передачи инфекций у человека (беременная – плод – новорожденный) указывает инфицирование конъюнктивы у новорожденных, при кесаревом сечении до разрыва плодного пузыря, а также случаи внутриутробного инфицирования плода (Башмакова и соавт., 1986; Derganc et al., 1981). Культуральным методом исследовались околоплодные воды беременных женщин с урогенитальной хламидийной инфекцией в 36–41 неделю беременности. Околоплодные воды были получены методом трансабдоминального амниоцентеза. Из 32 проб околоплодных вод в 31,2% случаев выделены хламидии. Факт внутриутробного инфицирования хламидиями был установлен на основании обнаружения возбудителя в плаценте. Для этого была изучена ткань 54 плацент беременных женщин с хламидийной инфекцией. В 38,8% случаев выделены хламидии в плаценте. Хламидии попадают в плод через плаценту и пупочную вену. Одним из грозных осложнений внутриутробного инфицирования плода хламидиями была внутриутробная пневмония с нередким летальным исходом. При исследовании легочной ткани антенатально погибших плодов культуральным методом выделены хламидии, а при гистологическом исследовании выявлена интерсинциальная пневмония (Кутюва, Черепова, 1999).

До 80-х годов XX века единственной формой хламидийной инфекции у новорожденных признавался конъюнктивит с включениями, впервые выявленный в начале века Lindner (1909) и позже подробно описанный Thygeson et al (1936, 1942). В последующие годы выявлены хламидийные инфекции дыхательных путей: ринит, назофарингит и пневмонии, а также отит, гастроэнтерит, проктит и вульвовагинит (Schachter, 1999). В США ежегодно 155000 новорожденных подвергаются воздействию хламидийной инфекции при родах и более чем у 100000 новорожденных возникают различные ее проявления. Анализируя частоту хламидийных офтальмоинфекций у новорожденных, Schachter и Grossman (1981) сообщали о конъюнктивите с включениями у 2–6% всех новорожденных в США.

Хламидийная инфекция глаз может осложняться поражением и других органов у новорожденных детей. Респираторный хламидиоз является второй по частоте формой хламидийной инфекции у новорожденных. Хламидийная инфекция дыхательных путей развивается приблизительно у половины новорожденных, больных конъюнктивитом. В то же время в 7% случаев хламидийная пневмония может быть первичным проявлением инфицирования новорожденных и детей первого года жизни и не сопровождаться воспалительным процессом в конъюнктивальном мешке. У детей в возрасте 5-15 лет хламидийная пневмония развивается более чем у 14% пациентов. При этом у них наблюдается атипичная пневмония с невыраженными клиническими проявлениями, нечеткими процессами на рентгенограммах легких. Без этиотропного, адекватного лечения хламидийная пневмония может длиться месяцы, и даже годы. В ряде случаев хламидийная пневмония может возникать без предшествующего конъюнктивита (Dimitrakov et al., 2000; Басилайшвили, Маврова, 2002).

На основании имеющихся наблюдений в настоящее время невозможно дать количественную характеристику различным формам хламидийных инфекций у новорожденных. По данным литературы, предполагаемая вероятность возникновения хламидийной пневмонии – у 10-20% новорожденных, родившихся от матерей с хламидийной инфекцией половых органов. Взаимосвязь хламидий и пневмонии, выявляемой в течение первого года жизни, обнаруживается в 15-50% случаев пневмоний. Среди новорожденных и грудных детей с пневмонией в возрасте до 6 мес. хламидийная этиология заболевания устанавливается более чем в 30% случаев. В исследованиях 220 детей, проведенных в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, хламидии обнаруживались у 33,3% новорожденных, которые родились от матерей, имеющих хламидийную инфекцию. При этом хламидии у них выявлялись из конъюнктивы, вульвы, содержимого слухового прохода и в бронхиальных смывах. Эти дети нередко рождались ослабленными, на 12-14 дней раньше срока, с признаками недоношенности, при весе от 1,5 до 2,7 кг массы тела. У них отмечались энцефалопатии, кефалогематомы, переломы ключицы. Клинические проявления хламидийной инфекции наблюдались у 6,3% новорожденных. Наиболее часто у них развивались конъюнктивит и пневмония (Кутовая, Гончаренко, 1999).

У новорожденных, родившихся от матерей, половые органы которых были инфицированы хламидиями, чаще развиваются не манифестные формы хламидиоза (конъюнктивит, назофарингит, пневмонии), а имеет место бессимптомная инфекция различной локализации. Проспективное наблюдение за этими детьми показало, что хламидии выделяются из глаз, носовой части глотки, влагалища и прямой кишки на протяжении нескольких месяцев и при отсутствии клинических симптомов инфекции (Мавров и соавт., 2000). Длительность носительства хламидий, приобретенных новорожденными, может достигать нескольких лет и проявить себя в период начала полового созревания. Перинатальная персистентная хламидийная инфекция является причиной последующих урогенитальных воспалительных процессов у подростков, у которых не подтверждается половой путь инфицирования. Воспалительные заболевания мочеполовой системы у детей, обусловленные хламидиями, ещё не привлекли к себе должного внимания. Однако есть все основания считать, что в детском возрасте урогенитальные хламидиозы не являются редким заболеванием. Наиболее частой локализацией манифестной хламидийной инфекции у девочек являются наружные половые органы и влагалище, реже мочеиспускательный канал и прямая кишка. Как показывают наши наблюдения и данные литературы, хламидийная инфекция мочеполового аппарата у детей может длительные сроки протекать бессимптомно, активизируясь под влиянием различных факторов, в том числе и других патогенных агентов (Мавров 1994;

Маврова, Ткачук, 1996). Может иметь место патология почек и мочевыводящих путей хламидийной этиологии у детей. Доказана возможность распространения хламидий контактно-бытовым путем среди детей дошкольного и младшего школьного возраста, а также инфицирование внутритрубно и во время родов при прохождении через родовые пути инфицированной матери.

### 6.1.12. Бессимптомная хламидийная инфекция

Установлено, что наряду с манифестными проявлениями, возможно и бессимптомное (латентное) течение урогенитальной хламидийной инфекции. Бессимптомный хламидиоз выявлялся при профилактических обследованиях у 10% мужчин и у 20% женщин без каких-либо клинических симптомов (Мавров, 1988; Мавров, 1990). Более поздние исследования показывают, что в 70% случаев инфекция, обусловленная *Chlamydia trachomatis*, протекает с незначительными клиническими проявлениями или бессимптомно. В настоящее время считается, что для урогенитальных хламидиозов более характерно бессимптомное течение. Отсутствие клинических признаков наблюдается при персистентной инфекции. Согласно клинико-эпидемиологическим наблюдениям и лабораторным исследованиям, персистентная инфекция может являться как причиной, так и следствием хламидиозов, протекающих с активными клиническими проявлениями. Вопрос о факторах, индуцирующих персистенцию и активирующих инфекционный процесс, остается невыясненным, хотя эпидемиологическая значимость персистентной инфекции доказана (Шаткин, 1996).

Современные данные о распространенности бессимптомной урогенитальной инфекции, вызываемой хламидиями, противоречивы, поскольку зависят от исследуемой популяции. Бессимптомный хламидийный уретрит определяется при профилактическом обследовании, проведенном с помощью метода диагностического выделения хламидий и полимеразной цепной реакции у 4–7% клинически здоровых мужчин (Geisler et al. 2002; Debattista et al 2002). Инфицирование шейки матки хламидиями у женщин контрольных групп без каких-либо клинических симптомов цервицита было установлено у 4–6 % обследованных. Хламидии не являются представителями нормальной микрофлоры человека. Их обнаружение указывает на наличие инфекционного процесса, а отсутствие клинических симптомов заболевания определяет лишь временное равновесие, возникшее между паразитом и хозяином. В эпидемиологическом отношении хламидийная инфекция с клинически бессимптомным течением является не менее опасной, чем ее манифестные формы, и требует целенаправленного проведения научно обоснованных лечебных и профилактических мероприятий. При определенных условиях (декомпенсации иммунологических функций) персистирующая хламидийная инфекция может переходить в системные поражения многих органов и тканей. Наблюдается гематогенный тип распространения хламидийной инфекции, который сопровождается поражением ЦНС и внутренних органов (Мавров, 1995, 1996). Персистирующая хламидийная инфекция сохраняется многие годы, если больных не лечить. По данным Jouner et al. (2002), процент спонтанной санации (без этиотропного лечения) организма от *C. trachomatis* в течение 1 года не превышает 20% у мужчин и 23% у женщин. С одной стороны, большинство инфицированных лиц в течение длительного времени продолжают быть источником заражения половых партнеров, что отличает хламидиоз от сифилиса. С другой стороны, у них сохраняется опасность развития иммунологических нарушений в результате постоянного антигенного раздражения.



### 6.1.13. Трахома

Трахома распространена в северной Африке, на Ближнем Востоке и в северной части индийского субконтинента. Имеются эндемические очаги на Дальнем Востоке, в Австралии и Латинской Америке. В некоторых районах может быть инфицировано до 100% детей в возрасте до 5 лет. По весьма приблизительным оценкам, в мире ежегодно инфицируется 400–600 миллионов человек, хотя активная форма болезни развивается примерно у 6 миллионов (рис. 6.5). Среди детей половых различий в частоте инфицирования и активного заболевания нет. Среди взрослых – преобладают женщины (Thylefors et al., 1995; Evans & Ranson, 1996; Ranson & Evans, 1996).

В гиперэндемичных районах трахома вызывается серотипами *C. trachomatis* A, B, Ba и C. Конъюнктивальный эпителий является основным резервуаром инфекции (Jones, 1974; Schachter, Dawson, 1978). Заражение чаще всего происходит в раннем детстве, когда инфекция передается с пораженного глаза путем прямого контакта. Источником заражения служат дети и взрослые с бессимптомной инфекцией. Возможна передача через переносчиков (мух). Отсутствие гигиенических навыков способствуют частым реинфекциям и накоплению возбудителя. (Jones, 1975). Инкубационный период – от 5 до 12 дней. Jones (1964) выделил четыре стадии развития болезни. Ранняя (I стадия) начинается с остро или подострого конъюнктивита с диффузной гиперемией, отеком и инфильтрацией конъюнктивы. Дальнейшее развитие трахомы сопровождается появлением лимфоидных фолликулов на верхней и нижней складках конъюнктивы и в области верхнего века. В конъюнктивальном эпителии развивается папиллярная гиперплазия и пятнистый кератит с диффузной инфильтрацией и образованием новых кровеносных сосудов в роговице (паннус). После этого болезнь переходит во II стадию, когда фолликулярная

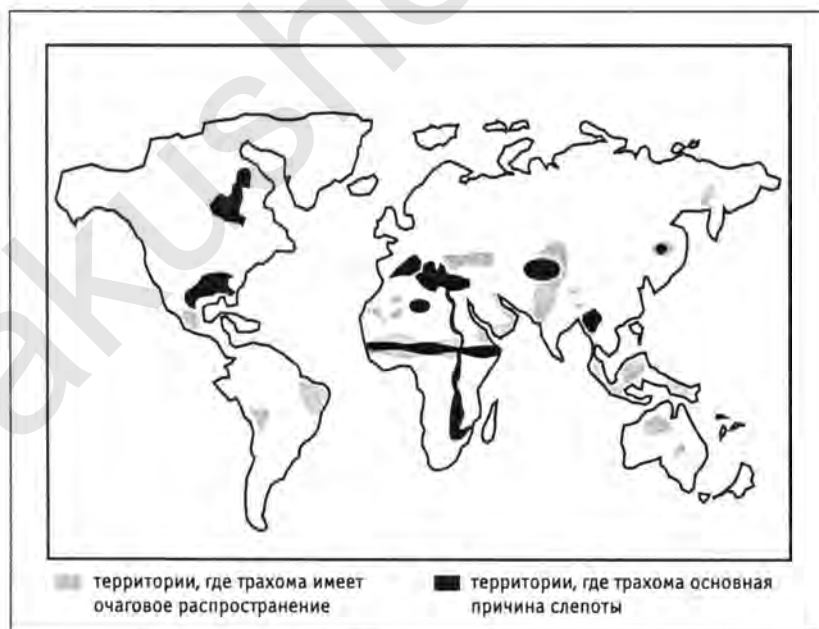


Рисунок 6.5. Распространение трахомы в мире (Evans & Ranson, 1996; Ranson & Evans, 1996)

инфильтрация роговицы и паннус получают максимальное развитие. Появление звездчатых рубцов на конъюнктиве свидетельствует о начале III стадии трахомы. Рубцевание может привести к завороту век (энтропион) и изъязвлению роговицы. Через несколько лет воспалительный процесс разрешается, после чего отмечаются необратимые повреждения глаз (IV стадия). После рассасывания фолликулов остаются небольшие кольцевые углубления. На течение трахомы большое влияние оказывают и частые реинфекции *C. trachomatis*. Предшествующая вторичная бактериальная инфекция или присоединение ее после заражения трахомой отягощает и удлиняет течение инфекции и препятствует выздоровлению. Наибольшую роль играют бактериальные возбудители конъюнктивитов – *Haemophilus aegyptus*, *Moraxella lacunata*, *Neisseria gonorrhoea* и *Staphylococcus aureus* (Мајсук, 1976).

Описаны экстраокулярные поражения у больных трахомой. Соответствующие серотипы *C. trachomatis* (A, B, Ba и C) выделяются из гортани, носоглотки и прямой кишки (Malaty et al., 1981). Они могут быть источником реинфекций трахомы после применения глазных мазей без системного лечения. Что касается гениталий, то у больных трахомой из половых органов могут выделяться генитальные штаммы хламидий, но не серотипы А-С.

Патогенез трахомы изучен на животных моделях путем заражения обезьян. При первичном заражении возникает острый фолликулярный конъюнктивит, который обычно разрешается без образования рубцов. Паннус формируется только после множественных повторных экзогенных реинфекций и эндогенных рецидивов болезни (Grayston et al., 1985). При естественном течении трахомы больной заражается много раз (суперинфекция), в результате чего развивается гиперчувствительность замедленного типа к специфическим белкам теплового шока хламидий. Это вызывает продуктивный воспалительный процесс, который завершается фиброзом. У больных на поздних стадиях трахомы, сопровождающейся рубцеванием, присутствуют высокие титры антител к белку теплового шока массой 60 кДальтон (HSP-60) (Taylor et al., 1987; Peeling et al., 1998).

При инфицировании людей и экспериментальных животных имеет место местный и общий иммунный ответ. Однако протективного иммунитета не возникает. У животных в короткий период после заражения имеет место штаммоспецифический иммунитет. При испытании первых вакцин на животных транзитная устойчивость к последующему заражению имела место, однако было отмечено, что позднее заражение не только было возможно, но и сопровождалось более тяжелым течением инфекции (Schachter, Dawson, 1978). При естественном течении трахомы интенсивность клинических проявлений уменьшается с возрастом. При заражении взрослых заболевание протекает менее активно. Это свидетельствует о наличии протективного иммунитета. Для создания эффективной вакцины против трахомы необходима иммунизация именно антигенами, создающими защитный иммунитет и исключающими развитие патологической гиперчувствительности. Такие вакцины были созданы с помощью генной инженерии введением необходимых генов в вакцинный вирус полимиелита (Murdin et al., 1993). Если иммунизировать мышей и обезьян серовар-специфическими участками MOMP, то можно создать иммунитет, избежав развития гиперчувствительности. Однако клинические испытания этих вакцин не были проведены (Brunham, 1994).

Лабораторный диагноз трахомы ставится относительно легко путем демонстрации включений в конъюнктивальном эпителии при окраске по Романовскому-Гимза. Также применимы культура клеток, прямая иммунофлуоресценция и полимеразная цепная реакция. Микроскопия соскобов эпителия позволяет охарактеризовать клетки воспалительного инфильтрата, что имеет немаловажное значение при диагностике трахомы. При вирусных конъюнктивитах в соскобе преобладают

лимфоциты, при бактериальных – полиморфноядерные лейкоциты, при аллергических – эозинофилы или гранулоциты. При трахоме в соскобе характерно присутствие смеси лейкоцитов, незрелых лимфоцитов и плазматических клеток. Часто можно обнаружить макрофаги (Yoneda et al., 1975). Серологическая диагностика имеет весьма ограниченное значение при трахоме.

Борьба с трахомой продолжает оставаться одной из важнейших задач ВОЗ. Резкое снижение заболеваемости в ряде регионов было достигнуто не путем проведения целенаправленных мероприятий, а в результате существенного улучшения гигиенических условий. Однако, исходя из нынешней политико-экономической ситуации в мире, вряд ли приходится ожидать скорого улучшения жизненного уровня в странах, находящихся в эндемичных зонах. Скорее всего, количество больных, а значит и слепых, в ближайшие годы увеличится в связи с ростом населения (Schachter, 1999). В прошлые десятилетия борьба с трахомой была основана на массовом применении тетрациклиновой и эритромициновой мази. Это не всегда позволяло излечивать трахому, но уменьшало опасность развития слепоты и предотвращало заражение. В настоящее время ВОЗ принята концепция борьбы со слепотой в результате трахомы под названием SAFE (Surgery, Antibiotic treatment, Face washing, Environmental improvements). Данная стратегия борьбы включает хирургическую коррекцию пораженных век, системное и местное применение антибиотиков (тетрациклина, эритромицина и азитромицина), развитие навыков личной гигиены и общее улучшение окружающей среды, прежде всего – борьба с мухами (Thylefors et al., 1995). Однократное применение азитромицина всем населением отдельных местностей позволило в течение 1 года существенно снизить количество трахомы, при отсутствии массовой миграции населения (Bailey et al., 1993; Dawson et al., 1997; 2000).

## 6.2. ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA*

Одним из наиболее значительных достижений в области клинической хламидиологии двух последних десятилетий является установление связи между *C. pneumoniae* и некоторыми хроническими заболеваниями. Наибольшая заслуга в этой связи принадлежит трем исследователям: Томасу Грейстону (Thomas Grayston) и Джону Трехарне (John Treharne) – впервые независимо описавшим данный возбудитель, и Пекка Сайкку (Pekka Saikku), который впервые провел сероэпидемиологические исследования, показавшие связь между хламидиями и атеросклерозом. После выделения *C. pneumoniae* в самостоятельный род началось интенсивное изучение эпидемиологии (Grayston, 1992; Kuo et al., 1995; Leinonen, 1993; Marrie, 1993; Saikku, 1992). В южных широтах эта инфекция является эндемичной и занимает значительное место в заболеваемости детей раннего возраста. В северных широтах и в местах с низкой плотностью населения рост заболеваемости наблюдается каждые 5-7 лет. В детском возрасте половые различия отсутствуют. Среди взрослых чаще болеют мужчины, у которых чаще обнаруживаются антитела. Кривая зависимости заболеваемости респираторными инфекциями, вызванными *C. pneumoniae*, имеет бимодальный характер – два пика приходятся на возраст 10 и 70 лет. Передача возбудителя происходит в основном воздушно-капельным путем. *C. pneumoniae* способна выживать на поверхности различных предметов и в аэрозолях до 30 часов, что было подтверждено специальными исследованиями по заражению мышей (Falsey and Walsh, 1993). На коже человека эти хламидии выживают до 30 минут, что может привести к заражению контактным путем (Verkooyen et al., 1995). Основным резервуаром и источником инфекции являются бессимптомные носители, которые передают возбудитель неинфицированным лицам в условиях скученности и при близком контакте (Nyman et al., 1995).

*C. pneumoniae* – один из самых распространенных инфекционных агентов человека. Серозпидемиологические исследования показывают, что *C. pneumoniae* инфицированы в настоящее время или в прошлом до 60% взрослого населения во всем мире (Schachter, Grayston, 1998; Schachter 2000; Ridgway et al. 2000). Процент сероположительных индивидуумов увеличивается с возрастом, в основном с 5 до 20 лет, затем он несколько снижается, потому что у части индивидуумов антитела исчезают. *C. pneumoniae* является важным этиологическим агентом болезней дыхательной системы у взрослых в молодом возрасте и у стариков, истощенных сопутствующими заболеваниями (Grayston et al., 1986; Marrie et al., 1987). В течение жизни могут происходить повторные

Таблица 6.2.

**Результаты серозпидемиологических исследований, изучавших связь между *C. pneumoniae* (IgG-антитела в сыворотке крови) и клиническими проявлениями атеросклероза.**

Отсутствие связи залито серым цветом

Авторы	Год	Страна	Основная/ контрольная группы	Клинические проявления	Титр антител в МИФ	Соотно- шение	95% интервал
Saikku P., et al.	1988	Финляндия	70/41	инфаркт миокарда, ИБС	32	3,8	1,5-9,5
Leinonen M. et al.	1990	Финляндия	42/41	инфаркт миокарда	128	1,6	0,5-4,5
Thorn D.H., et al.	1991	США	461/95	атеросклероз коро- нарных артерий	16	1,9	1,2-3,0
Saikku P., et al.	1992	Финляндия	102/102	ИБС	128	1,5	0,7-3,2
Thorn D.H., et al.	1992	США	171/120	ИБС	8	2,6	1,4-4,8
Melnick S.L. et al.	1993	США	326/326	ИБС	8	2	1,2-3,4
Dahlen G.H., et al.	1995	Швеция	60/60	ИБС	32	3,6	1,0-16,1
Mendall M.A., et al.	1995	Англия	100/64	инфаркт миокарда, ИБС	64	7,4	1,7-33,1
Patel P., et al.	1995	Англия	83/305	инфаркт миокарда, ИБС, стенокардия	64	2,3	1,1-4,6
Weiss S.M., et al.	1996	США	65/28	коронарная атерэктомия	32	0,2	0,01-0,9
Maass M., Gieffers J.	1996	Германия	412/431	атеросклероз коро- нарных артерий	64	2	1,5-2,7
Wimmer M.L.J., et al.	1996	Германия	58/52	атеросклероз сосу- дов головного мозга	32	0,8	0,5-1,3
Halrne S., et al.	1997	Финляндия	93/115	атеросклероз коро- нарных артерий	32	1,6	0,9-2,8
Bobryshev Y.V., Lord R.S.	1997	Италия	61/61	инфаркт миокарда	16	3,2	1,5-6,8
Thomas G.N., et al.	1997	Гонконг	83/93	инфаркт миокарда, ИБС	16	5,4	2,7-10,9
Kark J.D., et al.	1997	Израиль	302/486	инфаркт миокарда	32	0,9	0,6-1,3
Ossewaarde J.M., et al.	1998	Голландия	54/108	инфаркт миокарда, стенокардия	3200*	2,8	1,3-5,8

\* Примечание – титр ИФА



заражения или инфекция может длительно персистировать. Значение персистентной и повторной инфекции *C. pneumoniae* в патологии человека не совсем ясно. Результаты последних исследований связывают с данной инфекцией атеросклероз и, соответственно, ишемическую болезнь сердца. В том, что такая связь существует, сомнений нет, но является ли она причинно-следственной, пока однозначно не доказано (табл. 6.2).

*Chlamydomphila pneumoniae* связывают со многими хроническими заболеваниями. За последние годы накопилось достаточно данных, указывающих на прямую связь между *C. pneumoniae* и развитием атеросклероза (Saikku et al., 1988; Shor et al., 1992; Ellis, 1997; Maass et al., 1998; Ossewaarde et al., 1998). Имеются данные, указывающие на связь с данной инфекцией таких «неинфекционных» заболеваний с неизвестной этиологией, как бронхиальная астма, узловая эритема, синдром Guillain Barre, реактивный артрит, саркоидоз, цистифиброз, болезнь Альцгеймера (Erntell et al., 1989; Hahn et al., 1991; Haidl et al., 1992; Braun et al., 1994; Emre et al., 1996; Puolakkainen et al., 1996; Balin et al., 1998). В этой связи известный исследователь в области хламидий Julius Schachter (1999, 2000) призывает осторожно относиться к этим предварительным результатам. Дело в том, что поскольку *C. pneumoniae* – чрезвычайно распространенный микроорганизм, то очень легко «найти связь» между маркерами данной инфекции и многими заболеваниями. Поэтому, чтобы свидетельствовать о наличии этиологической связи между микроорганизмом и заболеванием, необходимы тщательные контролируемые клинико-морфологические исследования.

Золотого стандарта для диагностики *C. pneumoniae* не существует. С этим связаны трудности в интерпретации данных о связи инфекции с различными заболеваниями. Большинство исследователей сходятся во мнении, что лучшим диагностическим критерием свежей инфекции *C. pneumoniae* является сероконверсия (File et al., 1997). Диагностическое выделение *C. pneumoniae* осуществляется на культуре клеток HL или HEp-2. Эта процедура достаточно трудоемкая, а чувствительность метода невысокая. Применение метода ПЦР также ограничено, поскольку у многих, в том числе и клинически здоровых субъектов, можно выявить ДНК *C. pneumoniae* как результат персистентной инфекции.

### 6.2.1. Болезни органов дыхания

Воспаление нижних дыхательных путей является одной из самых частых патологий человека. В настоящее время однозначно признается наличие причинной связи между *C. pneumoniae* и респираторной патологией.

*C. pneumoniae* может вызывать фарингиты, средние отиты, бронхиты и пневмонии (Grayston, 1992). Наиболее часто болеют дети школьного возраста и молодые люди. В большинстве случаев заболевание протекает в легкой форме либо инфекция не сопровождается симптомами. Начало постепенное, неострое. Симптомы проявляются в течение нескольких недель. Обычно пневмонии предшествует фарингит и/или ларингит, который начинается за неделю. Температура субфебрильная или нормальная. Рентгенологические и аускультативные данные непатогномичны. Хламидийные инфекции дыхательных путей весьма устойчивы к лечению антибиотиками. При назначении антибиотиков улучшение постепенное. Необходим курс лечения 14 суток и больше. Grayston и соавторы рекомендуют курсы длительностью не менее чем 21 день. Жизнеспособные *C. pneumoniae* часто выделяются из дыхательных путей в течение 11 месяцев, несмотря на применение значительных доз антибиотиков (Hammerschlag et al., 1992). Воспаление верхних дыхательных путей может осложняться средним отитом (Block et al., 1997). Считается, что

в мире до 10% пневмоний, 2-8% фарингитов и 5% бронхитов обусловлены хламидийной инфекцией (Grayston et al., 1986; Nuovinen et al., 1989; Kuo et al., 1995). Часто хламидии выявляются в ассоциации с респираторными вирусами.

Четко установлена этиологическая связь *S. pneumoniae* с бронхопневмонией. Так, в США ежегодно заболевает 1200 из 100000 человек. Из них не менее 15% – хламидийной пневмонией (Grayston, 1992). Несколько крупных вспышек хламидийной пневмонии среди военнослужащих были изучены в Финляндии (Kleemola et al., 1988). В некоторых подразделениях заболели 60-80 человек из каждой 1000 солдат и младших офицеров. Инкубационный период в среднем составлял 30 дней, с максимальной продолжительностью до 3 месяцев. Вспышки длились около 6 месяцев. Сезонности не отмечено. Выявлена периодичность в повышении заболеваемости с интервалом 6-8 лет.

### 6.2.2. *Chlamydomypha pneumonia* и атеросклероз

Многие исследователи считают возможной связь между данным возбудителем и ишемической болезнью сердца. Взаимосвязь хламидий и атеросклеротических заболеваний основана на эпидемиологических, лабораторных и экспериментальных исследованиях. Было показано, что у значительной части больных с ишемической болезнью сердца и инфарктом миокарда повышен уровень антител *S. pneumoniae*. Динамика серологических показателей позволила сделать предположение о развитии при данном заболевании хронической хламидийной инфекции, предшествующей инфаркту миокарда. Такой вывод можно сделать на основании большого числа сероэпидемиологических исследований, проведенных в последние годы в различных странах. Данные некоторых из этих исследований суммированы в табл. 6.2. Из 15 приведенных работ только в двух не было выявлено связи между IgG-антителами к *S. pneumoniae* и ИБС. В половине исследований частота выявления антител у больных с различными проявлениями ИБС превышает в 2 раза контрольную группу. В ранних исследованиях не учитывались известные факторы риска атеросклероза – такие как курение, избыточная масса тела, содержание холестерина и ЛНП. Эти факторы сами по себе могут быть связаны с наличием антител к *S. pneumoniae* (Hahn and Golubjatnikov, 1992). Однако в последующих работах была показана связь серологических маркеров инфекции и атеросклероза независимо от других факторов риска. В двух работах отмечена ассоциация с клиническими проявлениями атеросклероза и наличием одновременно IgG- и IgA-антител к *S. pneumoniae* как маркеров активной инфекции (Miettinen et al., 1996; Cook et al., 1998). Данные сероэпидемиологических исследований можно критиковать с методологических позиций – за отсутствие четких диагностических титров, межлабораторный разброс результатов, наличие перекрестного реагирования с антигенами представителей *Chlamydiales* и других бактерий. Кроме того, у больных с доказанной инфекцией *S. pneumoniae* могут не выявляться сывороточные антитела в реакции иммунофлуоресценции. Гуморальный иммунный ответ может быть выявлен лишь к отдельным протеинам в иммуноблоттинге (Emre et al., 1994; Kutlin et al., 1998).

С тех пор как была установлена связь между *S. pneumoniae* и атеросклерозом на основании сероэпидемиологических исследований, предпринимались попытки обнаружить сами хламидии в атеросклеротических поражениях. Если суммировать результаты всех опубликованных исследований, то можно утверждать, что *S. pneumoniae* выявляется в атеросклеротических сосудах в 40-50% и в 2-5% нормальных сосудов. Хламидии находят в макрофагах, гладкомышечных клетках и реже – в эндотелии (Campbell et al., 1995; Kuo et al., 1993; Juvonen et al., 1997; Yamashita et al., 1998). Наиболее часто для обнаружения *S. pneumoniae* в атеросклеротических сосудах исполь-

Таблица 6.3.

Обнаружение *C. pneumoniae* в склерозированных сосудах с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуногистохимии (ИГХ)

Авторы	Год	Образцы	К-во	Результаты			
				ПЦР+	ПЦР-	ПЦР+	ПЦР-
				ИГХ+	ИГХ+	ИГХ-	ИГХ-
Kuo C.C., et al.	1993	коронарная артерия	30	8	3	5	14
Kuo C.C., et al.	1995	коронарная артерия	18	2	5	1	10
Campbell L.A., et al.	1995	коронарная артерия	38	9	8	3	18
Grayston J.T., et al.	1995	сонная артерия	51	7	23	1	20
Ong G., et al.	1996	брюшная аорта	12	3	0	1	8
Ramirez J.A., et al.	1996	коронарная артерия	10	3	2	2	3
Jackson L.A., et al.	1997	коронарная артерия	38	1	7	5	25
Jackson L.A., et al.	1997	сонная артерия	16	3	5	3	5
Juvonen J., et al.	1997	брюшная аорта	6	6	0	0	0
Kuo C.C., et al.	1997	бедренная артерия	20	2	6	0	12

зуется ПЦР и иммуногистохимия. Как видно из табл. 6.3, между этими методами имеются расхождения в результатах. С помощью ИГХ *C. pneumoniae* выявляется в сосудах чаще, чем методом ПЦР.

Сравнивать результаты отдельных исследований трудно, поскольку использовались разные методики и протоколы. Могла иметь место ингибция ПЦР, разная avidность антител, используемых в ИГХ. Кроме того, при иммуногистохимии исследуется лишь небольшой участок атеромы. Выделение *C. pneumoniae* в культуре клеток – чрезвычайно трудоемкий и длительный процесс, который не применяется для рутинной диагностики. Были предприняты попытки выделить жизнеспособные хламидии из атеросклеротических сосудов – у 13 из 224 больных атеросклерозом *C. pneumoniae* была изолирована. С помощью ДНК-ДНК гибридизации было установлено, что в генетическом плане это были микроорганизмы, аналогичные тем, которые были выделены у больных с респираторной патологией. (Ramirez et al., 1996; Jackson et al., 1997; Maass et al. 1998).

В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины и в Украинском НИИ терапии АМН Украины было проведено изучение серологических признаков хламидийной инфекции у больных с острым инфарктом миокарда. Свободные антихламидийные антитела были обнаружены у 70% больных. Входящие в состав циркулирующих иммунных комплексов антихламидийные антитела были выявлены у 50% больных (Белозоров, 1999; Mavrov, Belozorov, Malaya, Kapitzka, 1994; Рудык, 2002). Превалирование в большей части случаев IgM-ответа и высокая частота обнаружения антител в составе иммунных комплексов позволяют предположить тесную патогенетическую связь между инфарктом миокарда и реакцией на хламидийные антигены. Работами И.И. Маврова и соавторов показано, что *C. pneumoniae* может локализоваться в эндотелиальных клетках неизменённой сосудистой стенки различных участков сосудистого русла. По-видимому, иммунное воспаление, связанное с развитием реакции на антигены хламидий (локализующиеся в стенке коронарных сосудов) может приводить к быстрому сужению их просвета и развитию ишемии миокарда. При обследовании больных атеросклерозом установлено, что инфицирование хламидиями достигает 55%, а риск развития острого инфаркта миокарда увеличивается вдвое (Grayston, 1999; Taylor-Robinson D., Thomas, 2000; Byrne, 2000).

### 6.3. ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ *CHLAMYDOPHYLA PSITTACI*

Пситтакоз (орнитоз) – острое инфекционное заболевание, характеризующееся симптомами интоксикации, поражением легких, нервной системы и гепатолиенальным синдромом. Заболевание описано в 1876 г. Юргенсоном и Риттером в 1879 г. В 1892 г. в Париже наблюдалась эпидемия тяжелого легочного заболевания: источником инфекции явились попугаи, импортированные из Буэнос-Айреса. Вскоре Morange (1895) ввел термин «пситтакоз» (от *psittakos* – попугай). В дальнейшем было установлено, что источником инфекции могут быть не только попугаи, но и многие другие виды птиц, в связи с чем заболевание получило другое название – орнитоз (от лат. *ornis, ornithos* – птица). Термин «орнитоз» общепринят в русскоязычной литературе последних лет.

По таксономической классификации хламидий 1999 года возбудитель пситтакоза – *C. psittaci* – относится к роду *Clamydophyla*, семейству *Chlamydiaceae*. Для *Chlamydophila psittaci* основными хозяевами являются птицы. Этот вид хламидий может передаваться человеку. *C. psittaci* включает 8 сероваров, которые могут паразитировать у различных видов птиц. Пситтакоз (орнитоз) не является распространенным заболеванием. Например, в США за десятилетний период (1987-1996 гг.) было зарегистрировано около 800 случаев пситтакоза (Centers for Disease Control and Prevention, 1998).

Большинство заражений пситтакозом связано с птицами. В прошлом наблюдались вспышки на фермах по разведению уток и индеек, а также на предприятиях по их переработке. С одной стороны, много случаев пситтакоза не диагностируется, поскольку у врачей, особенно в последние годы, отсутствует настороженность при клиническом обследовании больных. С другой стороны, пситтакоз можно спутать с пневмонией, вызванной *C. pneumoniae* (при применении серологических тестов с родоспецифическим антигеном – реакция связывания комплемента, – который длительное время являлся основным диагностическим тестом для пситтакоза).

Основным резервуаром *C. psittaci* являются дикie птицы. К 1967 году было доказано инфицирование более 130 видов птиц (Meuer, 1967). В последующие годы список видов существенно расширился (Ксенц, Ксенц, 1990; Herrmann et al., 2000). В естественных условиях инфекция у птиц обнаруживается, как правило, в латентной форме, в неволе или при других неблагоприятных обстоятельствах – у них возникает манифестное заболевание. Дикie птицы могут служить источником заражения домашних птиц, что приводит к возникновению вторичных очагов пситтакоза. Наибольшую эпидемиологическую роль играют домашние (утки, индюки) и декоративные (волнистые попугайчики) птицы и голуби. Зараженность голубей иногда превышает 50%. Птицы выделяют возбудителя с фекалиями и носовым секретом.

Люди, соприкасающиеся с птицами по работе или ради увлечения, наиболее подвержены заболеванию пситтакозом. Человек заражается респираторным путем, чаще всего при непосредственном контакте с больными птицами. При этом у птиц может быть бессимптомная инфекция – внешне они могут выглядеть здоровыми. Механизм передачи пситтакоза – аэрогенный. Основные пути заражения – воздушно-капельный и воздушно-пылевой. Заражение здорового человека от больного наблюдается редко и зависит от вирулентности штамма *C. psittaci*, вызвавшего заболевание. Отдельные штаммы *C. psittaci* обладают высокой вирулентностью и весьма контагиозны. В таких случаях возможна передача инфекции от человека к человеку. Примером может служить вспышка пситтакоза в штате Луизиана (США) в сороковых годах XX века. Вначале заболела жена ловца птиц, которая вскоре умерла. Перед смертью с ней общались несколько человек, все они заболели, а некоторые заразили окружающих. В результате этой вспышки



заболели 19 человек, 8 из них умерли (Olson, Treuting, 1944). Описано несколько заражений лабораторных работников высоковирулентными штаммами *C. psittaci*, в том числе и со смертельным исходом. Могут болеть также ветеринары (Palmer, 1982).

Перенесенный пситтакоз не оставляет иммунитета. Описаны реинфекции (до 20%) и длительное носительство (Meyer, Eddie, 1951, 1962). Входными воротами для инфекции являются верхние дыхательные пути. Возбудитель проникает в эпителий мелких бронхов и бронхиол, где размножается и накапливается. В дальнейшем хламидии поступают в кровь, что вызывает общую интоксикацию. При этом происходит поражение нервной системы, печени, селезенки, сердечной мышцы, надпочечников. Однако не ясно, являются ли эти поражения вторичными – в результате интоксикации или аутоиммунных нарушений, либо возбудитель непосредственно персистирует в пораженных органах.

При профессиональных заболеваниях диагностика пситтакоза несложная. Эпидемиологический анамнез в значительной мере облегчает диагностику. Диагноз подтверждается с помощью лабораторных исследований. Выделение возбудителя из крови и мокроты осуществляется на куриных эмбрионах, культурах тканей или путем заражения животных. Однако эти исследования сложны и не всегда доступны. Ранее основным методом лабораторной диагностики являлось РСК (или РПГА) с орнитозным антигеном. Диагностическим для РСК является титр 1:16 – 1:64; для РПГА – 1:512 и выше. В настоящее время применяются прямая и непрямая иммунофлуоресценция и полимеразная цепная реакция.

Профилактика включает санитарно-ветеринарные мероприятия в птицеводческих хозяйствах и на предприятиях, занимающихся обработкой пуха и пера птиц, карантинные меры при ввозе птиц в страну, регулирование численности голубей. В частности, эпидемия пситтакоза 1929-30 годов была остановлена запретом на импорт птиц. В США существует 30-дневный карантин при ввозе любых птиц в страну. Schachter и Dawson (1978) считают, что необходим карантин продолжительностью 45 дней. Эффективных вакцин для специфической профилактики пситтакоза у людей нет.

\*\*\*

Таким образом, хламидии, являясь весьма распространенными возбудителями инфекций в человеческой популяции, предрасполагают к различным формам патологии, влияющим на демографические показатели и вызывающим серьезные последствия для здоровья мужчин, женщин и детей.

## ГЛАВА 7. ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ

Концепция патогенеза хламидийной инфекции сформировалась к середине 90-х годов на основании анализа научной информации о клинике и эпидемиологии заболеваний, вызываемых хламидиями, о морфофункциональных нарушениях у больных и инфицированных, а также на основании экспериментального моделирования на животных (Ward, 1999; Rank, 1999; Brunham, 1999; Mabeу, 2000). Установление роли иммунопатологических механизмов, в частности, роли цитокинов и белков теплового шока, а также генетическая предрасположенность макроорганизма к тому или иному заболеванию в ответ на инфекцию, определяют современное понимание патогенеза хламидиозов. Особенно большое значение придается персистентной инфекции. В данном разделе рассмотрены общие закономерности патогенеза заболеваний,

вызванных различными представителями *Chlamydiales*, с упором на урогенитальный хламидиоз, вызванный *Chlamydia trachomatis*, и связанную с ним патологию. Обсуждены также возможные патогенетические механизмы влияния *Chlamydia pneumoniae* на ишемическую болезнь сердца.

Значение иммунопатогенеза в развитии клинической картины хламидийной инфекции было осознано после испытаний первых вакцин против трахомы в 1960-70 годах. Иммунизацию производили убитыми элементарными тельцами *C. trachomatis*. Эти вакцины давали кратковременный защитный эффект против последующего заражения. Но что более важно, вакцинация существенно утяжеляла течение заболевания в случае последующего заражения и приводила к развитию тяжелых форм болезни у лиц с уже имеющейся бессимптомной инфекцией (Sowa et al., 1969). Таким образом, контакт антигенов возбудителя с иммунной системой вызывал не столько протективный иммунитет, сколько сенсibilизацию по типу инфекционной аллергии. В последующем это было подтверждено путем контролируемых экспериментов при моделировании инфекции на животных.

В естественных условиях повторная, или персистентная, хламидийная инфекция вызывает патологию у людей и животных. В лабораторных условиях персистентная инфекция может быть получена путем воздействия факторов, прерывающих жизненный цикл хламидий. Является ли незаконченный жизненный цикл только лабораторным феноменом или он имеет значение в патогенезе хронической хламидийной инфекции, не совсем ясно. Одним из известных факторов, который индуцирует задержку жизненного цикла хламидий, является гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ). Этот цитокин продуцируется NK-лимфоцитами (естественными киллерами) и T-лимфоцитами, субпопуляции CD4<sup>+</sup> T-хелперами 1-го типа (TH<sub>1</sub>). IFN- $\gamma$  – ключевой эффекторный цитокин, сдерживающий хламидийную инфекцию. Большое значение придается также NK-клеткам, которые появляются в генитальном тракте в ответ на инфицирование хламидиями, и играют ключевую роль в регуляции T-хелперного (TH<sub>1</sub>) ответа. Взаимодействие между этими клетками на ранних стадиях инфекции, когда происходит репрезентация антигена, определяет дальнейшее течение инфекционного процесса – произойдет ли развитие острого (подострого) заболевания или персистирующей инфекции либо элиминация возбудителя (Kelly et al., 1996; Tseng, Rank, 1998). В результате воздействия IFN- $\gamma$  часто развивается хламидийная персистирующая инфекция, для которой характерна экспрессия хламидийных белков теплового шока (Hsps), имеющих сходные антигенные детерминанты с Hsps других бактерий и человека. Постоянное антигенное раздражение белками теплового шока приводит к иммунопатологическим процессам в пораженных органах и вызывает аутоиммунные реакции в организме. Поэтому в данном разделе особое внимание уделено механизмам развития персистирующей хламидийной инфекции, а также роли цитокинов и белков теплового шока в иммунопатологических реакциях, в повреждении тканей при хламидиозе.

Генотип хозяина играет значительную роль в защитных и иммунопатологических реакциях при хламидиозе. Это вполне согласуется с общей концепцией генетического контроля иммунного ответа. Активность лимфоцитов CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>, играющих значительную роль в иммунном ответе, регулируется, соответственно, генами класса I и класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС). В связи с этим рассмотрена роль генотипа в патогенезе трахомы и воспалительных заболеваний половых органов хламидийной этиологии.

### 7.1. ПЕРСИСТЕНТНАЯ ХЛАМИДИЙНАЯ ИНФЕКЦИЯ

Понятие персистентная (персистирующая) инфекция заимствовано из английского языка, в котором слово «persistent», согласно Oxford English Dictionary, имеет два значения – «упорно

длящийся» (*obstinately enduring*) и «постоянно повторяющийся» (*constantly repeated*). В применении к медицине эти понятия разделены. Синонимами термина «персистентный» являются «хронический», «латентный», «постоянный». Повторное инфицирование называют «реинфекцией» и не относят к персистентной инфекции. На практике разделить эти два понятия часто бывает трудно, поскольку длительно существующая инфекция (как латентная, так и манифестная) может быть результатом одного заражения либо многих последовательных заражений. Чувствительные методы диагностики, основанные на амплификации ДНК, позволили окончательно доказать существование хламидийной персистентной инфекции. Однако причины и механизмы реактивации заболевания не известны. Не установлено, в какой форме существуют хламидии в организме при персистенции, чувствительны ли они к антибиотикам, и каковы механизмы повреждения тканей. Эксперименты *in vitro*, на животных, а также клинические исследования показывают значительную роль персистентной хламидийной инфекции в патологии.

В обычных условиях цикл развития хламидий в чувствительных клетках является продуктивным, при котором элементарные тельца хламидий (ЭТ) в конечном счете высвобождаются из клетки и заражают последующие. Такое развитие событий является типичным как при заражении культуры клеток в лабораторных условиях, так и организма при хламидиозе. Работы Moulder и соавторов в 80-х годах, которые изучали рост *C. trachomatis* и *C. psittaci* в мышинных фибробластах, показали, что в обычных условиях цикл развития хламидий в клетках может быть неполным, когда второе поколение ЭТ не образуется или образуется в крайне незначительных количествах (Moulder et al., 1980; Moulder et al., 1981; Moulder et al., 1982). Тогда же была сформирована концепция персистентной хламидийной инфекции.

В экспериментах Moulder и коллег различные штаммы *C. trachomatis* и *C. psittaci* центрифугировали на монослой L-клеток и клеток McCoу в присутствии циклогексимида – ингибитора белкового синтеза прокариотов. Вначале более половины клеток подверглись лизису в результате продуктивного цикла хламидийной инфекции. Затем оставшиеся клетки культивировались в среде, не содержащей циклогексимида, и не подвергались центрифугированию. Через несколько недель доля клеток, имеющих включения, упала до 1% и ниже. Одной из причин уменьшения пула инфицированных клеток было то, что клетки, свободные от инфекции, размножались быстрее (Horoschack, Moulder, 1978). Однако через 100 дней после первичного заражения пропорция клеток, несущих включения, резко возросла. Дальнейшее культивирование сопровождалось сменой периодов массивного размножения хламидий и гибелью многих клеток, которые сменялись периодами стихания инфекции и пролиферацией клеток культуры. При этом было показано, что инвазивность хламидий не меняется. Поскольку в условиях данного эксперимента изучался серовар А *C. trachomatis* (который не способен внедряться в фибробласты без центрифугирования), было сделано предположение, что инфекция поддерживается благодаря инфицированию дочерних клеток при делении, а не благодаря заражению интактных клеток (Richmond, 1985). Наследственная передача хламидийной инфекции была доказана исследованиями, проведенными в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР. Шаткиным и соавторами было показано, что *C. trachomatis* способна персистировать в культуре клеток, по крайней мере, 3 года (Шаткин и соавт., 1985). Была показана возможность длительной персистенции (более 2 лет) *C. pneumoniae* в культуре клеток. Электронно-микроскопические исследования показали, что морфология хламидийных включений при длительно существующей инфекции *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* имеет свои особенности. Кроме типичных ЭТ и РТ, появляются так называемые атипичные aberrантные тельца (АТ), количество которых нарастает. По степени электронной

плотности АТ приближаются к РТ. Их размеры могут быть либо большими (в 4-5 раз больше, чем обычные РТ), либо мелкими, сравнимыми с ЭТ (Шаткин и соавт., 1985; Kutlin et al., 1998; 2000). При персистентной инфекции *C. psittaci* клетки культуры резистентны к новому экзогенному заражению. Прикрепление ЭТ к внешней мембране не происходит. Состав поверхностных белков плазматической мембраны изменяется (Moulder et al., 1980; Moulder et al., 1981; Moulder et al., 1982). При персистентной инфекции *C. trachomatis* может наблюдаться прикрепление хламидий к плазматической мембране с последующей суперинфекцией при новом заражении. Эти различия между *C. psittaci* и *C. trachomatis* связаны с особенностями взаимодействия с протеинкиназой – важным компонентом сигнальной трансдукции клетки-хозяина, а также с разной потребностью в диенине и других компонентах цитоскелета, вовлеченных в поглощение и транслокацию экзогенных телец (Birkelund et al., 1997; Clausen et al., 1997). Переключение с продуктивного цикла развития хламидий на персистентный цикл является постепенным и многоступенчатым процессом. Он может быть индуцирован недостатком триптофана и цистеина, существенных для размножения хламидий, а также воздействием пенициллина,  $\gamma$ -интерферона и уменьшением количества клеток в культуре (Beatty et al., 1993; Beatty et al., 1994b; Coles, Pearce, 1987; Coles et al., 1993). Примечательно, что изоляты *Chlamydophila pecorum*, выделенные от овец, и *Simkania negevensis*, выделенные от людей, обладают тенденцией спонтанно продуцировать персистентную инфекцию в культуре клеток и характеризуются длительным циклом развития (до нескольких недель) (Kahane et al., 1993, 1995, 2000; Friedman et al., 2000; Philips, Clarkson, 1995).

Благодаря исследованиям *in vitro* было показано, что персистентная инфекция связана с незавершенным жизненным циклом хламидий. Это состояние может быть вызвано неадекватной антибиотикотерапией и воздействием на возбудителя факторов клеточного иммунитета. В состоянии персистенции хламидии малочувствительны к антибиотикам и к воздействиям со стороны иммунной системы хозяина. Персистентная инфекция, клиническим выражением которой является латентное заболевание, может перейти в манифестную инфекцию с полным циклом развития возбудителя.

Животные модели имеют существенное преимущество перед культурой клеток, поскольку позволяют изучать роль защитных механизмов макроорганизма, в частности иммунной системы. Исследований на животных моделях, прицельно направленных на изучение патогенетических особенностей персистентной инфекции, было проведено немного. В экспериментальной модели трахомы при заражении тайваньских мартышек штаммами *C. trachomatis*, выделенными от больных трахомой, клинических проявлений не наблюдалось. Однако хламидии можно было выделить из конъюнктивы животных (Wang et al., 1967). Иммуносупрессия кортикостероидами приводит к возобновлению выделения хламидий у животных, спустя много недель после экспериментального заражения и бессимптомной инфекции. В исследовании, проведенном через четверть века на макаках, ДНК и РНК *C. trachomatis* определялись в конъюнктиве длительное время после исчезновения клиники и выделения жизнеспособных хламидий (т.е. после исчезновения клинических и лабораторных признаков инфекции) (Holland et al., 1992). При экспериментальной пневмонии у мышей, вызванной *C. trachomatis* или *C. pneumoniae*, кортикостероиды также реактивировали выделение жизнеспособных хламидий (Laitinen et al., 1996; Malinvemi et al., 1995). При генитальном заражении мышей адаптированным штаммом *C. trachomatis* выделение хламидий прекращается через 3-4 недели. Когда этих мышей в срок до 4-5 недель после спонтанного «самоизлечения» подвергали иммуносупрессии кортизоном или циклофосфамидом, то выделение жизнеспособных хламидий у них возобновлялось. Частота реактивации инфекции уменьшалась со временем и не зависела от дозы первичного заражения. Воздейст-



вие прогестерона, который использовался в данной модели для стабилизации эстрального цикла и уменьшения частоты смены эпителия, снижало частоту реактивации инфекции после иммуносупрессии (Cotter et al., 1997).

Таким образом, при экспериментальной хламидийной инфекции можно выделить условно три стадии – клинически манифестную, бессимптомную, когда хламидии выделяются во внешнюю среду, и персистентную, когда симптомы и выделение хламидий отсутствуют, но инфекция сохраняется внутри клеток. Первые две являются заразными, третья – практически незаразная. Персистентная инфекция переходит в бессимптомную или манифестную инфекцию при подавлении иммунной системы или изменении гормонального статуса.

При вагинальном заражении мышей линии C57BL/6 агентом мышиной пневмонии (современное название *C. muridarum*) при воздействии прогестерона происходила диссеминация инфекции в лимфатические узлы, брюшную полость, селезенку, почки, печень и легкие через 7-14 дней. Однако у нормальных мышей диссеминированная инфекция была преходящей и самопроизвольно разрешалась (Cotter et al., 1997b). У мышей с дефектом гена  $\gamma$ -интерферона имела место выраженная лимфогенная диссеминация и диссеминация через яйцевод. Общая инфекция длилась 49 дней. У мышей C57BL/6 (SCID), которые имеют выраженный множественный иммунодефицит, при экспериментальном заражении хламидиями быстро развивается тяжелая диссеминированная инфекция. Таким образом, при генитальной хламидийной инфекции имеет место краткосрочная диссеминация, которая контролируется IFN- $\gamma$  и другими защитными механизмами. При недостатке  $\gamma$ -интерферона генерализация инфекции закрепляется и происходит поражение многих органов и тканей. В исследовании Рету и соавторов (1998) было показано, что штаммы *C. trachomatis*, вызывающие генитальные инфекции у человека, хотя и в меньшей степени вирулентны, чем *C. muridarum*, но в то же время менее чувствительны к воздействию гамма-интерферона. Факторы макроорганизма (состояние иммунной системы, в частности цитокинный статус, генотип, наличие инфекции в анамнезе – т.е. контактировала ли иммунная система с возбудителем ранее, гормональный статус), вирулентность штамма, вызвавшего инфекцию, количество возбудителя и место первичного заражения определяют наличие диссеминации, ее степень и последствия. Типичным примером генерализованной хламидийной инфекции со специфическими клиническими проявлениями является болезнь Рейтера и хламидийный перитонит (перигепатит). Возможно, существуют и другие субклинические формы генерализованных хламидиозов с поражением различных органов и систем. В последние годы гематогенная диссеминация хламидий показана при многих формах хламидийной инфекции с помощью полимеразной цепной реакции, когда хламидийная ДНК обнаруживалась в суставах, в моноцитах крови, в сосудах и других органах (Bas et al., 1995; Voman et al., 1998; Wilkinson et al., 1998;).

Все виды хламидий, инфицирующие человека, способны вызывать бессимптомную или длительно персистирующую инфекцию. При респираторной инфекции, вызванной *C. pneumoniae*, показано, что выделение хламидий в культуре клеток из смывов дыхательных путей продолжается, по крайней мере, в течение 1 года после длительных курсов антихламидийных препаратов (Hammerschlag et al., 1992). Исследованиями последних лет показано, что *C. pneumoniae* длительно персистирует не только в респираторном тракте, но и в стенках сосудов, и в нервной системе, несмотря на массивные дозы антибиотиков. Данной персистенции некоторые авторы приписывают причинную роль в возникновении ряда хронических заболеваний с неизвестной этиологией. При окулярной и генитальной инфекции *C. trachomatis* также способна персистировать в течение месяцев и лет, при отсутствии адекватного лечения. Часто эта инфекция бессимптомна

либо, как в случае трахомы, течение носит хронический рецидивирующий характер с периодическими обострениями (Ward et al., 1990). У молодых женщин персистентная генитальная инфекция ассоциируется с воспалительными заболеваниями органов малого таза (ВЗОМТ) (Westrom, 1996). При персистентной генитальной инфекции могут быть рецидивы, обусловленные либо реактивацией продуктивного цикла развития хламидий, либо реинфекцией. Реинфекция возможна от прежнего, недостаточно леченного партнера, или от нового партнера. В первых двух случаях выделяется один и тот же штамм *C. trachomatis*, а в третьем случае – другой штамм (Wagenvoort et al., 1989). В отличие от *C. pneumoniae*, при инфекциях, вызванных *C. trachomatis*, проведение адекватных курсов антибактериальной терапии элиминирует персистентную инфекцию (Dean et al., 1998). С появлением методов анализа ДНК (полимеразная и лигазная цепная реакция) стало возможным идентифицировать индивидуальный генотип возбудителя и различать персистенцию от реинфекции. Ранее такие исследования были основаны на серотипировании хламидий, выделенных от данного больного. Известно, что у *C. trachomatis* серовар (серотип) определяется варибельным участком МОМР – главного белка наружной мембраны, который кодируется геном *ompA*. Если определить последовательности варибельных участков гена *ompA*, то можно генотипировать хламидии. Dean и соавторы (1998) обследовали семь женщин в течение 8 лет, имевших от пяти до десяти эпизодов генитальной инфекции, подтвержденной с помощью выделения хламидий в культуре клеток. У всех женщин имела место персистенция штамма, вызвавшего первоначальное заболевание. В промежутках между обострениями, когда после проведенного лечения культуральные исследования были отрицательными, отмечалась положительная ЛЦР, свидетельствующая о персистенции данного штамма. Поскольку в данном исследовании не учитывалось половое поведение и не обследовались половые партнеры, то исключить реинфекцию было нельзя.

Большинство сероваров *C. trachomatis*, вызывающих генитальные инфекции, это – D, E, F, J, I и H. Клинико-эпидемиологические особенности заболеваний, вызванных данными сероварами, не изучены. Возможно, некоторые серовары более инвазивны, а другие более склонны вызывать бессимптомную персистентную инфекцию (Workowski et al., 1992; Workowski et al., 1994). В исследовании Katz и соавторов (1998) 106 подростков обследовались с помощью ПЦР в течение 3 месяцев после лечения хламидиоза азитромицином. У тех, кто не имел половых контактов, или имел контакты с использованием презерватива, или с прежним леченным партнером, рецидив наступил примерно у 14%. У тех, кто имел незащищенные контакты с новым партнером, инфекция выявлялась в 55% случаев. В данном исследовании генотипирование не было проведено. Персистенция *C. trachomatis* при врожденной инфекции также имеет место. В данной ситуации вероятность реинфекции минимальна. Спустя год после врожденного хламидиоза были обследованы 22 младенца, которые не лечились либо лечились неадекватно. У 35% из них были вновь обнаружены хламидии (Bell et al., 1992).

Известно, что хламидии активнее растут и размножаются в растущих и делящихся клетках. Поэтому персистентная инфекция может быть активирована факторами, вызывающими ускорение смены клеток эпителия – травмой, другой сопутствующей инфекцией, гормональными воздействиями (Campbell et al., 1988). Показано, что инфицирование *Neisseria gonorrhoeae* повышает вероятность выделения *C. trachomatis* у женщин – половых партнеров мужчин с гонорейным уретритом (Batteiger et al., 1989; Katz et al., 1987). Сопутствующая гонококковая инфекция вызывает рецидив персистентного хламидиоза. Воспаление, вызванное другим возбудителем, приводит к изменению фона цитокинов в месте инфекции, что вызывает активацию продуктивного цикла размножения хламидий.

Опыты на приматах и клинико-морфологические исследования показывают, что инфекция *C. trachomatis* конъюнктивы и половых путей не ограничивается эпителием и проникает глубоко, в подслизистый и мышечный слой. (Carruccio et al., 1994; Patton et al., 1994). Клинические и гистоморфологические исследования больных воспалительными заболеваниями малого таза, вызванными *Chlamydia trachomatis*, обнаружили морфологические изменения в маточных трубах. Наблюдалась лимфоцитарная и гистиоцитарная инфильтрация в виде скоплений клеток, интенсивный склероз, разрушение эпителия, дистрофия мышц. Выделены три степени повреждения маточных труб при хламидиозе, которые не всегда совпадали с тяжестью клинических проявлений заболевания (Мавров, 1994; Мавров, Мальцева, 2003).

Диагностика персистентной хламидийной инфекции часто затруднена из-за отсутствия клинических проявлений и противоречивых результатов различных лабораторных тестов. Поскольку при персистентной инфекции имеет место незавершенный жизненный цикл, то такая инфекция характеризуется позитивными тестами на антигены и ДНК и лишь периодическим диагностическим выделением ЭТ в культуре клеток. В работе Patton и соавторов (1994) *C. trachomatis* определяли в биоптатах маточных труб женщин с трубным бесплодием. Позитивным у 3 из 25 больных (12%) был метод выделения в культуре клеток, у 12 из 24 (50%) – метод гибридизации ДНК *in situ*, у 15 из 22 (68,2%) – метод иммунопероксидазного выявления антигена и у 2 из 10 (20%) – с помощью электронной микроскопии. Чувствительность вышеупомянутых тестов может варьировать, поэтому часто имеет место дискордантность результатов. В отдельном клиническом случае персистентной инфекции *C. trachomatis* эпидемиологические, клинические и микробиологические признаки хламидиоза могут не совпадать. У пациента могут отсутствовать клинические и анамнестические данные в пользу хламидийной инфекции, но могут быть лабораторные признаки хламидиоза. И наоборот, наличие четких указаний на возможность заражения хламидиозом может сопровождаться отсутствием маркеров инфекции, характеризующих гуморальный иммунный ответ (антитела) и выделение жизнеспособного возбудителя (культура). В таких случаях ПЦР часто является единственным положительным тестом на хламидиоз. Хотя тщательное культуральное исследование со множеством пассажей позволяет иногда получить положительную культуру. Вопрос о лечении и его объеме решается индивидуально с учетом всего комплекса клинических, эпидемиологических, анамнестических и лабораторных данных, а также с учетом возраста больного и его социального окружения.

## 7.2. РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

При хламидийной инфекции в пораженных тканях возникает воспалительная реакция, которая обостряется в результате рецидивов и реинфекций, что в конечном итоге заканчивается рубцеванием. В связи с этим взаимодействие хламидий с системой цитокинов играет важную роль в патогенезе инфекций, вызванных представителями *Chlamydiales* (Возианов и соавт. 2002; Возианов та співавтор. 2002). Хламидийная инфекция генерирует синтез эпителиальных цитокинов в результате прямой инфекции эпителиальных клеток хозяина и в результате взаимодействия с иммунной системой (Fitzpatrick et al., 1991). Инфекция клеточных линий эпителия шейки матки и толстого кишечника индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов: интерлейкина 8 (IL-8); GRO- $\alpha$ ; фактора, стимулирующего образование колоний гранулоцитами и макрофагами (GM-CSF) и IL-6 (Rasmussen et al., 1997).

При хламидийной инфекции цитокинный ответ эпителия бывает отсроченный – через 20-24 ч после инфицирования, и более продолжительный – длится в течение всего жизненного цикла хламидий. Для выброса цитокинов необходим синтез бактериального белка. Эпителиальные клетки цервикального канала высвобождают IL-1 $\alpha$  при инфицировании хламидиями. Если воздействовать на инфицированные культуры эпителия ингибиторами интерлейкина альфа, то синтез провоспалительных цитокинов клетками прекращается. IL-1 $\alpha$ , который высвобождается после лизиса инфицированных клеток, усиливает воспалительный ответ путем стимулирования продукции дополнительных цитокинов соседними неинфицированными клетками. Таким образом, в ответе хозяина на хламидийную инфекцию слизистых оболочек эпителиальные клетки играют ключевую роль (Rasmussen et al., 1997). Вначале, сразу после инфицирования, происходит незначительный выброс цитокинов, который не связан с регулированием хламидиями экспрессии генов хозяина, ответственных за синтез цитокинов. Он осуществляется за счет изменения путей метаболизма. Позже, когда продукция цитокинов достигает максимума, это опосредованно механизмами генетического регулирования. Экспериментальные исследования на линейных мышах с иммунодефицитом показали значение эпителиальных интерлейкинов IL-6 и IL-12 для поддержания протективного TH<sub>1</sub>-клеточного иммунного ответа. IL-6 также продуцируется в результате взаимодействия хламидий с T-лимфоцитами (Williams et al., 1998b; Fitzpatrick et al., 1991). Abu-el-Asrar и соавторами (1998) было проведено иммуногистохимическое исследование больных трахомой с определением цитокинов и степени повреждения конъюнктивы и подслизистой основы. Экспрессия цитокинов у здоровых субъектов отсутствовала. У больных трахомой в эпителиальных клетках наблюдалась цитоплазматическая экспрессия IL-1 $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Макрофаги, которые инфильтрировали подслизистую, экспрессировали альфа-фактор некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) и тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor-PDGF). Состав клеточного инфильтрата фолликулов в lamina propria зависел от степени выраженности фиброза. При умеренном фиброзе преобладали инфильтрация B-лимфоцитами. При выраженном фиброзе преобладали CD4<sup>+</sup> T-хелперы.

Цитокины, выделяемые клетками иммунной системы, играют важную роль в патогенезе хламидийной инфекции. Как известно, CD4<sup>+</sup> T-лимфоциты развиваются в две функционально различные, но взаимно регулируемые субпопуляции, продуцирующие разный набор цитокинов. TH<sub>1</sub>-лимфоциты производят IL-2, IFN- $\gamma$  и лимфотоксин. TH<sub>2</sub>-лимфоциты синтезируют IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13. Дифференцировке TH<sub>1</sub>-клеток способствуют интерлейкин макрофагов IL-12 и гамма-интерферон IFN- $\gamma$ . IL-4, в свою очередь, тормозит образование TH<sub>1</sub>-лимфоцитов. Для формирования TH<sub>2</sub>-клеток необходимы IL-4 и IL-10, а IFN- $\gamma$  и IL-12 подавляют этот процесс. Таким образом, между субпопуляциями TH<sub>1</sub>- и TH<sub>2</sub>-клеток обеспечивается реципрокное взаимодействие. Эксперименты по заражению мышей и морских свинок показали, что при хламидийной инфекции имеет либо смешанный, либо TH<sub>1</sub>-лимфоцитарный иммунный ответ. По данным Cain, Rank (1995), через 3 недели после вагинального заражения мышей агентом мышиной пневмонии (современное название *C. muridarum*) в тазовых лимфатических узлах было значительно больше клеток, производящих IFN- $\gamma$ , чем клеток производящих IL-4. Другие данные показывают, что протективные CD4<sup>+</sup> T-лимфоциты, выделенные от мышей после разрешения первичной генитальной инфекции, секретировали в ответ на стимуляцию IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, что свидетельствовало о наличии смешанного TH<sub>1</sub>- и TH<sub>2</sub>-ответа (Su, Caldwell, 1995). Нестимулированные T-лимфоциты, выделенные через 4 месяца после разрешения первичной генитальной инфекции, обладали защитными свойствами при введении их незараженным мышам. TH<sub>1</sub>-лимфоциты являются ключевыми в процессе разрешения хламидийной инфекции. На мышах с избы-



рательными генетическими дефектами иммунной системы было показано, что для протективного иммунитета при хламидийной инфекции необходим Т-клеточный ответ, регулируемый генами класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС II). У животных с иммунодефицитом CD4<sup>+</sup> МНС класса II не происходит презентация антигена Т-хелперам (Starnbach et al., 1994; Morrison et al., 1995). При вагинальном заражении мышей, у которых отсутствуют рецепторы к IFN- $\gamma$ , серовар D *C. trachomatis*, наблюдался TH<sub>1</sub>-клеточный ответ, однако гамма-интерферон не мог оказать подавляющего действия на хламидийную инфекцию, поскольку отсутствовали необходимые клеточные рецепторы. По сравнению с «дикиими» мышами линии C57BL, у мышей с дефицитом рецепторов к IFN- $\gamma$  наблюдалась более тяжелая восходящая инфекция, которая протекала длительно. У иммунодефицитных животных наблюдался гуморальный ответ (IgG и IgA) на различные антигены хламидий, в частности на MOMP. Анализ подклассов IgG указывал на переключение иммунного ответа на TH<sub>2</sub>-тип. Наблюдался CD4<sup>+</sup> Т-клеточный ответ с преобладанием лимфоцитов, секретирующих IL-4. Образования фолликулов, состоящих из CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, у иммунодефицитных мышей, в отличие от диких, не наблюдалось (Johansson et al., 1997; Ward, 1999). Таким образом, при инфекции, вызываемой антропогенным штаммом *C. trachomatis* (серовар D), показана защитная роль TH<sub>1</sub>-клеток и IFN- $\gamma$ .

Гамма-интерферон сдерживает развитие хламидийной инфекции, усиливая экспрессию фермента индоламин-2,3-деоксигеназы (IDO), что ведет к разрыву циклической молекулы триптофана, который необходим для размножения хламидий (Hissong et al., 1995; Beatty et al., 1994). Кроме того, гамма-интерферон усиливает действие оксид азота-образующую синтазу (iNOS) в макрофагах и эпителиальных клетках, что приводит к высвобождению оксида азота и бактерицидному эффекту. Так, у диких мышей, зараженных *C. trachomatis* (серовар D), в макрофагах наблюдалось небольшое количество включений хламидий при большом содержании оксида азота в присутствии IFN- $\gamma$ . У мышей с дефицитом рецепторов к IFN- $\gamma$  макрофаги содержали много включений хламидий и не производили достаточного количества окиси азота даже при экзогенном введении IFN- $\gamma$ . Добавление триптофана не меняло ситуацию. Таким образом, гамма-интерферон подавляет хламидийную инфекцию прежде всего через активацию синтеза окиси азота клетками. У мышей, у которых избирательно «выбит» ген iNOS, быстро происходит диссеминация агента мышинной пневмонии в селезенку и легкие при генитальном заражении, чего не наблюдается у диких мышей. Макрофаги, взятые от таких мышей, чрезвычайно чувствительны к хламидийной инфекции (Igtsetse et al., 1998b). В эксперименте на мышах линии CBA выявлена высокая интерферониндуцирующая способность *C. trachomatis* (серовар L2). Продукция индуцированных хламидиями интерферонов в крови и паренхиматозных органах животных носила циклический волнообразный характер и коррелировала с циклом развития хламидий. Уровень интерферонов находился в прямой зависимости от инфицирующей дозы возбудителя. Высокое содержание интерферонов в органах оказывало тормозящее влияние на развитие и накопление хламидий (Ершов и соавт., 1990).

Johansson и соавторы (1997a, 1997b) изучали адаптивный иммунный ответ на массивное заражение *C. trachomatis* (серовар D) у мышей с различными изолированными генетическими дефектами иммунитета (knockout mice). Примечательно, что у диких мышей и мышей с дефицитом IL4, CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов происходила самопроизвольная эрадикация инфекции и развивался адаптивный иммунитет к повторному заражению. У мышей с дефицитом

IFN- $\gamma$  и IFN- $\gamma$ -рецепторов или с дефицитом CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов протективный иммунитет не развивался, и способность элиминировать возбудитель после заражения существенно снижалась. Из всех этих иммунодефицитов наиболее серьезным в плане снижения сопротивляемости хламидийной инфекции, являлась неспособность продуцировать гамма-интерферон.

Патология хламидийной инфекции, прежде всего, связана с тканевыми реакциями на внедрение возбудителя, а именно с воспалением и фиброзом. В связи с этим большое значение в патогенезе хламидиоза придается фактору роста фибробластов и бета-фактору трансформирующего роста (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  продуцируется многими типами клеток, включая активированные макрофаги и T- и B-лимфоциты. Этот цитокин синтезируется в латентной форме, которая затем может быть активирована белками теплового шока или липосахаридами. Активировать TGF- $\beta$  могут также протеолитические ферменты макрофагов или активатор системы плазминоген-плазмин (Darville et al., 1998). В результате заражения мышей в легкие агентом мышинной пневмонии появляются как латентные, так и активные формы TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2 (Williams et al., 1996). TGF- $\beta$  воздействует на мезенхимальные клетки, индуцируя синтез внеклеточных матричных протеинов, из которых состоят волокнистые структуры соединительной ткани. С цитокином TGF- $\beta$  связывают развитие фиброзного перитонита со спайками у мышей, аналогичного синдрому Fitz-Hugh-Curtis у человека. Данное состояние развивается у мышей C57, не способных синтезировать IFN- $\gamma$ , на фоне вагинальной инфекции агентом мышинной пневмонии. У этих мышей высокие уровни альфа-фактора некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) наблюдались в течение 8 дней после заражения, затем возвращались к норме в течение 2 недель. Высокие уровни TGF- $\beta$  наблюдались через 7 дней после инфицирования и продолжались до 40 дней, в течение которых имел место перитонит (Darville et al., 1998).

Давно известно, что TNF- $\alpha$  подавляет хламидийную инфекцию (Shemer-Avni et al., 1988). Предполагается, что альфа-фактор некроза опухолей играет важную роль в ранней элиминации хламидий, не связанной с гамма-интерфероном, как это было показано на мышинной модели легочной инфекции *C. trachomatis* (Williams et al., 1990). Роль TNF- $\alpha$  и интенсивности воспаления в патогенезе хламидийной инфекции изучалась на мышах линии С3Н, восприимчивых к инфекции, и линии С57BL/6, относительно устойчивых к хламидийной инфекции. Тяжесть течения инфекции и степень поражения маточных труб после интравагинального заражения *C. trachomatis*, выделенной от человека, была намного больше у мышей С3Н. Обе линии демонстрировали преимущественно ТН<sub>1</sub>-тип иммунного ответа. У мышей С57BL/6 альфа-фактор некроза опухолей был в значительно более высокой концентрации в отделяемом из гениталий, по сравнению с мышами С3Н, в особенности в течение первой недели заболевания. Предполагается, что данный цитокин препятствовал диссеминации инфекции в верхние отделы половых путей и предотвращал развитие гидросальпинкса у животных (Darville et al., 1997).

Однако TNF- $\alpha$  не единственный цитокин, определяющий тяжесть течения заболевания на начальном этапе инфицирования. В модели мышинной пневмонии, вызванной *C. muridarum*, у двух линий мышей – BALB/c (H-2d) и С57BL/6 (H-2b), большая смертность и более медленное выздоровление наблюдались у BALB/c (H-2d). Эти различия были связаны с различным цитокинным ответом, который детерминирован генетически. Мыши BALB/c более склонны к ТН<sub>2</sub>-ответу с относительно высоким уровнем IL-10 и IgG и низким уровнем IFN- $\gamma$ . Мыши С57BL/6, наоборот, продуцировали ТН<sub>1</sub>-ответ, характеризующийся высоким уровнем IFN- $\gamma$ , выраженной гиперчувствительностью замедленного типа и низким уровнем

IL-10. Нейтрализация IL-10 с помощью моноклональных антител *in vivo* в мышей BALB/c повышала шансы самопроизвольного освобождения от инфекции и увеличивала состояние гиперчувствительности замедленного типа. Повышенная способность выделять IL-10 подавляет TH<sub>1</sub>-ответ, который способствует быстрой элиминации возбудителя (Yang et al., 1996). У мышей BALB/c (характеризующихся относительной устойчивостью к хламидийной инфекции) при иммунотипировании клеточного состава инфильтратов матки были обнаружены большие мононуклеарные клетки CD45<sup>+</sup> MHC (класс II), которые экспрессировали молекулы CD40 и CD86. Эти мононуклеары способны стимулировать аллогенные Т-лимфоциты и являются иммунокомпетентными клетками, участвующими в обработке антигена (Stagg et al., 1998).

Весомое значение в обработке и представлении антигенов возбудителя иммунокомпетентным клеткам при хламидийной инфекции играют дендритические клетки. Дендритические клетки могут успешно фагоцитировать хламидии, выделяя IL-12, который способствует TH<sub>1</sub>-ответу. Они обрабатывают и представляют антиген CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитам. Внутривенная иммунизация мышей (имевших контакт с хламидиями) дендритическими клетками вызывает иммунитет против интравагинального заражения, аналогичный тому, который вызывается иммунизацией живыми организмами (Su et al., 1998). Фагоцитоз хламидий дендритическими клетками – завершённый, поскольку он происходит как неспецифический процесс макропиноцитоза, что не позволяет хламидиям остановить подключение лизосом. Макропиносомы сливаются с лизосомами дендритических клеток, несущими молекулы главного комплекса гистосовместимости класса II, что вызывает гибель хламидий (Ojcius et al., 1998). Этот процесс индуцирует созревание дендритических клеток с последующей презентацией антигена хламидий, после его взаимодействия с MHC класса II, CD4<sup>+</sup> Т-хелпером.

Во многих отношениях удобной моделью для изучения патогенеза хламидийной инфекции являются морские свинки. У этих животных имеет место естественная хламидийная генитально-окулярная инфекция, вызванная *Chlamydia caviae* (старое название *Chlamydia psittaci*, штамм GPIC). По сравнению с мышами, морские свинки – большего размера, с ними удобнее работать, хотя они стоят дороже мышей. Основным сдерживающим фактором является отсутствие иммунологических реактивов, а также достаточного количества трансгенных животных и линий с заданными генетическими дефектами иммунной системы. Первичная генитальная инфекция морских свинок сопровождается острым воспалением. Повторные инфекции приводят к развитию хронического воспаления с повреждением яйцеводов. Необратимый фиброз яйцеводов развивается приблизительно у 20% животных и чаще бывает в случае заражения во второй половине овуляторного цикла (Rank, Sanders, 1992; Rank et al., 1993; Rank et al., 1995). На ранних стадиях первичной инфекции, но не при хронической инфекции, у морских свинок линий S2 (инбредной) и Hartley (аутбредной) обнаружены высокие уровни TNF- $\alpha$  в генитальных секретах. Уровень TNF- $\alpha$  коррелировал с остротой воспаления и выраженностью инфильтрации нейтрофилами (Darville et al., 1995).

Изучение роли цитокинов в механизмах патологического процесса при хламидийной инфекции проводилось на животных моделях. Естественно, эти данные могут быть экстраполированы на человека с определенными оговорками. Представители *Chlamydiales*, вызывающие естественную инфекцию у мышей, в настоящее время выделены в отдельный вид – *Chlamydia muridarum*, хотя он в генетическом плане близок к *Chlamydia trachomatis*. Более отдаленным в плане генотипа является возбудитель хламидиоза морских свинок – *Chlamydia caviae*,

который теперь выделен в отдельный вид, генетически близкий к *Chlamydophila psittaci*. Известны различия в биологических свойствах этих хламидий, в частности, разная чувствительность к ингибирующему действию IFN- $\gamma$  при росте в культуре клеток и при моделировании инфекции *in vivo* (Ward, 1999).

Данные о влиянии цитокинов на хламидийную инфекцию при экспериментах на животных необходимо переносить на человека с осторожностью. Работы по изучению патогенеза хламидиозов человека немногочисленны. Они свидетельствуют о том, что цитокины моноцитов и макрофагов, такие как IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , также имеют большое значение в ответе человеческого организма на хламидийную инфекцию. Тем не менее эти цитокины не были обнаружены в отделяемом из уретры у мужчин с хламидийным уретритом. Отсутствие IL-2 и IL-4, синтезируемых Т-лимфоцитами, свидетельствует о том, что эти лимфоциты не играют доминирующей роли (Pate et al., 1998). Наибольший уровень в этом исследовании был у интерлейкина 8 (IL-8) – цитокина, продуцируемого различными типами клеток для привлечения лейкоцитов в зону воспаления.

Разделение Т-хелперов у человека, аналогично мышинным Т-хелперам, на TH<sub>1</sub> и TH<sub>2</sub>, в целом имеет место, однако ряд клеток может иметь смешанный набор цитокинов (Kelso, 1995). Макрофаги человека, выделенные из очага воспаления или подвергшиеся действию провоспалительных цитокинов, таких как IFN- $\gamma$ , продуцируют iNOS и оксид азота, однако в меньшей степени, чем макрофаги грызунов (MacMicking et al., 1997). При изучении биопсийного материала больных трахомой было показано, что макрофаги *in vivo* отвечают на хламидийную инфекцию продуцированием TNF- $\alpha$  – цитокина, который играет роль в воспалительных и защитных реакциях. Повышенное содержание TNF- $\alpha$  в слезной жидкости в результате полиморфизма промотора гена TNF- $\alpha$  является фактором риска развития тяжелой формы трахомы (Copway et al., 1997). В экспериментах *in vitro* ни *C. trachomatis*, ни *C. pneumoniae* не способны хорошо размножаться в макрофагах человека. Эти ограничения не связаны ни с катаболизмом триптофана, ни с гамма-интерфероном (Aireppe et al., 1998; Koehler et al., 1997). Хламидийный ген – транскрипт матричной РНК, и полисахарид могут быть обнаружены в макрофагах во время хламидийной инфекции, что свидетельствует о том, что хламидии могут персистировать в макрофагах. Но поскольку активированные макрофаги живут ограниченное время и не размножаются, то эта персистенция кратковременна. *In vitro* *C. pneumoniae* способна изменять липидный обмен в макрофагах при воздействии липопротеинов низкой плотности, что приводит к формированию пенообразных клеток. В благоприятной среде атероматозной бляшки хламидии могут выживать длительное время и запускать иммунопатологические механизмы (Kalayoglu, Vyme, 1998).

В эпителиальных клетках человека имеются три потенциальных механизма подавления роста хламидий, связанных с воздействием цитокинов: оксид азота-образующая синтаза (iNOS), катаболизм триптофана, которые индуцируются IFN- $\gamma$ , и недостаток железа. В экспериментах *in vitro* с клеточной линией RT4 (эпителиоциты человека) было установлено, что образования окиси азота и катаболизм триптофана определяют, соответственно, 20% и 30% эффекта подавления размножения хламидий при воздействии гамма-интерферона. Вместе три механизма составляют более 60% эффекта ингибиции хламидий в культуре RT4. Поскольку культура RT4 – это клетки, трансформированные вирусом, то их свойства, в частности метаболизм, отличаются от нативного эпителия. Соответственно их цитокинный профиль может отличаться при ответе на заражение хламидиями.



### 7.3. РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА ХЛАМИДИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИОЗОВ

Белки теплового шока (Hsp) – структурно и функционально четко очерченная группа молекул, которые присутствуют практически у всех организмов. По молекулярной массе они подразделяются на четыре подгруппы – *Chlamydia*-90, Hsp70, Hsp60 и малые Hsps. Данные белки экспрессируются в ответ на стресс и относятся к так называемым сопровождающим белкам (chaperonins). На внутриклеточном уровне они играют ключевую роль в упаковке и реупаковке белковых молекул, в их сборке и транслокации (van Eden et al., 1998). На клеточном уровне они могут блокировать апоптоз и предохраняют белки собственного организма от повреждений в результате стресса путем АТФ-зависимой ренатурации и реупаковки (Hightower, 1991). Стрессовые воздействия возникают в воспаленной и поврежденной ткани в результате повышения температуры (лихорадка), протеолиза (под воздействием протеаз профессиональных фагоцитов), механических и химических повреждений (в результате токсических кислородных радикалов). Белки теплового шока весьма отдаленных друг от друга организмов демонстрируют поразительную схожесть аминокислотной последовательности, отражающей необходимый консерватизм структурно-функциональных взаимоотношений. Так, Hsps более 50 прокариотных и эукариотных видов, включая *Chlamydiales*, имели сходство первичной структуры до 40% и более (Viale et al., 1994). У хламидий основные белки теплового шока – Hsp12, 60 и 75 килоДальтон имеют большую степень гомологии с аналогичными белками *Escherichia coli*, известными как GroEL, GroES, DnaK, а также с человеческими митохондриальными белками Hsp10, Hsp60 и Hsp70.

Примечательно, что несмотря на сходство у многих организмов, белки теплового шока, в особенности Hsp60, весьма иммуногенны. С ними связывают иммунопатогенез многих хронических инфекций. У крыс, зараженных микобактериями, с помощью адьюванта был вызван аутоиммунный артрит, характеризовавшийся продукцией активированных клонов Т-лимфоцитов и гуморальных антител против собственного Hsp60. Существует теория, согласно которой иммунный ответ на белки теплового шока бактерий, в особенности Hsp60, может запускать аутоиммунитет к соответствующим белкам собственного организма и вызывать хронический воспалительный процесс. Аутоиммунный ответ на Hsp60 наблюдается у больных с ювенильным хроническим артритом и ювенильным диабетом. Из атеросклеротических бляшек были получены Т-лимфоциты, активные против Hsp60 (Amberger et al., 1997; van Eden et al., 1998).

Впервые интерес к возможному вовлечению хламидийных Hsps в патогенез хронической хламидийной инфекции возник после изучения экспериментальной окулярной инфекции (вызванной *S. caviae*, прежнее название – штамм GPIC, *S. psittaci*) у морских свинок. В данной модели воздействие на глаза животных, ранее инфицированных хламидийным Hsp60 (осажденным в детергенте Тритон X-100), вызывало местную моноцитарную инфильтрацию, характерную для хламидийного воспаления (Morrison et al., 1989). Известно, что обработка клеток (инфицированных хламидиями) гамма-интерфероном увеличивает экспрессию Hsp60 и уменьшает экспрессию МОРР. Экспрессия хламидийного Hsp60 может приводить к клеточному иммунитету, который поддерживает хроническое воспаление за счет вторичных, иммунопатологических механизмов и приводит к фиброзу и рубцеванию. У женщин каждый эпизод воспалительного заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) удваивает риск повреждения маточных труб, независимо от того, является ли инфекция активной или скрытой

(Lehtinen, Paavonen, 1994; Patton et al., 1989). Повторная генитальная инфекция необходима для развития спаек тазовой брюшины, склероза и окклюзии маточных труб, что характеризует тяжелое течение ВЗОМТ. Если мышей предварительно иммунизировать Hsp60, а затем заразить интравагинально адаптированным штаммом хламидий, то у них развивается более тяжелая форма генитальной инфекции, по сравнению с неиммунизированными мышами (Blander et al., 1994).

Ряд исследований указывает на связь между антителами к хламидийному Hsp60 и хроническим, осложненным течением хламидийной инфекции. Однако четких доказательств, что антитела к Hsp60 являются специфичными при осложнениях, а не просто признаком длительной инфекции, нет. Эпитопы хламидийного Hsp60, вызывающие гуморальный иммунный ответ, были охарактеризованы (Paavonen et al., 1994; Yi et al., 1993). Они являются видо- и родоспецифичными, а также перекрестно реагируют с Hsps других организмов. Антитела к хламидийному Hsp60 и аутоантитела к собственному Hsp60 были обнаружены у детей, больных хламидийной пневмонией. В девяностых годах было проведено большое количество исследований, которые показывали корреляцию между гуморальным ответом на хламидийный Hsp60 и возможными последствиями хронической хламидийной инфекции: эктопической беременностью, воспалением придатков матки, бесплодием и перигелатитом (Wagar et al., 1990; Brunham et al., 1992; Toyе et al., 1993; Arno et al., 1995; Eckert et al., 1997; Money et al., 1997; Peeling et al., 1997; Witkin et al., 1998; Domeika et al., 1998). Так, 19 (из 21) серопозитивных женщин с эктопической беременностью имели антитела к Hsp60, по сравнению с 1 из 4 серопозитивных и фертильных женщин. У женщин с лапароскопически подтвержденным сальпингитом имеются антитела к собственному Hsp60 и к хламидийному Hsp60. С помощью синтетического пептида, повторяющего структуру участка 260-261 молекулы хламидийного Hsp60, было показано, что половина женщин с аднекситом имеют антитела к этому пептиду. Наличие антител строго коррелировало с сывороточными IgG- и IgA-антителами к *Chlamydia trachomatis*. Было сделано предположение, что аутоиммунный ответ на собственный Hsp60 развился в результате перекрестной реакции с антителами к эпитопу 260-271 хламидийного Hsp60. Однако наличие перекрестной иммунной реакции еще не означает, что она играет решающую роль в патогенезе хламидийного сальпингита. В Гамбии было проведено популяционное обследование 148 лиц с клиническими признаками трахомы и 148 внешне здоровых субъектов. У больных или болевших трахомой антитела к хламидийному Hsp60 выявлены у 32%, а в группе без признаков рубцевания конъюнктивы – у 16%. Учитывая размер выборки, это различие достоверно ( $P < 0,001$ ) (Peeling et al., 1998).

Большинство авторов придерживаются мнения, что иммунный ответ на хламидийный Hsp60 с последующей аутоиммунизацией к собственным белкам теплового шока дает частичный ответ на вопрос: «Почему у части лиц, инфицированных хламидиями – возбудителями, не являющимися высокоинвазивными, развивается хронический деструктивный воспалительный процесс?». Антитела к хламидийному Hsp60 – проявление нормального иммунного ответа на хламидии. Высказывается мнение, что они необходимы для запуска клеточного иммунного ответа на хламидии. Bailey и соавторы (1995) изучали лимфопрлиферативный ответ на антигены хламидий и обычные антигены – стимуляторы иммунной системы, у больных с персистентной трахомой более 6 месяцев и у больных, у которых трахома разрешилась спонтанно, в течение 6 месяцев. У больных, способных к самопроизвольному разрешению окулярной хламидийной инфекции, наблюдался повышенный ответ на

антигены хламидий (включая Hsp60) и невыраженный ответ – на иммуностимуляцию, по сравнению с больными, имевшими клинические проявления. Обе сравниваемые группы в данном исследовании были способны генерировать цитокинный ответ TH<sub>1</sub>(IFN- $\gamma$ )-типа. В другом подобном исследовании было показано, что при рубцующейся трахоме имеет место подавление клеточного иммунитета к Hsp60, MOMP и ЭТ хламидий (Holland et al., 1993). Моноциты периферической крови, взятые от индивидуумов с рубцующейся трахомой, отвечали на стимуляцию хламидийных Hsp60 синтезом IL-4, тогда как моноциты, взятые от контрольной группы, отвечали синтезом IFN- $\gamma$ . Инкубация с MOMP приводила к увеличению гамма-интерферон-синтезирующих клеток только в контрольной группе. Различий в HLA-статусе, клиническом статусе или типах иммунного ответа между сравниваемыми группами не было (Holland et al., 1996).

В последние годы начался процесс пересмотра догмы об иммунопатологическом влиянии белков теплового шока микроорганизмов и, в частности, хламидий (van Eden et al., 1998; Ward, 1999). Четких доказательств клинически значимого патологического аутоиммунитета из-за ответа на собственные Hsps накоплено недостаточно. При экспериментальной иммунизации микробным Hsp обычно не возникает аутоиммунизации, а развивается резистентность к последующему заражению. У крыс с артритом, вызванным адьювантом, системная или пероральная иммунизация Hsp60-микобактерий, Hsp70 и Hsp10 *E. Coli* или вирусом оспы (экспрессирующим микобактериальный или человеческий Hsp60) вызывала разрешение аутоиммунного артрита. Аналогичные данные были получены при других аутоиммунных заболеваниях – артритах, вызванных клеточной стенкой стрептококка, *Yersinia*, авридином и пристаном, а также при диабете и энцефаломиелите.

Установлено, что при любом воспалении появляются клоны Т-лимфоцитов, активные против собственных белков теплового шока. Эти клоны могут перекрестно реагировать с хламидийным Hsp (Deane et al., 1997). Независимо от того, что вызвало аутоиммунный процесс и осуществляется ли он за счет CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, Hsps играют защитную роль, индуцируя противовоспалительные Т-клетки как ответную реакцию на стресс. Предполагается, что распознавание Т-лимфоцитами собственных белков теплового шока важно в установлении и поддержании иммунологической толерантности к собственным антигенам. Поэтому существует гипотеза, согласно которой Hsps необходимы для предотвращения аутоиммунизации в процессе иммунного ответа. Так, у больных ревматоидным артритом при активации Hsp60 толерантные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты продуцируют IL-4 и TGF- $\beta$  и усиленно экспрессируют CD30, что указывает на ответ типа TH<sub>2</sub>. Перекрестный ответ Т-лимфоцитов на консервативные эпитопы Hsp60 играет защитную, иммунокорректирующую роль.

Кроме белков теплового шока, существует ряд белковых молекул с чрезвычайно консервативной структурой (например, цитохром с). В процессе эволюции выработались регуляторные взаимоотношения Т-клеточного ответа на микробные антигены, структурно схожие с молекулами собственного организма. В нормальных условиях перекрестная реакция не происходит. При экспериментальной иммунизации собственным белком и микробным белком в отдельности ответа на собственные антигены не возникает. Однако, если иммунизировать двумя антигенами одновременно, то происходит срыв иммунологической толерантности. Так, иммунизация мышей СВА рекомбинантным мышинным и хламидийным Hsp60 вызывала ответ на собственные Hsp60, только если оба антигена смешивали. Если иммунизировать мышей только собственным Hsp60, то это индуцирует лимфоциты, секретирующие IL-10, которые не

пролиферируют *in vitro* в ответ на стимуляцию собственным Hsp60. Имеет место антиген-специфическая анергия, а не устранение соответствующих клонов, поскольку добавление IL-2 способствует пролиферации Hsp60-активных клонов. При иммунизации смесью Hsp60-антигенов появляются перекрестно реагирующие лимфоциты, которые пролиферируют в ответ на воздействие собственного Hsp60 и характеризуются тем, что соотношение IFN- $\gamma$  к IL-10 увеличивается в 12 раз! Адоптивный перенос лимфоцитов, активных против хламидийного Hsp60, вызывал у других мышей высокие титры антител к собственному Hsp60 (Yi et al., 1997). Способность IL-10 индуцировать толерантность связана с подавлением пролиферации TH<sub>1</sub>-клеток и антиген-представляющих клеток путем воздействия на сигнальную систему вторичной стимуляции (B7/BB1). Воздействие IL-2 снимает блок IL-10, поскольку ему не нужна вторичная сигнальная стимуляция.

Таким образом, белки теплового шока имеются у всех клеток и экспрессируются в результате любого стрессового воздействия. Hsp обладают следующими свойствами: они высокоиммуногенны, имеют консервативную структуру, что дает основу для перекрестного распознавания хламидийных и собственных Hsp иммунными клетками. Hsp хламидий играют роль в иммунопатогенезе хламидийной инфекции. Также показано, что бактериальные Hsp могут индуцировать толерантность, что открывает возможные перспективы разработки вакцин для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных бактериальными антигенами (van Eden et al., 1998; Ward, 1999).

#### 7.4. РОЛЬ ГЕНОТИПА ХОЗЯИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

В зонах, эндемичных по трахоме, большинство населения инфицировано окулогенными штаммами *C. trachomatis*. В связи с постоянной циркуляцией возбудителя многие люди многократно инфицируются и имеют бессимптомную инфекцию. Однако рубцующаяся трахома возникает только у небольшой части населения. Для исследователей давно стало ясно, что человеческая популяция гетерогенна по степени восприимчивости к хламидиозу и по склонности развития тяжелых, хронических форм заболевания. Наиболее типичным примером является ситуация, когда генитальная хламидийная инфекция длительно протекает у супружеской пары. При этом у одного из супругов (мужа или жены) может быть бессимптомная или малосимптомная инфекция, практически без клинических последствий, тогда как у другого супруга имеет место выраженный восходящий воспалительный процесс с нарушением репродуктивной функции и/или экстрагенитальная патология с вовлечением суставов (реактивная спондилоартропатия). Очевидно, что роль генотипических факторов в патогенезе хламидийной инфекции является весомой.

В экспериментах на инбредных мышах было показано, что генетические различия определяют чувствительность животных к заражению *C. muridarum* и *C. trachomatis* и детерминируют характер иммунного ответа и течения заболевания, о чем уже писалось в данном разделе. Мыши C57BL/6 обладают естественной резистентностью к хламидийной генитальной инфекции. Животные реагируют на антиген *C. trachomatis* образованием IgG-антител и демонстрируют инверсию субклассов от IgG2a к IgG1, что связано с переключением с TH<sub>1</sub>-ответа на TH<sub>2</sub>-ответ и соответствующим изменением профиля цитокинов (Fuentes, Orfila, 1990; Borrego et al., 2000).

Были проведены клиничко-лабораторные исследования хламидийной инфекции с определением генетических маркеров у человека. Kimani и соавторы (1996) обследовали 307 проституток в Кении, у 44 из которых развились ВЗОМТ хламидийной этиологии. Было установлено,



что носители HLA-A31 MHC класса I имеют значительно больший риск заболеть с развитием восходящего воспалительного процесса при заражении хламидиями ( $P=0,043$ ;  $OR=5,6$ ). При трахоме было показано, что цитокины Т-хелперов 2-го типа ( $TH_2$ ) играют важную роль в развитии хронической инфекции, заканчивающейся рубцеванием и слепотой. Моноциты периферической крови у больных с рубцеванием демонстрировали транскрипцию и транслокацию матричной РНК, которая кодирует IL-4 в ответ на хламидийный антиген. Данный феномен не наблюдался в контрольной группе лиц без рубцового процесса. У больных с рубцеванием также наблюдалась повышенная транслокация мРНК гамма-интерферона и IL-10, что указывает на смешанный  $TH_1/TH_2$ -ответ (Holland et al., 1996). Была изучена связь между развитием рубцового процесса при трахоме и определенными HLA-аллелями главного комплекса гистосовместимости (класса I – A, B, Cw и класса II – DR b1, DQ b1). Не было выявлено связи между рубцеванием и определенным HLA-типом у 153 больных, что свидетельствует о том, что протективный иммунитет не ограничивается одним или несколькими хламидийными эпитопами. Однако HLA-A28 встречался достоверно чаще у лиц с рубцеванием, чем в контрольной группе без рубцевания ( $P=0,046$ ). ДНК-субтипирование A28 показало, что это преимущественно аллель A\*6802. Возможно, это связано с иммунопатологическим HLA-A\*6802, обусловленным ответом цитотоксических лимфоцитов у больных трахомой (Conway et al., 1996).

Чтобы исследовать роль цитотоксических лимфоцитов в патогенезе хламидиоза были синтезированы пептиды, повторяющие аминокислотные последовательности MOMP и Hsp60-хламидий и подходящие по конформации к связывающим участкам человеческих лейкоцитарных антигенов HLA-B8 или В-35. Эти пептиды были исследованы в тесте цитотоксичности с использованием моноцитов периферической крови у HLA-B8- и В-35-позитивных субъектов с окулярным хламидиозом. Лишь небольшая часть обследованных больных ответила на стимуляцию MOMP и Hsp60. Это были дети с активной инфекцией и взрослые без рубцовых проявлений. Был сделан вывод, что цитотоксичные лимфоциты играют защитную роль в разрешении окулярной хламидийной инфекции (Holland et al., 1997).

Была установлена связь между рубцующейся трахомой и полиморфизмом гена *tap1*, кодирующего белок TAP. Ген *tap* локализован в регионе HLA класса II. TAP – транспортный белок, который перемещает (транслокация) пептиды из протеасом клетки, где белки подвергаются деструкции, в эндоплазматический ретикулум. Этот белок состоит из двух субъединиц, кодируемых генами *tap1* и *tap2*. Обе субъединицы имеют N-концевой трансмембранный домен, который охватывает мембрану эндоплазматического ретикулума. Известны два диморфизма гена *tap1* в позициях 333 и 637, которые, соответственно, формируют четыре аллельных варианта. Значение этих аллелей неизвестно, однако гомозиготность *tap*-гена может снижать разнообразие антигенов, подвергающихся обработке. Аллель *tap1*-C отсутствует у больных болезнью Бехчета, при которой нарушен иммунный ответ. Сравнение ДНК у 86 больных с рубцующейся трахомой и 96 контрольных лиц показало, что аллель *tap1*-C реже встречается у больных (Felton et al., 1998).

Вышеупомянутые исследования касались больных трахомой из эндемичных районов Африки. Имеются данные и в отношении других популяций и других форм хламидиоза. Установлена предрасположенность к хронической хламидийной инфекции мочеполовой системы, детерминированная HLA-фенотипом в украинской популяции больных хламидиозом. У больных выявлены HLA-антигены риска (HLA-A10, HLA-B27, HLA-B51) и подтверждена запуская роль молекул гистосовместимости I класса в патогенезе этого заболевания.

Отмечено, что манифестация хламидиоза и переход воспалительного процесса в хронический происходят вследствие активной секреции интерлейкина-10 (IL-10) Т-хелперами 2 типа (ТН<sub>2</sub>) со снижением функциональной активности Т-хелперов 1 типа (ТН<sub>1</sub>), о которой судят по продукции гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ). При этом происходит активация гуморального звена иммунитета с синтезом антител, не обладающих цитотоксическими свойствами (Возианов с соавт., 2000; Дріянська і співав., 2000; Монтан с соавт., 2001).

Как известно, IL-10 и IFN- $\gamma$  являются медиаторами-антагонистами. В результате исследований, проведенных в Институте урологии АМН Украины, взаимосвязь между HLA-фенотипом и продукцией IFN- $\gamma$  у пациентов с хроническим мочеполовым хламидиозом не выявлена. Для носителей HLA-антигенов HLA-A10, HLA-B27 и HLA-B51 характерна высокая спонтанная продукция IL-10. У больных с упорной хронической инфекцией (носителей HLA-A10, HLA-B27 и HLA-B51) наряду с активной продукцией IL-10 выявляется низкий синтез IFN- $\gamma$ , в связи с чем эти антигены гистосовместимости можно считать факторами риска хронического мочеполового хламидиоза (Возианов с соавт., 2002). Данные результаты показывают взаимосвязь между типом HLA и предрасположенностью к хламидиозу. Как уже указывалось в данном разделе, IL-10 играет ингибирующую роль в иммунном ответе. Происходит блокирование синтеза IL-2 и IFN- $\gamma$  клетками ТН<sub>1</sub>-типа, а также IL-1 $\alpha$ - и IL-1 $\beta$ -макрофагами (Kelso, 1995; Romagnani, 1997). IL-10 ингибирует вышеуказанные цитокины за счет усиления продукции растворимых рецепторов и их антагонистов (антирецепторных факторов), которые предотвращают взаимодействие цитокинов с соответствующими рецепторами на клетках-мишенях. Эти механизмы препятствуют реализации иммунного ответа ТН<sub>1</sub>-типа, в основном ответственного за защиту при хламидийной инфекции. Как это было показано в исследованиях, цитированных ранее, Т-клеточный ответ ТН<sub>1</sub>-типа может подавляться за счет того, что IL-10 препятствует антиген-представляющей функции макрофагов, уменьшая экспрессию антигенов гистосовместимости II класса. Кроме того, угнетая синтез колоний-стимулирующих факторов, IL-10 устраняет пролиферацию макрофагов и угнетает их бактерицидный эффект за счет снижения образования оксидов азота (Возианов с соавт., 2002).

## 7.5. ПАТОГЕНЕЗ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ХЛАМИДИОЗОВ

При уrogenитальных и других хламидийных инфекциях могут проявляться различные формы инфекционного процесса – как острая и хроническая инфекции, сопровождающиеся развитием клинических симптомов, так и персистентная инфекция, протекающая бессимптомно. Эти формы могут чередоваться, определяя цикличность патологии в динамике инфекции и широкий диапазон ее клинических проявлений. Бессимптомное течение хламидийной инфекции может иметь не только самостоятельное проявление, но и предшествовать развитию болезни. Это обуславливает сложность определения инкубационного периода при хламидиозах. Инкубационный период для хламидийных уретритов и цервицитов обычно устанавливается в пределах 7-30 дней. Для венерической лимфогранулемы – 3-30 дней, для конъюнктивита с включениями – 5-14 дней, а для хламидийной пневмонии у младенцев – от 2 нед. до 4 мес. Время между заражением и проявлением болезни зависит от скорости достижения хламидиями чувствительных клеток, от интенсивности их размножения и степени повреждения клеток и окружающих тканей. Известно, что короткий инкубационный период (1-3 дня) характерен для инфекционных болезней, первые симптомы

которых непосредственно обусловлены размножением возбудителя во входных воротах инфекции. При урогенитальных хламидиозах этот срок удлинён. Возможно, это связано с более длительным временем, необходимым для накопления хламидий в первичном очаге инфекции и проявления ими патогенного действия. Иммунный компонент патогенеза имеет существенное значение в развитии этой болезни. Разная интенсивность патологического процесса при первичном инфицировании мочеполовых органов зависит от степени вирулентности инфицирующего штамма и реактивности иммунной системы макроорганизма.

Входными воротами урогенитального хламидиоза служат мочеполовые органы человека. Условием возникновения инфекционного процесса является проникновение и размножение хламидий в эпителиальных клетках слизистой оболочки мочеполовых органов. В соответствии с тропизмом *C. trachomatis* к столбчатому эпителию, первичный очаг инфекции развивается в мочеиспускательном канале мужчин и женщин, а также в шейке матки. В дальнейшем у части инфицированных развивается восходящая инфекция половых органов и экстрагенитальные поражения различной локализации. Вступая во взаимодействие с чувствительными клетками, хламидии используют различные факторы патогенности. Адсорбционная активность возбудителя определяется специфическими поверхностными термолабильными эффекторами, расположенными на строго локализованных участках мембраны клеточной стенки. Эти эффекторы, структурно связанные с типоспецифическими антигенами, комплементарны клеточным рецепторам, отличающимся по своей химической структуре для различных представителей хламидий. Рецепторы, реагирующие с возбудителем урогенитальных хламидиозов, содержат сиаловую кислоту или ее производные и разрушаются нейраминидазой, в то время как рецепторы, реагирующие с возбудителем венерической лимфогранулемы, а также с возбудителем пситтакоза, проявляют стабильность к обработке нейраминидазой и содержат N-ацетилглюкозамин.

Проникнув в клетку, хламидии проявляют строго специфическую активность, направленную против слияния лизосом с окружающей их фагоцитарной вакуолью – участком цитоплазматической мембраны клетки, отделившимся при поглощении возбудителя инфекции. Хламидии включают важнейший защитный механизм клетки хозяина, обеспечивая себе возможность дальнейшего размножения в цитоплазматическом включении. Механизм этого феномена остается нераскрытым. В инфицированной клетке происходят определенные биохимические сдвиги, направленные на обеспечение воспроизводства паразита, который до завершения своего развития практически не подавляет собственный метаболизм хозяина. В период преобразования вегетативных форм микроорганизма в инфекционные формы клетка осуществляет выброс в окружающую среду гидролитических ферментов (кислая  $\alpha$ -глюкозидаза,  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ -маннозидаза, кислая фосфатаза и др.) при сохранении целостности цитоплазматической мембраны и активности ферментов цитозоля. В этот же период, под влиянием продуктов метаболизма микроорганизма, начинают прогрессировать дегенеративные изменения клетки. Наблюдаются фрагментация внутренних мембран, образование внутрицитоплазматических пузырьков, лизис клеточных органелл. Ядро смещается к периферии клетки увеличивающимся в размерах цитоплазматическим включением и подвергается деформации. Все эти изменения приводят к летальному исходу, наступающему после активации лизосомальных ферментов. Наступают разрывы оболочки включения и плазматической мембраны клетки, сопровождающиеся выходом нового поколения инфекционных частиц паразита, способного заражать другие клетки (Мавров, 2002).

Степень поражения клетки зависит от количества инфекционных частиц паразита, входящих на чувствительную клетку, а также от вирулентных особенностей штамма хламидий. При инфицировании мочеполовых органов могут реализоваться как цитотоксичный, так и персистентный механизмы повреждения клеток. В последнем случае возникает равновесие между потребностями паразита и хозяина. Возбудитель инфекции умеренно размножается в цитоплазматическом включении, а клетка-хозяин продолжает функционировать и делиться. В результате образующиеся дочерние клетки и их генерации могут оказаться инфицированными. Для развития болезни, вызванной хламидийной инфекцией, необходима реализация цитотоксичного взаимодействия хламидий с эпителиальными клетками мочеполовых путей. Этот механизм повреждения клеток может наступить сразу же после заражения большой дозой возбудителя инфекции или при малых инфицирующих дозах, после соответствующего накопления в серии естественных «пассажей» с клетки на клетку.

В патогенезе урогенитальных хламидиозов, помимо непосредственного повреждающего действия возбудителя на инфицированные клетки и повреждения окружающих тканей лизосомальными ферментами (выбрасываемыми из инфицированных клеток в период размножения микроорганизма), помимо повреждающего действия продуктов автолиза разрушенных клеток, существенное значение имеет токсическая активность, свойственная всем хламидиям. Ее классическим лабораторным примером является быстрое развитие токсикоза и гибель мышей после внутривенного заражения. Животные гибнут до размножения патогенного микроорганизма. Эта токсическая активность связана с эндотоксином, содержащимся в составе самих хламидий, и с термолабильными токсическими субстанциями, определяемыми в культуральной среде (освобожденной от микроорганизма) (Шаткин, Мавров, 1983).

Понять патогенез хламидийной инфекции, разработать эффективные средства лечения невозможно без глубокого изучения энергетического метаболизма хламидий, поскольку сущностью паразитизма *Chlamydiaceae* является использование высокоэнергетических молекул клетки-хозяина. В результате исследований, проведенных в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, выявлены важные особенности энергетического обмена клетки-хозяина при инфицировании хламидиями: повышение содержания АТФ, увеличение скорости потребления глюкозы, увеличение активности аминотрансфераз, активация клеточного дыхания. Установлено, что различные штаммы хламидий по-разному воздействуют на функциональное состояние митохондрий и ферментов дыхательной цепи (Мавров и соавт., 1991; Мавров и соавт., 2001).

В результате размножения хламидий в клетках развивается патологический процесс, включающий местные и общие защитные реакции макроорганизма. На месте первичного очага возникает отек и гиперемия слизистой оболочки, нарушается целостность эпителиального слоя с частичной десквамацией эпителия, определяется лейкоцитарная (нейтрофильная) и лимфоидная субэпителиальная инфильтрация, формируется воспалительный экссудат, возникают функциональные нарушения. Локализация, степень выраженности и длительность этих патологических проявлений определяют клиническую симптоматику и характер течения болезни, в том числе и его последствия.

Хламидийная урогенитальная инфекция редко ограничивается локализацией в первичном очаге. Как правило, имеет место восходящее поражение слизистой оболочки мочеполовых органов при контактном и гематогенном (лимфогенном) распространении инфекции. Благодаря комплексному изучению восходящей хламидийной инфекции у женщин (проведенному



в Институте дерматологии и венерологии АМНУ), был показан как каналикулярный путь распространения инфекции – от клетки к соседней клетке, так и гематогенный путь распространения хламидий – из шейки матки в маточные трубы. Кроме того, были получены данные, показывающие возможную роль сперматозоонов в «доставке» хламидий из шейки матки в маточные трубы и брюшную полость (Мавров, 1995; 1996). Распространяясь таким путем, хламидии определяют топографию вызываемой патологии – эндометрит и сальпингит. Воспалительный процесс, начавшийся в слизистой оболочке, продолжается вглубь, сопровождаясь диффузной инфильтрацией лимфоидными клетками и полинуклеарными лейкоцитами. Постепенно поражение охватывает мышечную и серозную оболочку матки и труб (Мавров, 1994; Мавров, Шевченко, 1994; Мавров, Мальцева, 2003). Авторы выявляли обильный экссудат в маточных трубах и его выход в брюшную полость, а также обнаруживали слипание брюшного отверстия и последующую частичную облитерацию просвета пораженных труб. Важная информация о путях распространения хламидий из влагалища, о характере воспалительных процессов в половых органах также была получена при использовании экспериментальных моделей на морских свинках, заражаемых возбудителем конъюнктивита с включениями (современное название *Chlamydophyla caviae*). При моделировании сальпингита у морских свинок на фоне иммуносупрессии циклофосфамидом установлена прямая взаимосвязь подавления иммунной реактивности организма и возникновения восходящей урогенитальной инфекции. У подопытных животных развивался эндометрит и сальпингит, сопровождавшийся образованием гидро- и пиосальпинкса, а также перитонит (Шаткин, Мавров, 1983).

Инфицированный канал шейки матки является резервуаром хламидий и источником не только венерических, но и перинатальных инфекций. Новорожденные инфицируются при прохождении через родовые пути. Хламидии могут проникнуть в любые открытые полости тела и вызвать инфекционную патологию. Наиболее часто инфицируются конъюнктивальный мешок и носовая часть глотки, в результате чего у новорожденных развиваются конъюнктивит с включениями и респираторная инфекция, часто завершающаяся пневмонией. Патологический процесс в конъюнктиве новорожденных протекает в той же последовательности, которая была описана для первичного очага урогенитальной хламидийной инфекции. Однако из-за отсутствия в первые месяцы жизни развитой конъюнктивальной аденоидной ткани, в начале болезни проявляется не лимфоидная реакция с образованием фолликулов, а папиллярная гипертрофия конъюнктивы (Шаткин, Мавров, 1983). При пневмониях новорожденных имеет место интерстициальная пневмония с обширной инфильтрацией лимфоидными клетками ткани легких с облитерацией альвеол и бронхиол и выраженный некротизирующий бронхолит.

Патогенез экстрагенитальных хламидийных инфекций изучен недостаточно. Офтальмохламидиоз взрослых, возникающий при инфицировании глаз урогенитальными штаммами хламидий, имеет две формы – конъюнктивит с включениями и спорадическая трахома. Эти формы являются проявлениями одного и того же инфекционного процесса. Патогенез этих форм болезни отражает вирулентность возбудителя и различную степень иммунологических реакций макроорганизма, возникающих в ответ на разную частоту инфицирования (Шаткин, Мавров, 1983). Патологический процесс характеризуется отеком, гиперемией конъюнктивы, разрыхлением, дистрофическими изменениями и десквамацией эпителия. Возникают субэпителиальная инфильтрация, новообразования кровеносных и лимфатических сосудов (отражающие реакцию эпителиальной и аденоидной подконъюнктивальной

ткани), образуются лимфоидные фолликулы, а затем и папиллярная гипертрофия конъюнктивы. Фолликулярная реакция сопровождается некротическими изменениями разлитого характера. Наблюдается поражение роговицы типа аваскулярного кератита. Нередко развивается преаурикулярная аденопатия. В цитологическом анализе соскобов конъюнктивы преобладает лейкоцитарная реакция, но также имеются клетки лимфоидного ряда, ретикулоциты. Рассмотренные характеристики традиционно оцениваются в качестве типичных для конъюнктивита с включениями у взрослых, возникающего при однократном инфицировании. Выявленного поражения хряща век и слезной железы не наблюдается. Для синдрома трахомы (возникающего вследствие многократного инфицирования и присоединения соответствующих иммунопатологических реакций), помимо отмеченной патологии, наиболее характерно замещение подвергшихся некрозу фолликулов соединительной тканью с образованием рубцов, диффузное рубцевание инфильтрированных тканей и интенсивное сосудисто-инфильтративное поражение роговицы в виде паннуса. Для цитологической картины более характерна лимфоидная реакция, наличие юных и некротических лимфобластов, плазматических клеток, клеток Лебера, клеток Гумпрехта.

Патогенез венерической лимфогранулемы определяется биологическими особенностями ее возбудителя, обладающего высокой вирулентностью, являющегося сильным антигенным раздражителем и проявляющего выраженный лимфотропизм. После образования на месте внедрения (крайняя плоть, головка полового члена, половые губы, слизистая оболочка мочеиспускательного канала, влагалища, прямой кишки) кратковременного поражения в виде пузырька, папулы, язвы возбудитель по лимфатическим путям проникает в регионарные лимфатические узлы. Развивается лимфаденит. Образующиеся бубоны размягчаются, часто вскрываются с выделением гнойного содержимого. Возникает распространенное регионарное поражение лимфатических узлов и деструкция окружающих тканей с образованием спаек, фистул, стриктур. У женщин может наблюдаться развитие слоновости наружных половых органов. Микроорганизм, размножившийся в пораженных регионарных лимфоузлах, может распространяться по организму, вызывая генерализацию инфекции (менингит, артрит, пневмония, дерматит, перикардит и т. д.). В пораженных регионарных лимфатических узлах, а также в тканях промежности и половых органов возникают характерные патоморфологические изменения. Наблюдается интенсивная инфильтрация тканей плазматическими клетками, лимфоцитами и моноцитами с небольшим количеством нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов. В инфильтратах определяют макрофаги, пролиферирующие с образованием гигантских клеток. Образуются специфические узелки, напоминающие туберкулезные, которые подвергаются некрозу. Наблюдается также пролиферация фиброзной ткани. После затихания воспалительного процесса образуются фиброзные контрактуры. В эпителиоидных моноцитах обнаруживаются цитоплазматические включения возбудителя на разных стадиях его развития (Meyer, Eddie, 1964).

Весьма сложен патогенез уроокулосиновиального синдрома, или болезни Рейтера. Этиологическое значение хламидий в возникновении этой болезни в настоящее время сомнений не вызывает. Основными проявлениями являются воспалительный процесс в мочеполовых органах и поражение суставов, нередко сочетающиеся с различными проявлениями патологии глаза, кожи и слизистой оболочки. Женщины среди больных составляют от 1 до 5%. Однако половые партнеры больных мужчин обследуются крайне редко, что и определяет эти показатели. Хламидийная этиология уретрита при болезни Рейтера устанавливается методами

выделения или обнаружения возбудителя у 40-60% больных. Во многих исследованиях хламидии выделялись из синовиальной оболочки или синовиальной жидкости пораженных суставов. В 60-70% случаев болезни Рейтера в сыворотке крови больных определяются хламидийные антитела, а также выявляется бласттрансформация лимфоцитов в ответ на стимуляцию хламидийным антигеном. При моделировании хламидийного артрита у обезьян и кроликов установлено сходство патоморфологических проявлений хронического экспериментального артрита и естественной суставной патологии при болезни Рейтера. Предполагается, что хламидии – возбудители хламидийного уретрита – попадают в суставы и в качестве ключевого агента инициируют их патологию. Учитывая, что болезнь Рейтера возникает не более чем у 4% больных НГУ, вероятно, имеет значение генетическая предрасположенность к болезни – наличие у больных антигена В27 системы HLA. Высокая частота взаимосвязи болезни Рейтера с антигеном HLA-B27 (60-80%) подтверждалась многими исследователями, но в последнее время монополярная роль антигена HLA-B27 как обязательного фона для возникновения окулоурогенитального синдрома ставится под сомнение. Пониманию редкого возникновения болезни Рейтера у больных НГУ помогает установление различий по иммунотипу и биотипу между хламидиями, выделенными из суставов, и большинством уrogenитальных штаммов возбудителя хламидийного уретрита у мужчин (Агабабова, 1991). Тем не менее инфекционный генез не может объяснить многообразных сочетаний и проявлений рассматриваемого синдрома. На существование иммунопатологического компонента патогенеза болезни указывают и клинические наблюдения, и установление в сыворотке крови больных аутоантител к тканям предстательной железы, синовиальной оболочки, кожи, глаза (Ковалев, Ильин, 1993).

В патогенезе уrogenитальных хламидиозов большую роль играет персистентная (латентная) хламидийная инфекция с клинически бессимптомным течением, поэтому ее целесообразно рассмотреть отдельно. Малосимптомные уретриты и цервициты выявлены при профилактическом обследовании у 55% мужчин и 50% женщин – половых партнеров больных с манифестными проявлениями уrogenитальной инфекции. Также установлена этиологическая роль хламидий в 47% случаев «асимптомных» уретритов у мужчин, сопровождавшихся так называемым персистентным уrogenитальным лейкоцитозом (Мавров, 2002). Механизм возникновения и активации персистентной уrogenитальной хламидийной инфекции неизвестен. На уровне макроорганизма, кроме рассмотренных путей возникновения и активации персистентной хламидийной инфекции, активная роль должна принадлежать иммунным механизмам, что подробно обсуждалось выше.

## 7.6. РОЛЬ *CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE* В МЕХАНИЗМЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА

Атеросклероз – заболевание больших и средних артерий, характеризующееся их локальным утолщением (athero-) и уплотнением (sclerosis), которые могут привести к частичной или полной окклюзии сосуда, что сопровождается инфарктом, гангреной или нарушением функций органа. Атеросклероз имеет четкую стадийность в своем развитии. В формировании атеросклеротической бляшки принимают участие определенные типы клеток, которые взаимодействуют с компонентами сосудистой стенки. Выделяют шесть типов атеросклеротических поражений, которые являются стадиями непрерывного процесса (Stary et al., 1992; 1995). Первичное поражение (тип I) содержит единичные макрофаги и пенистые клетки (макрофаги и гладкомышечные клетки с накоплением липидов) и переходит в жировые прожилки (тип II), характеризующиеся увеличением количества пенистых клеток. Дальнейшее накопление

липидов приводит к экстрацеллюлярным жировым отложениям (тип III). Интенсивное отложение жиров сопровождается разрывом пенистых клеток и формированием липидного ядра – атеромы (тип IV). Последующая кальцификация и фиброз образуют фиброатерому (тип V), которая осложняется дефектами поверхности, геморрагиями и образованием тромбов, ведущих к окклюзии (тип VI). В формировании атеросклеротического поражения сосудов участвуют эндотелий и гладкомышечные клетки артериальной стенки, а также макрофаги, лимфоциты и васкулярные дендритические клетки (Munro, Cotran, 1988; Libby, Hansson, 1991; Ross, 1993; Bobryshev, Lord, 1998). Особое значение в патогенезе атеросклероза придается нарушениям липидного обмена, в результате которого образуются модифицированные липопротеиды низкой плотности (ЛНП) (Steinberg, Witztum, 1990). ЛНП захватываются эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками и макрофагами через специальный рецептор (LDL scavenger receptor). ЛНП могут модифицироваться в кровяном русле или при прохождении через эндотелиальные клетки в субэндотелиальное пространство. Модифицированные ЛНП привлекают моноциты, которые мигрируют в субэпителиальное пространство и превращаются в макрофаги. В результате поглощения ЛНП макрофаги и гладкомышечные клетки превращаются в пенистые клетки, которые образуют жировые отложения. Дальнейшее повреждение стенки артерий происходит за счет продукции цитокинов и факторов роста, что привлекает дополнительные воспалительные клетки и усиливает повреждение. Однако данный гипотетический механизм не проясняет всей картины происходящего атерогенеза. Часто атеросклероз не развивается при значительном повышении ЛНП. Нужен какой-то пусковой механизм. R. Ross (1993) выдвинул гипотезу «ответа на травму»: эндотелиальные клетки должны получить первичное повреждение в результате механического стресса, отложения иммунных комплексов, воздействия токсинов и инфекции. Это вызывает прикрепление и инвазию моноцитов/макрофагов и Т-лимфоцитов. При повышенном содержании ЛНП происходит их накопление в макрофагах и формирование пенистых клеток. Усиление адгезии макрофагов и накопление липидов приводят к повреждению эндотелия, присоединению тромбоцитов и развитию тромбозов. Тромбоциты и другие клетки продуцируют цитокины, которые усиливают воспалительный процесс, приводящий к повреждению сосудистой стенки. Ряд исследований показывает роль иммунного воспаления в первичном повреждении сосудистой стенки при атеросклерозе (Wick et al., 1995). Пусковым механизмом для такого воспаления вполне может быть инфекция эндотелия артерий. Инфекционная теория атеросклероза получила в последние годы весомое подтверждение в результате обнаружения связи между различными бактериальными и вирусными инфекциями и атерогенезом. (Cook, Lip, 1996; Dariesh et al., 1997; Ellis, 1997; Libby et al., 1997; Mattila et al., 1998; Mehta et al., 1998; Meniconi et al., 1998).

Возможная причинная связь между *C. pneumoniae* и атеросклерозом, показанная в результате многочисленных исследований, может быть окончательно установлена только после раскрытия клеточных и молекулярных механизмов развития данной патологии, включая известные факторы риска. *C. pneumoniae* способна инфицировать большинство клеток, вовлеченных в процесс атерогенеза, включая эндотелий, гладкомышечные клетки и макрофаги. Хотя в отношении макрофагов имеются известные ограничения (Airenne et al., 1998). Установлено, что у здоровых субъектов антитела к *C. pneumoniae* статистически связаны с изменением профиля сывороточных липидов. Более того, если заразить макрофаги человека *C. pneumoniae* или *C. trachomatis* и инкубировать их с липидами низкой плотности, то уже через 22 часа они трансформируются в пенистые клетки, являющиеся характерными для ранней атеромы (Laurila et al., 1997; Kalayoglu, Bume, 1998). Механизм этой трансформации таков, что хламидии,



вмешиваясь в процессы сигнальной трансдукции и транскрипции клетки-хозяина, нарушают регуляторную функцию рецепторов, ответственных за удаление лишних липидов из клетки. Таким образом, формирование пенистых клеток может начаться еще до того, как инфицированные макрофаги попадут в интиму сосудов. Воспаление, сопровождающее атерому, ведет к появлению адгезинов на поверхности эндотелия сосудов (Amberger et al., 1997). Это усиливает миграцию макрофагов, в том числе и инфицированных *C. pneumoniae*, в атероматозную бляшку. Понимание того, каким образом хламидии запускают образование пенистых клеток, помогает пролить свет на вопрос о роли *C. pneumoniae* в развитии ишемической болезни сердца.

На ранних стадиях атеросклероза Т-лимфоциты и моноциты являются первыми клетками, инфильтрирующими интиму артерий. Значительная часть Т-клеток, изолированных из атеросклеротической бляшки, реагирует против человеческого Hsp60. Миграция активированных Т-лимфоцитов в интиму артерий опосредуется адгезиновыми молекулами (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1), экспрессируемыми на эндотелиальных клетках в результате воздействия провоспалительных цитокинов. Атеросклероз обычно развивается в местах, подверженных гемодинамическим расстройствам и стрессам, какими являются, например, места разветвления коронарных артерий. Нарушения гемодинамики и тепловой шок индуцируют продукцию эндотелиальными клетками Hsp60 и Hsp70. В экспериментах *in vitro* с помощью жидкой цитометрии было показано, что артериальный эндотелий, в отличие от венозного эндотелия, продуцирует ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 под воздействием умеренно или сильно окисленных липидов низкой плотности. Совместная экспрессия Hsp60 и упомянутых адгезинов имеет место как в венозных, так и в артериальных клеточных культурах в результате воздействия провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-1) или липополисахарида *E. coli* (Amberger et al., 1997). Выработка собственного Hsp60 и присутствие хламидийного Hsp60 приводит к В-клеточному и Т-клеточному ответу на эти антигены. И действительно, уровни специфических антител к бактериальным и собственным белкам теплового шока повышаются у больных с выраженным атеросклерозом (Metzler et al., 1997). Иммунизация кроликов с нормальным содержанием холестерина в крови Hsp65 ведет к развитию атеросклеротических поражений интимы аорты, и эти первичные изменения усиливаются на фоне богатой холестерином диеты. Антитела к хламидийным Hsp в смеси с комплементом являются цитотоксичными для артериального эндотелия, подвергшегося тепловому шоку. Гибель эндотелия даже на небольших участках артерий сердца или мозга ведет к контакту коллагена с сосудистым руслом и высвобождению факторов роста, таких как PDGF, и тромбообразующих факторов из тромбоцитов. Известно, что PDGF является мощным стимулятором пролиферации гладкомышечных клеток и, возможно, влияет на ангиогенез, характерный для атеромы. В тяжелых случаях тромбообразующие факторы могут привести к тромбозу и ишемии. Хламидийный Hsp60 обычно находится в макрофагах в атеросклеротической бляшке, где он локализуется рядом с человеческим Hsp. В поражениях сосудов неатеросклеротического генеза какие-либо белки теплового шока не содержатся. ЭТ *C. pneumoniae*, Hsp хламидий и человека, липополисахарид *E. coli* индуцируют образование TNF- $\alpha$  в мышинных макрофагах. Хламидии также способствуют образованию матричных металлопротеаз, которые принимают участие в формировании компонентов клеточной стенки (Kol et al., 1998). В другом исследовании хламидийный липополисахарид и целые ЭТ вызывали высвобождение TNF- $\alpha$  из цельной крови *in vitro* (Ingalls et al., 1995). Хламидийные ЭТ индуцировали транслокацию NF- $\kappa$ B в клеточной культуре овариальных фибробластов китайских хомяков. Они взаимодействовали с липополисахаридным рецептором CD14, что вызывало продукцию провоспалительных цитокинов, которые в свою очередь, способствовали экспрессии эндотелиальных адгезинов.

Хламидийные липополисахариды не отличаются выраженной способностью вызывать воспаление. Это свойство у них в 100 раз менее выражено, чем у ЛПС-гонококка и *Salmonella minnesota*. Однако хламидийный липополисахарид чрезвычайно резистентный к разрушению его макрофагами и может длительно персистировать в пенистых клетках, вызывая длительную, но незначительную индукцию провоспалительных цитокинов (Ingalls et al., 1995; Nettelbladt et al., 1998). Этим можно объяснить, каким образом хроническая инфекция *C. pneumoniae* может усилить действие известных факторов риска в возникновении ишемической болезни сердца. В результате исследований последних лет выявляются новые гипотетические механизмы развития сердечной патологии при хламидийной инфекции. Bachmaier и соавторы (1999) опубликовали в журнале Science, что участок белка наружной мембраны 60 килоДальтон *C. trachomatis* и, в меньшей степени *C. pneumoniae*, частично повторяет структуру 30-аминокислотного пептида молекулы тяжелой цепи тканеспецифичного сердечного  $\alpha$ -миозина. Данный пептид вызывает инфаркт у мышей линии BALB/c. Если этих мышей иммунизировать указанным хламидийным пептидом в полном адьюванте Фрейнда или с клонированной хламидийной ДНК, богатой цитозин-гуанином, то у них развивается миокардит. Это пример перекрестной реакции хламидийных антигенов с тканеспецифичными белками макроорганизма, в отличие от белков теплового шока, которые присущи всем видам клеток.

Meir и соавторы (1999) опубликовали в журнале американской медицинской ассоциации (JAMA) результаты обширного исследования «случай-контроль», в котором участвовали 3315 больных инфарктом миокарда и 13139 лиц контрольной группы, подходящих по полу, возрасту, социальному и этническому происхождению. Сравнивались данные о приеме антибиотиков по поводу различных заболеваний в течение трех предшествовавших лет. Было установлено, что больные с инфарктом намного реже принимали тетрациклины и фторхинолоны. Это может служить индикатором не прямой связи инфекций, чувствительных к данным препаратам, и ишемической болезни сердца. Примечательно, что подобных результатов в отношении эритромицина, к которому *C. pneumoniae* также чувствительна, получено не было. В опубликованной в том же номере критической статье Folsom (1999) подчеркивается, что экспериментальных доказательств профилактического действия антибиотиков на ИБС пока не получено. Из исследования Meir и соавторов были исключены пациенты с известными факторами риска ИБС – гипертонией и дислипидемией, поэтому выборка не является репрезентативной по отношению к общей популяции. Скорее всего, если антибиотики и могли предотвратить инфаркт в течение 3 лет, то это было воздействие на такие факторы, как разрыв аневризмы или тромбоз, а не на атеросклероз.

## ГЛАВА 8.

### ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Морфологические исследования хламидийной инфекции немногочисленны. Они связаны, в основном, с изучением трахомы и половой инфекции. Тем не менее полученные результаты могут дать представление о морфологической сущности хламидиоза и показывают особенности взаимоотношений хламидий с клетками и тканями *in vivo*. Ряд исследователей изучали биоптаты конъюнктивы при активной и неактивной стадии трахомы (Burd et al., 1988; El-Asrar et al., 1989; Reacher et al., 1991). Было проведено изучение образцов тканей шейки матки, эндометрия и фаллопиевых труб при урогенитальном хламидиозе

(Moller et al., 1979; Paavonen et al., 1982; Kiviat et al., 1985, Dunlop et al., 1989; Kiviat et al., 1990a, Kiviat et al., 1990b).

В наших исследованиях показана высокая частота (до 90%) сочетания хламидийного уретрита и цервицита с образованием лимфоидных фолликулов. У больных нередко выявляли рубцевание слизистой оболочки, сосочковые (папиллярные) разрастания эпителия, что также характерно для офтальмохламидиозов. У женщин в качестве наиболее частого признака хламидийного цервицита выявляли гипертрофическую эрозию с эндоцервикальным отделяемым слизисто-гнояного характера. Цитологический субстрат в воспалительном очаге представлен нейтрофильными лейкоцитами, гистиоцитами, моноцитами и гигантскими клетками, поглощающими клеточный детрит. Хламидийная инфекция половых органов сопровождается диффузной инфильтрацией слизистой оболочки – преимущественно лимфоцитами и плазматическими клетками (Мавров, Цераидис, 1993; Мавров, Шевченко, 1993; Мавров, 1994; Мавров и соавт., 1994; Мавров, Мальцева, 2003). На основании полученных данных была составлена общая гистологическая картина хламидиоза, характеризующаяся нейтрофильной экссудацией слизистого слоя и инфильтрацией подслизистой основы активированными Т- и В-лимфоцитами, гистиоцитами, макрофагами, дендритическими клетками. В инфильтрате присутствуют CD8 и CD4 Т-клетки. В-лимфоциты и лимфобласты образуют четко ограниченные фолликулы или герменативные центры. Наличие лимфоидных фолликулов характерно для хронической, осложненной восходящей хламидийной инфекции с поражением внутренних половых органов. Так, в шейке матки лимфоидные фолликулы находят у 10% больных, если судить по суммарным данным гистологических исследований. Тогда как в эндометрии их находят у 92% больных при восходящей инфекции ( $P < 0.001$ ) (Brunham, 1999). Таким образом, наличие лимфоидных фолликулов при хламидиозе коррелирует с восходящей осложненной инфекцией. Механизм образования фолликулов при хламидиозе во многом может объяснить патогенез этой инфекции. Формирование диффузной плазмоклеточной инфильтрации в *lamina propria* без значительного присутствия Т-лимфоцитов является характерным для поздней стадии фиброза при хламидийном поражении маточных труб (Brunham et al., 1992).

В литературе имеются лишь единичные публикации о патоморфологических проявлениях хламидийной урогенитальной инфекции у мужчин. Не охарактеризованы изменения, происходящие в ткани предстательной железы, семенных лузурьков, семенного канатика, яичка и его придатка. Остаются нераскрытыми причины, обуславливающие нередко наблюдаемые изменения спермы. При введении хламидий в семявыносящий проток зеленым мартышкам, Meller и Mardh (1980) наблюдали лейкоцитарную, а затем и лимфоидную инфильтрацию всех слоев протока, с обильным экссудатом в его просвете и нарушением целостности эпителиального покрова. Через 7-14 дней развивался эпидидимит, сопровождавшийся на протяжении 60 дней интенсивной экссудативно-пролиферативной реакцией того же состава, приводившей к значительному сужению просвета и частичной облитерации протока придатка яичка. Одновременно наблюдали отек и гиперемии интерстициальной ткани увеличенного в размере яичка.

Изучение клеточного состава инфильтрата и роли каждого вида клеток в иммунных и патологических реакциях в очаге воспаления при хламидийной инфекции характеризует современное направление морфологических исследований при хламидиозе. Т-лимфоцитам необходимы молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКС) для распознавания антигена.

Эпителиальные клетки из мест инфицирования хламидиями постоянно экспрессируют молекулы ГКС класса I и только при определенных условиях молекулы ГКС класса II (Mabey et al., 1991). Экспрессия эпителиоцитами молекул класса II ГКС может индуцироваться благодаря гамма-интерферону (IFN- $\gamma$ ), который регулирует активность генов  $\alpha$  и  $\beta$  молекул класса II ГКС и обнаруживается в местах инфицирования хламидиями (Arno et al., 1990).

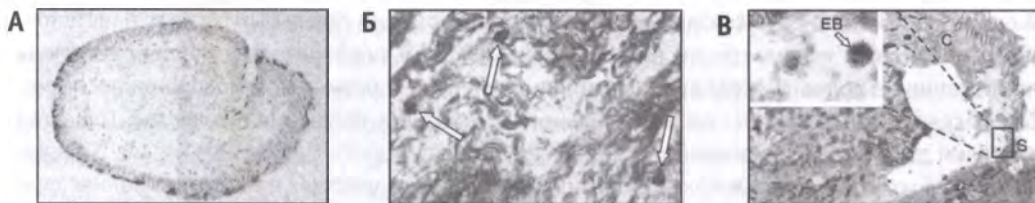
До настоящего времени не установлено, могут ли эпителиоциты выступать в качестве антиген-презентирующих клеток для CD8 и CD4 Т-лимфоцитов. В местах инфицирования хламидиями профессиональные антиген-презентирующие клетки присутствуют в большом количестве. Это макрофаги (гистиоциты), дендритические клетки, В-лимфоциты. Макрофаги могут накапливать хламидии, поскольку хламидии размножаются в макрофагах (Yong et al., 1987; Rothermel et al., 1989; Manor and Sarov, 1986; Bianchi et al., 1997). В исследованиях *in vitro* макрофаги могут служить в качестве клеток, представляющих антиген лимфоцитам, только после инактивации параформальдегидом (Su and Caldwell, 1995). Ведущую роль в представлении антигенов хламидий лимфоцитам играют дендритические клетки. Хламидии внедряются в дендритические клетки, но не размножаются в них, поскольку происходит быстрое слияние хламидийной эндосомы с лизосомами и последующая обработка и связывание с молекулами класса II ГКС (Ojcius et al., 1998). Дендритические клетки рекрутируются к местам хламидийной инфекции посредством воспалительных цитокинов, высвобождаемых при хламидийной инфекции. Известно, что эпителиальные клетки при инфицировании хламидиями выделяют GM-CSF – цитокин, вызывающий созревание дендритических клеток (Banchereau and Steinman, 1998). Вполне возможно, что В-лимфоциты также могут играть важную роль в представлении антигенов хламидий Т-лимфоцитам. Так, у мышей с генетическим дефектом В-лимфоцитов активация Т-лимфоцитов существенно нарушается (Yang and Brunham, 1998).

### 8.1. ГИСТОПАТОЛОГИЯ МАТОЧНЫХ ТРУБ У БОЛЬНЫХ С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Хламидийная этиология сальпингита у бесплодных женщин с маркерами хламидийной инфекции доказана с помощью иммуногистохимии, ДНК-гибридизации *in situ*, электронной микроскопии и выделения хламидий в культуре клеток из биоптатов маточных труб (рис. 8.1) (Campbell et al., 1993; Patton et al., 1994).

Структурные изменения в маточных трубах при хламидиозе обусловлены хроническим рецидивирующим воспалением с исходом в склероз. При морфологических исследованиях, проведенных в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, выделено три степени выраженности склеротических изменений маточной трубы. При хламидийном сальпингите просвет маточных труб уменьшен, деформирован, заполнен экссудатом и клетками воспалительного инфильтрата. В тяжелых случаях отмечено разделение просвета на 2-3 канала за счет образующихся между стенками трубы поперечных синехий, представленных плотной, волокнистой соединительной тканью с обилием сосудов и периваскулярно выраженной инфильтрацией лимфоцитами. Один из каналов часто полностью облитерирован и может служить «ловушкой» для оплодотворенной яйцеклетки, продвигающейся по трубе на ранних стадиях беременности. Эти данные могут объяснить частое возникновение трубной беременности при хламидиозе (Мавров, Цераидис, 1993; Мавров, Шевченко, 1993; Мавров, 1994; Мавров и соавт., 1994; Мавров, Мальцева, 2003).





**Рисунок 8.1.** Обнаружение *Chlamydia trachomatis* в маточных трубах больных трубным бесплодием (Patton et al., 1994).

- А.** Срез ткани маточной трубы, окрашенный иммунопероксидазным методом для выявления антигена *C. trachomatis* (мышинные моноклональные антитела КК-12 против видоспецифической детерминанты главного антигена наружной мембраны). Участки, содержащие хламидийный антиген, окрашены в темный цвет. Увеличение  $\times 16$ .
- Б.** Участок спайки маточной трубы. Хламидийная ДНК (стрелки) обнаруживается в местах скопления коллагеновых волокон с помощью гибридизации *in situ*. Увеличение  $\times 40$ .
- В.** Электронная микроскопия препарата маточной трубы больной бесплодием. Элементарные тельца *C. trachomatis* видны во включении в цитоплазме секреторного эпителиоцита (S). Рядом находится реснитчатый эпителиоцит (C). Увеличение  $\times 8\ 900$ . Вставка: Элементарное тельце *C. trachomatis* (EB). Увеличение  $\times 61\ 900$ .

При I степени тяжести отмечается умеренное утолщение и укорочение складок в результате выраженного полнокровия, отека, лимфостаза. Характерна диффузная инфильтрация нейтрофильными полиморфноядерными лейкоцитами (ПМЯЛ) и лимфоцитами. Клетки инфильтрата проникают в эпителиальную выстилку, что сопровождается некрозом, лизисом и десквамацией эпителия (рис. 8.2). Склеротические изменения на этом этапе минимальные, очагово-сегментарные. Коллагеновые волокна в участках склероза при окрашивании по Ван Гизону ярко-красные (фуксинофильные), резко ШИК-позитивные. При окраске толуидиновым синим они ортохромные, обладают ярким двойным лучепреломлением. Исходная оптическая сила примерно равна 4,0 ( $\sigma=0,18$ ;  $m=\pm 0,03$ ;  $W=4,5\%$ ). Фенольный индекс Эбнера – 2,18 ( $\sigma=0,35$ ;  $m=\pm 0,06$ ;  $W=16,1\%$ ). Поляризационно-оптические индексы содержания нейтральных мукополисахаридов и гликозаминогликанов составляют, соответственно, 2,23 ( $\sigma=0,19$ ;  $m=\pm 0,03$ ;  $W=8,5\%$ ) и 2,02 ( $\sigma=0,20$ ;  $m=\pm 0,04$ ;  $W=9,5\%$ ). При I степени тяжести воспалительного процесса мышечный слой, как правило, истончен, имеет место отек, разрыхление мышечных пучков. На границе мышечного и серозного слоев обнаруживается обилие сосудов с утолщенными, склерозированными стенками. Серозная оболочка полнокровная, отекая, отмечается слабо выраженная периваскулярная инфильтрация лимфоцитами и нейтрофильными ПМЯЛ.

Прогрессирование заболевания (II степень тяжести) сопровождается нарастанием структурно-функциональных изменений в стенке трубы. Продольные складки значительно расширены, частично в результате кровенаполнения и лимфостаза, частично – из-за разрастания плотной, волокнистой соединительной ткани. Эта соединительная ткань представлена субэпителиально и периваскулярно расположенными пучками коллагеновых волокон, окрашенных в ярко-красный цвет по Ван Гизону, резко ШИК-позитивных, обладающих ярким двойным лучепреломлением, в среднем равным 5,10 ( $\sigma=1,45$ ;  $m=\pm 0,22$ ;  $W=23,3\%$ ). Фенольный индекс Эбнера равен 1,33 ( $\sigma=0,25$ ;  $m=\pm 0,06$ ;  $W=17,4\%$ ). Поляризационно-оптический индекс содержания нейтральных мукополисахаридов составляет 1,42 ( $\sigma=0,23$ ;  $m=\pm 0,04$ ;  $W=16,2\%$ ), индекс сульфатированных гликозаминогликанов – 1,62 ( $\sigma=0,42$ ;  $m=\pm 0,07$ ;  $W=26,2\%$ ).



В сосудистом компоненте складок выражено полнокровие. В отдельных сосудах пристеночно располагаются мелкие группы нейтрофильных ПМЯЛ и лимфоцитов. Эпителий складок на протяжении не более 30% однорядный, цилиндрический, с равным соотношением реснитчатых и секреторных клеток. На значительном протяжении поверхности складок (60-70%) эпителий двух- и многорядный (призматический и кубический). Некробиотические и воспалительные изменения весьма разнообразны. На отдельных участках происходит полная очаговая атрофия эпителия. Рядом могут быть участки, в которых преобладает альтеративный компонент воспаления с полным разрушением эпителиальной выстилки. В то же время наблюдается пролиферация эпителия с формированием полиповидных выростов, состоящих из гиперхромных малодифференцированных эпителиальных клеток, и инфильтратов лимфоцитов, плазматических клеток вокруг сосудов микрогемоциркуляторного русла (рис. 8.3).



Рисунок 8.2.



Рисунок 8.3.

**Рисунок 8.2.** Слизистая оболочка маточной трубы. Скопление полиморфноядерных лейкоцитов в эпителиальной выстилке, очаговый некроз, лизис и десквамация эпителия. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200. (Мавров, Мальцева, 2003).

**Рисунок 8.3.** Слизистая оболочка маточной трубы. Очаги альтеративного и пролиферативного воспаления с формированием мелких полиповидных выростов из мелких гиперхромных эпителиальных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение x 200. (Мавров, Мальцева, 2003).

При II степени тяжести повреждений мышечный слой истончен, мышечные пучки разволокнены, атрофированы. На значительном протяжении они замещены плотной, волокнистой соединительной тканью. Большинство сосудов представлено венулами с эктазированным просветом и набухшим эндотелием. Имеет место неравномерный склероз и гиалиноз стенок сосудов. Вокруг сосудов наблюдается выраженный отек, инфильтрация лимфоидными клетками вместе с нейтрофильными ПМЯЛ и гистиоцитами. Имеются также плазматические клетки. В просвете некоторых сосудов видны мелкие скопления лимфоцитов и нейтрофильных ПМЯЛ с явлениями краевого стояния. Серозный слой утолщен из-за выраженного полнокровия и отека. В просвете значительной части сосудов в большом количестве обнаруживаются ПМЯЛ с картиной лейкоцитопедеза. Периваскулярный инфильтрат состоит из ПМЯЛ и лимфоцитов. Среди рыхло расположенных коллагеновых волокон встречаются единичные плазматические клетки.

При III степени тяжести патологического процесса складки слизистой оболочки маточной трубы резко утолщены. Имеет место ангиоматоз в сочетании с обширными пучками плотной, волокнистой соединительной ткани (рис. 8.4).



По гистохимическим и гистофизическим характеристикам эта часть стромы продольных складок соответствует рубцовой соединительной ткани. В таких участках пучки коллагеновых волокон ярко-красные при окраске по Ван Гизону, резко ШИК-позитивные и содержали преимущественно сульфатированные гликозаминогликаны. Исходная оптическая сила двойного лучепреломления коллагеновых волокон составляет 5,76 ( $\sigma=0,02$ ;  $t=\pm 0,04$ ;  $W=4,3\%$ ), фенольный индекс Эбнера – 2,19 ( $\sigma=0,36$ ;  $t=\pm 0,07$ ;  $W=6,3\%$ ), поляризационно-оптические индексы содержания нейтральных мукополисахаридов и гликозаминогликанов равны, соответственно, 2,29 ( $\sigma=0,20$ ;  $t=\pm 0,04$ ;  $W=8,8\%$ ) и 2,03 ( $\sigma=0,99$ ;  $t=\pm 0,18$ ;  $W=48,8\%$ ). Во всех складках встречаются сосуды с мукоидным набуханием и очаговыми фибриноидными изменениями, а также сосуды с утолщенной, склерозированной и гиалинизированной стенкой, в которой ШИК-реакция была резко положительной. В большинстве сосудов выражено полнокровие, в их просвете находятся преимущественно эритроциты. Отмечается диффузный отек стромы. В наблюдениях III степени тяжести лишь на отдельных участках слизистой оболочки эпителий однорядный, цилиндрический, с сохраненной реснитчатой каемкой. На значительном протяжении эпителий двух- и многорядный, с десквамацией. В эпителиальной выстилке встречаются множественные очаги экссудативно-пролиферативного воспаления. Местами эти пролиферирующие участки образовывали полиповидные выступы, состоящие из молодых секреторирующих клеток. Эти клетки продуцируют слизь, включающую ШИК-позитивные нейтральные мукополисахариды с небольшим количеством гликозаминогликанов. Встречаются мелкие складки с выраженной очаговой альтеративно-экссудативной реакцией в эпителиальном слое и формированием небольших групп лимфоцитов и мелких гистиоцитарных гранул в подлежащей строме (рис. 8.5).

Мышечный слой стенки трубы резко истончен. Сохранены лишь одиночные пучки гладкомышечных клеток, разделенные рыхло расположенными пучками коллагеновых волокон. В мышечном слое много толстостенных сосудов с выраженным фиброзом и гиалинозом стенок. В мелких сосудах, капиллярах и артериолах наблюдается пролиферативный эндо- и периваскулит. Клеточная реакция слабая. Видны небольшие скопления лимфоцитов и единичные плазматические клетки (рис. 8.6).

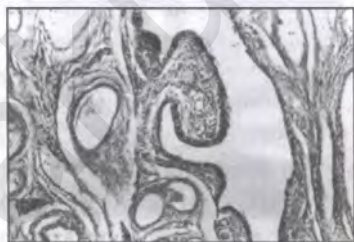


Рисунок 8.4.

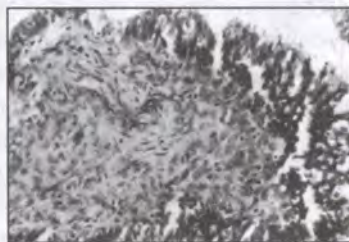


Рисунок 8.5.

**Рисунок 8.4.** Слизистая оболочка маточной трубы. Резкое укорочение и утолщение продольных складок с выраженным ангиоматозом и склерозом стромы. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ . (Мавров, Мальцева, 2003)

**Рисунок 8.5.** Слизистая оболочка маточной трубы. Альтеративно-экссудативное воспаление с некрозом и десквамацией эпителия. Очаговая инфильтрация лимфоцитами, очаговая пролиферация гистиоцитов. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 400$ . (Мавров, Мальцева, 2003)



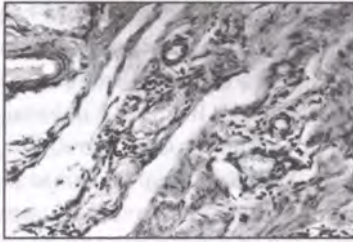


Рисунок 8.6.

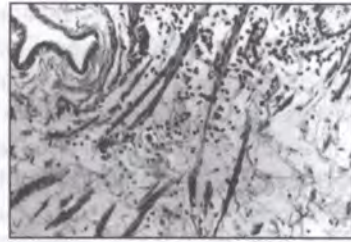


Рисунок 8.7.

**Рисунок 8.6.** Мышечная оболочка маточной трубы. Атрофия мышечных волокон, склероз и гиалиноз коллагеновых пучков, мелкие лимфоцитарные и гистиоцитарные инфильтраты. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ . (Мавров, Мальцева, 2003)

**Рисунок 8.7.** Серозная оболочка маточной трубы. Полнокровие, отек, умеренно выраженная клеточная инфильтрация лимфоцитами и плазматическими клетками. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 200$ . (Мавров, Мальцева, 2003)

В серозной оболочке наряду с острыми воспалительными изменениями выражены признаки хронического воспаления. Можно наблюдать много пучков плотных гиалинизированных коллагеновых волокон с наложением фибрина. Серозная оболочка, как правило, утолщена, отмечается резкая эктазия просвета капилляров и венул. Периваскулярные инфильтраты необильны и представлены мононуклеарами, эозинофильными ПМЯЛ, а также плазматическими клетками, находящимися на разных этапах дифференцировки (рис. 8.7).

Таким образом, морфологические изменения в слизистой, мышечной и серозной оболочках маточной трубы представляют собой подострое либо хроническое воспаление с исходом в склероз. Условно нами выделены 3 степени тяжести воспалительного процесса в слизистой оболочке маточных труб при хламидиозе (Мавров, Цераидис, 1993; Мавров, Шевченко, 1993; Мавров, 1994; Мавров и соавт., 1994; Мавров, Мальцева, 2003). Дистрофические изменения мышечной оболочки проявляются атрофией мышечных пучков, их постепенным замещением соединительной тканью. Воспаление в слизистой оболочке носит хронический, рецидивирующий характер. Экссудативные и пролиферативные процессы имеют место на разных участках продольных складок одновременно, что приводит к формированию обширных очагов склероза и ангиоматоза. В воспалительном инфильтрате преобладают лимфоциты, которые формируют фолликулоподобные скопления. Наблюдается альтерация и десквамация эпителиальных клеток. Эпителиальная выстилка местами атрофируется, местами пролиферирует, образуя двух- и многослойный эпителий, лишенный ресничек. Гистохимические и поляризационно-оптические данные указывают на накопление мукополисахаридов и гликозаминогликанов, образование рубцовой соединительной ткани. Все это происходит при сохраненном (вначале) просвете трубы, ее продольной складчатости, хотя просвет уменьшается, а складчатость меняется.

Маточные трубы с подобными морфологическими изменениями не могут обеспечить прием и транспорт яйцеклетки. «Формально» такие трубы проходимы при контрастных гистеросальпингографических и лапароскопических обследованиях, но вероятность зачатия и имплантации яйцеклетки в таких случаях весьма низка.



Морфологические изменения в маточных трубах не всегда соответствуют тяжести сальпингита, протекающего у большинства больных латентно или малосимптомно. Клинические (боль, лихорадка, выделения), лабораторные (количество лейкоцитов в периферической крови, СОЭ, биохимические показатели крови) и даже лапароскопические данные (эритема, отек, подвижность, наличие спаек, фибрина, состояние фимбрий) часто не позволяют предположить тяжелые морфофункциональные изменения в полости трубы. Это наталкивает на мысль о том, что хламидийный сальпингит не всегда проявляется клинически, может долго оставаться латентным и невыявленным, приводя в конечном итоге к трубному бесплодию и/или внематочной беременности.

## 8.2. УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ПАТОЛОГИЯ СТЕНКИ МАТОЧНЫХ ТРУБ

При электронно-микроскопическом исследовании слизистой оболочки маточных труб у больных мочеполовым хламидиозом получены морфологические доказательства хламидийной инфекции. Показано внедрение в эпителиоциты отдельных телец хламидий (начальный этап инфицирования клетки) и образование характерных плазматических включений, содержащих хламидии на разных этапах развития.

На микрофотографии (рис. 8.8) показана ультраструктура эпителиоцитов ампулярного отдела маточной трубы больной (25 лет), у которой была произведена операция реконструкции маточных труб в связи с трубным бесплодием.

В цитоплазме эпителиоцита видно включение I типа, характеризующееся правильной округлой формой, напоминающее «раздутый пузырь» и содержащее немного телец хламидий. На апикальной поверхности пораженного эпителиоцита видна деструкция и фрагментация микроворсинок.

На рис. 8.9 изображена ультраструктура слизистой оболочки воронки маточной трубы больной (34 года), страдающей хроническим сальпингоофоритом и трубно-перитонеальным бесплодием, у которой была произведена операция по удалению спаек.

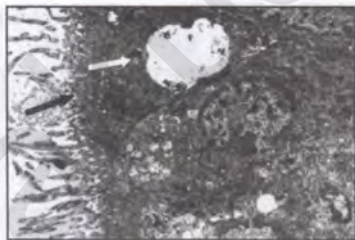


Рисунок 8.8.

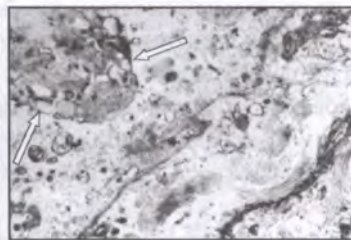


Рисунок 8.9.

**Рисунок 8.8.** Ультраструктура слизистой оболочки ампулярного отдела маточной трубы больной трубным бесплодием. Включение I типа, содержащее единичные тельца хламидий (белая стрелка). Деструкция и фрагментация микроворсинок эпителиоцита (черная стрелка). Увеличение  $\times 5\ 000$ .

**Рисунок 8.9.** Ультраструктура слизистой оболочки воронки маточной трубы больной хроническим сальпингоофоритом. Включение II типа в эпителиальной клетке (стрелки). Участок деструкции слизистой оболочки (внизу справа). Увеличение  $\times 10\ 000$ .



На микрофотографии видно большое включение II типа, имеющее неправильное очертание, плотно заполненное морфологическими структурами хламидий и продуктами их жизнедеятельности. Внутри включения различимы формы хламидий, находящиеся на различных стадиях развития: оптически плотные элементарные тельца, менее плотные и крупные ретикулярные тельца, некоторые из них находятся в процессе бинарного деления. Во включении можно наблюдать и атипичные формы хламидий: гигантские пузырьковидные и мелкие формы. Подобные формы возбудителя трактуются как L-формы хламидий с различной степенью дефекта клеточной стенки и являются морфологическим свидетельством длительной персистенции хламидий в клетках хозяина. У *C. trachomatis* известны L-формы, образующиеся под влиянием препаратов, подавляющих синтез клеточной стенки. Характерно, что данная больная (рис. 8.9) неоднократно получала курсы полусинтетических производных пенициллина при возникновении обострений сальпингоофорита.

В свое время в работах группы исследователей под руководством А.А. Шаткина были описаны цитоплазматические включения I и II типов и различные атипичные формы хламидий, выявленные при заражении культуры клеток L-929 хламидиями, выделенными от больных урогенитальной патологией. Морфологические особенности возбудителя мочеполовых хламидиозов были показаны авторами на модели *in vitro*, в культуре клеток (Шаткин и соавт. 1981; Шаткин, Попов, 1986; Орлова и соавт. 1986). В наших исследованиях схожие ультраструктурные особенности урогенитальной хламидийной инфекции впервые продемонстрированы *in vivo*, в эпителиоцитах маточных труб (Мавров и соавт., 1994; Мавров, 1996). При возникновении и течении урогенитальной хламидийной инфекции происходят не только размножение и персистенция возбудителя в клетках-мишенях, но и их патологические изменения на ультраструктурном уровне. Кроме того, имеют место ультраструктурные изменения, вызванные иммунобиологическими механизмами, в частности, воспалением и его последствиями. Ниже приводится детальное описание изменений ультраструктуры слизистой оболочки маточной трубы при урогенитальном хламидиозе.

При электронномикроскопическом исследовании слизистая ампулярного отдела маточной трубы имеет эпителий призматической формы с выраженной неравномерностью структуры ресничек на апикальной поверхности. Длинные и толстые реснички, с четко определяемым микротрубочковым скелетом, чередуются с короткими и тонкими. Цитоплазма эпителиоцитов характеризуется определенной ориентированностью элементов эргастоплазмы относительно боковой поверхности этих клеток. Ближе к апикальной поверхности эпителиоцитов определяется заметная дезориентация элементов эндоплазматической сети, митохондрий. В окооядерной зоне клеток каналцы гранулярной эндоплазматической сети (ГЭС) имеют протяженную форму и ориентированы друг относительно друга. Митохондрии имеют палочковидную форму. В апикальной поверхности этих клеток определяется хаотическое расположение коротких митохондрий и цистерн эндоплазматической сети. В уплощенных каналцах ГЭС выявляются мелкодисперсные массы, в митохондриях определяются короткие кристы и неравномерно просветленный матрикс. Ядро эпителиальных клеток имеет преимущественно вытянутую «сигарообразную» форму и ориентировано вдоль большего линейного размера этих клеток. В ядре эпителиоцитов преобладает мелкоглыбчатый (мелкодисперсный) эухроматин, а глыбки гетерохроматина определяются по периферии ядер и несколько хаотично расположены по всему объему в просветленной кариоплазме (рис. 8.10). Эпителиоциты поверхностного слоя слизистой оболочки содержат часто два ядрышка небольших размеров



округлой формы и высокой электронной плотности. В местах, где эпителий имеет два и более слоев клеток, ближе к базальной мембране, эпителиоциты имеют преимущественно полигональную форму и сложно контурированное ядро. В некоторых эпителиальных клетках, расположенных в поверхностном слое слизистой оболочки, определяются зоны разрежения и локального лизиса элементов эргастоплазмы (рис. 8.10), а в непосредственной близости к поверхности ядра выявляются мелкие тельца хламидий. Некоторые микробные тельца обнаруживаются в эктоплазме у апикальной поверхности клеток реснитчатого эпителия. В цитоплазме некоторых эпителиоцитов определяются также включения хламидий, чаще в апикальной части клетки.

Базально-расположенные эпителиальные клетки многослойных участков слизистой оболочки заметно отличаются по ультраструктуре от эпителиоцитов поверхностного слоя. Базальные эпителиоциты чаще имеют полигональную форму, содержат крупное ядро причудливой формы с многочисленными инвагинациями ядерной оболочки. В структурной организации ядрышка в таких ядрах наблюдаются морфологические изменения. Ядрышко имеет пространственную форму крупных размеров и располагается эксцентрично, часто вблизи от глубоких инвагинаций ядерной мембраны. Структурная взаимосвязь инвагинаций и ядрышка свидетельствует о морфофункциональной гетерогенности различных зон ядра эпителиальных клеток.

Среди эпителиальных клеток обнаруживаются лимфоциты, содержащие круглое ядро, окаймленное относительно узкой полоской просветленной плазмы (рис. 8.11). Наличие лимфоцитов в слое эпителиальных клеток является одним из морфологических признаков слизистого иммунного ответа при хламидиозе.

В цитоплазме некоторых эпителиоцитов определяются обширные участки деструкции элементов эргастоплазмы в виде мелкоглыбчатого распада органелл, вакуолизации и лизиса основной фазы гиалоплазмы (рис. 8.12). Ядра в таких клетках подвергаются пикнозу и уменьшаются в размерах, а на апикальной поверхности плазмолеммы обнаруживаются фрагментированные и разрушенные микроворсинки.

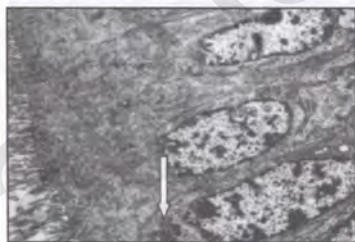


Рисунок 8.10.

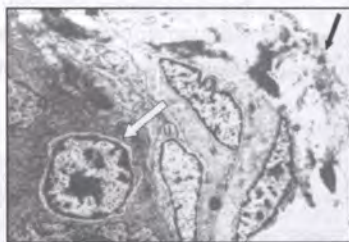


Рисунок 8.11.

**Рисунок 8.10.** Ультраструктура слизистой оболочки ампулярного отдела маточной трубы, удаленной в результате трубной беременности у больной хламидиозом. Единичные тельца хламидий в апикальной части эпителиоцита. Начало формирования включения путем слияния отдельных фагосом (стрелка). Увеличение  $\times 10\ 000$ .

**Рисунок 8.11.** Ультраструктура слизистой оболочки ампулярного отдела маточной трубы, удаленной в связи с трубной беременностью у больной хламидиозом. Лимфоцит в базальной части эпителия (белая стрелка), отек и разрушение подслизистого слоя (черная стрелка). Увеличение  $\times 5\ 000$ .

Приведенные данные микроморфологических исследований показывают, что при хроническом течении урогенитального хламидиоза у молодых женщин эпителиальные клетки слизистой оболочки маточных труб подвергаются значительным дистрофическим и деструктивным повреждениям, что приводит к существенным нарушениям их функции. Увеличение возраста больных (до 30 лет и более) и продолжительности болезни (до 10 лет и более) вызывают более глубокие и распространенные патологические изменения слизистой оболочки маточных труб. Эпителий слизистой характеризуется наличием клеток заметно меньших размеров, чем в молодом возрасте. Эпителиоциты нередко имеют кубическую или полигональную форму с неровными и бугристыми контурами апикальной поверхности. Реснички укорочены, часто фрагментированы. Эпителий слизистой характеризуется выраженной гетерогенностью клеточных элементов. Определяются светлые или темные эпителиоциты. Светлые эпителиоциты характеризуются увеличенными размерами, имеют несколько округлую форму, набухшие. Цитоплазма этих клеток просветлена и содержит относительно небольшое количество элементов эргастоплазмы. Протяженные каналцы гранулярной эндоплазматической сети неравномерно расширены, митохондрии несколько набухшие. Среди органелл определяются оптически плотные хламидии. Темные эпителиоциты характеризуются меньшими размерами, призматической формой и более плотной упаковкой элементов эргастоплазмы. В многочисленных темных, поверхностно расположенных, эпителиоцитах определяются группы плотные элементарные тельца хламидий. Темные эпителиоциты часто повреждены, с элементами апоптоза, вследствие чего некоторые хламидии выявляются во внеклеточном пространстве.

На поперечных срезах эпителиального пласта четко прослеживается гетерогенность структуры ядер клеток как по размерам, так и по форме контура нуклеотеки, хотя характер соотношения эухроматина и гетерохроматина в целом относительно однороден. Наиболее отчетливо прослеживаются образования многочисленных, различной величины инвагинатов ядерной оболочки, иногда в виде протяженных каналов (рис. 8.13).

Длительное существование хламидийной инфекции ведет, с одной стороны, к существенному изменению всех структурных компонентов маточной трубы, а с другой стороны –

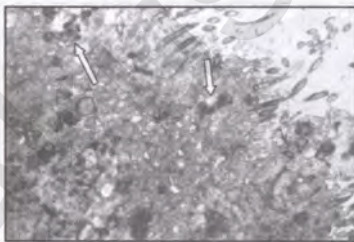


Рисунок 8.12.

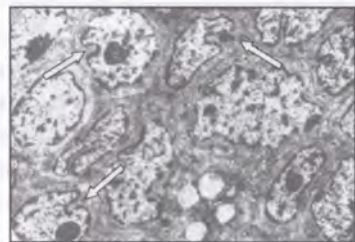


Рисунок 8.13.

**Рисунок 8.12.** Ультраструктура слизистой оболочки маточной трубы больной хламидиозом. В апикальной зоне цитоплазмы эпителиоцитов выявляются мелкие одиночные включения хламидий, в которых видны тельца на различных стадиях развития (стрелки). Увеличение  $\times 5\ 000$ .

**Рисунок 8.13.** Ультраструктура эпителиоцитов слизистой оболочки маточной трубы больной хламидиозом. Полиморфность ядер и образование многочисленных инвагинаций ядерной оболочки в эпителиальных клетках. В некоторых клетках к кариотеке со стороны цитоплазмы прилежат небольшие включения хламидий (стрелки). Увеличение  $\times 4\ 000$ .



к определенному качественному изменению проявлений самого патологического процесса. Нами установлено, что в условиях хронически протекающего урогенитального хламидиоза в слизистой оболочке маточных труб у женщин 30 лет и старше определяются эпителиальные клетки с выраженными изменениями ультраструктуры ресничек (неравномерность по толщине, длине и внутренней структуре), цитолеммы на апикальной поверхности с образованием бугристости, выпячиваний и плазмолеммальных пузырей, наблюдаются явления апоптоза. В апикальной зоне цитоплазмы на различных стадиях развития часто обнаруживаются одиночные тельца хламидий и их группы. В некоторых участках слизистой эпителия прослеживается переход элементарных телец через цитолемму в просвет маточной трубы между ресничками. В цитоплазме эпителиоцитов также наблюдаются определенные структурные изменения. Определяется заметная дезориентация канальцев эндоплазматической сети, выявляются набухшие митохондрии, локальные участки деструкции и лизиса элементов эргастоплазмы. Существенно изменяется форма ядер, а ядрышко чаще располагается вблизи ядерной оболочки. Ядерная оболочка образует многочисленные мелкие и глубокие инвагинаты.

В целом, в эпителиальном слое обнаруживаются клетки, находящиеся в переходном состоянии от дистрофических изменений к некротическим. В некоторых препаратах стенки маточной трубы определяются зоны десквамации эпителиоцитов и изъязвления. Выявляются локальные участки разрыхления и повреждения базальной мембраны, по обе стороны которой расположены во внеклеточном пространстве ЭТ хламидий. В области изъязвлений определяются макрофаги, свободно лежащие деформированные эритроциты и другие клеточные элементы лимфо-моноцитарного ряда. На границе базального отдела эпителиального пласта в подслизистой оболочке среди клеточных элементов обнаруживаются лимфоциты округлой формы с узким ободком просветленной цитоплазмы. Некоторые макрофаги содержат в цитоплазме фагоцитированные хламидийные тельца. Вокруг отдельных дистрофически измененных и разрушенных фибробластов расположены мощные пучки коллагеновых фибрилл. В межклеточном пространстве определяются локальные участки лизиса коллагеновых волокон, в которых выявляются отдельные тельца хламидий округлой формы и фрагменты разрушенных соединительнотканых клеток. Наблюдается умеренно выраженная инфильтрация липидными включениями некоторых клеток базального слоя эпителия. В отдельных местах мышечной оболочки ампулярного отдела маточной трубы в цитоплазме разрушенных клеток образуются крупные скопления многочисленных липидных капель (рис. 8.14).



Рисунок 8.14.

**Рисунок 8.14.** Ультраструктура подслизистого слоя ампулярного отдела маточной трубы больной хламидиозом. Липидные включения в цитоплазме поврежденной клетки (стрелки). Увеличение  $\times 5\ 000$ .



Вследствие разрушения клеток некоторые липидные капли, а также лизосомоподобные структуры обнаруживаются в межклеточном пространстве. Возможно, лизосомы и вызывают лизис коллагеновых волокон межклеточного вещества мышечной оболочки. Необходимо отметить, что многие разрушенные клетки окружены мощными пучками коллагеновых фибрилл. Стенка кровеносных сосудов мышечного слоя характеризуется выраженным изменением структуры эндотелия. Маргинальные участки цитоплазмы эндотелиоцитов истончены, а на их люминальной поверхности определяются удлинённые микроворсинчатые выпячивания.

Базальная мембрана характеризуется неравномерной толщиной, выявляются участки ее разрыхления и фрагментации. Окружающие микрососуд адвентициальные клетки, нередко находятся в состоянии некробиоза. В таких клетках обнаруживается пикнотично изменённое ядро с небольшим количеством маргинально расположенных глыбок гетерохроматина. Эухроматин не определяется. В светлой цитоплазме выявляются небольшое количество органелл, фрагментированные элементы эндоплазматической сети, утолщённая наружная клеточная мембрана. Утолщение плазмалеммы обусловлено разрушением цитоскелета и адгезией к внутренней поверхности мембраны филаментов цитоскелета.

В мышечной оболочке определяются клеточные элементы с морфологическими признаками дистрофических и деструктивных повреждений. Границы клеток определяются с трудом, так как маскируются разнонаправленными пучками коллагеновых волокон. Среди деструктивно изменённых клеток обнаруживаются отдельные отростки и фрагменты фибробластов. Коллагеновые пучки неравномерной толщины часто фрагментированы и гомогенизированы. Ядра в клетках имеют небольшие размеры и пикнотично изменены. Вследствие некроза клеточных элементов, в мышечной оболочке, среди пучков коллагеновых волокон, выявляются органеллы разрушенных клеток, элементы клеточного детрита. В отдельных участках ткани мышечной оболочки больных урогенитальным хламидиозом обнаруживаются обширные поля межклеточного отека, темные атрофированные клетки, микрососуды, в просвете которых определяются эритроциты в состоянии гемолиза. Эндотелиоциты капилляров умеренно обезвожены, а маргинальные участки их цитоплазмы истончены. Изредка в разрушенных участках мышечной оболочки маточных труб выявляются свободно лежащие эритроциты, что свидетельствует о повреждении стенки некоторых гемокапилляров.

На основании вышеизложенного следует, что при хроническом течении мочевого хламидиоза в маточных трубах определяются выраженные дистрофические и деструктивные изменения, необратимые повреждения клеток и развитие склероза ткани мышечной оболочки. Все эти патоморфологические изменения существенно нарушают нормальное функционирование маточных труб при хроническом течении урогенитального хламидиоза. В мышечной оболочке маточных труб больных определяется выраженная деструкция клеточных элементов. При этом наблюдается дегидратация цитоплазмы, пикноз ядер, деформация клеток, явление апоптоза.

Существенные структурные изменения определяются в микрогемоциркуляторном русле мышечной оболочки. Многие сосуды находятся в спазмированном состоянии. Довольно часто взбухающие эндотелиоциты почти полностью перекрывают просвет сосудов. Ядра эндотелиоцитов имеют сложную конфигурацию, и их ядерная оболочка образует глубокие инвагинаты. Определяются необратимо поврежденные капилляры и свободно лежащие вне сосудистого русла деформированные эритроциты.

Патоморфологические изменения слизистой и мышечной оболочек маточной трубы не только обуславливают поддержание хронического воспалительного процесса с нарастанием



склеротических изменений, но и почти полностью исключают возможность репродуктивной функции, т.к. необратимо повреждают все те структурные компоненты маточной трубы, которые необходимы для осуществления оплодотворения и последующего перемещения оплодотворенной яйцеклетки в полость матки.

Неравномерные по протяженности и степени выраженности изменения определяются в межмышечной соединительной ткани. В отдельных местах среди хаотично распределенных пучков коллагеновых волокон выявляются относительно небольшие поля из деструктивно измененного межклеточного матрикса и некротично измененные клеточные элементы. В межклеточном пространстве выявлялись макрофагоподобные клетки, содержащие элементарные тельца хламидий. Обнаруженные очаги деструкции с морфологическими признаками развивающегося воспалительного процесса располагались, преимущественно, по краю массивных полей, состоящих из мощных пучков коллагеновых волокон. Между ними определялись фиброциты с узкими участками цитоплазмы вокруг оптически темных ядер, ядерная оболочка которых образует различной формы каналоподобные инвагинаты (рис. 8.15).

Существенные изменения обнаруживаются в микроциркуляторном русле стенки маточных труб. За счет образования различной величины бугристостей и тонких выпячиваний в просвете сосудов эндотелиоциты имеют выраженную неравномерность люминальной поверхности. Видимые изменения выявляются и на базальной поверхности эндотелиальных клеток, и в самой базальной мембране. В цитоплазме эндотелиоцитов выявляются многочисленные вакуолярные образования.

В отдельных некротически измененных клетках лимфо-моноцитарного ряда наблюдаются пикноз ядер, разрушение маргинальных участков цитоплазмы, и как следствие, выпадение телец хламидий в просвет сосудов (рис. 8.16).

Обнаружение хламидий в моноцитах крови и в просвете сосудов микрогемоциркуляторного русла демонстрирует механизм гематогенного распространения инфекции во внутренних половых органах. В просвете некоторых сосудов обнаруживаются скопления тромбоцитов, формируются тромбоцитарные тромбы, которые часто приклеиваются к люминальной поверхности эндотелиоцитов. Кроме того, в отдельных артериолах наблюдаются закупорка просвета сосудов агрегированными эритроцитами и гемолиз эритроцитов. Как правило, в периваскулярном пространстве даже мелких сосудов обнаруживаются мощные пучки коллагеновых волокон.

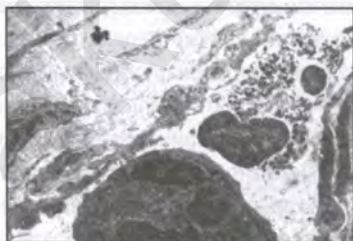


Рисунок 8.15.



Рисунок 8.16.

**Рисунок 8.15.** Ультраструктура мышечной оболочки маточной трубы больной хламидиозом. Участок склероза межмышечной соединительной ткани с единичными фиброцитами. Увеличение  $\times 5\ 000$ .

**Рисунок 8.16.** Ультраструктура мышечной оболочки маточной трубы больной хламидиозом. Появление в цитоплазме клеток крови и в просвете микрососудов элементарных телец хламидий (стрелки). Увеличение  $\times 10\ 000$ .



Выраженные дистрофические и деструктивные изменения присущи всем компонентам сосудистой стенки (эндотелиоцитам, мышечной оболочке, периваскулярной области), а также клеткам крови. Одновременно определяются склеротические изменения в периваскулярной области. Наряду с этим определяется нарушение микроциркуляторного кровообращения, обусловленное формированием тромбов и стазов, выявляются моноциты, в цитоплазме которых обнаруживаются хламидии.

Таким образом, результаты проведенных патоморфологических исследований показывают, что возбудитель хламидиоза локализуется в цитоплазме клеток эпителия, вызывает лизис реснитчатых эпителиоцитов, которые в конечном итоге подвергаются десквамации в полость маточной трубы. Хламидии вызывают в эпителиоцитах развитие дистрофических изменений. При этом определяются нарушения структуры ресничек и зоны разрежения и лизиса элементов эргастоплазмы клеток. Ядерная оболочка образует многочисленные мелкие и глубокие инвагинаты. Инвагинаты ядерной мембраны могут быть морфологическим проявлением усиления активности синтеза РНК. Их биологический смысл состоит в том, что увеличивается площадь мембраны, через которую происходит транспорт макромолекул между ядром и цитоплазмой. В некоторых клетках к кариотеке со стороны цитоплазмы прилежат небольшие включения хламидий. В ядрах отдельных клеток определяются светлые участки, окаймленные глыбками гетерохроматина.

Природа этих изменений ядра эпителиоцитов при хронической хламидийной инфекции неизвестна и их связь с хроническим хламидиозом нуждается в подтверждениях при проведении специальных исследований. Возможно, это есть морфологическое проявление влияния хламидий на клеточный цикл, регуляцию апоптоза и метаплазию эпителия, которое было показано в ряде работ.

В базальном слое эпителия, в подслизистом слое клеток выявляются лимфоциты, изредка тучные клетки. В мышечном слое наблюдается разрушение, некроз и некробиоз клеточных элементов, в частности, адвентиции микрососудов, что индуцирует развитие коллагеногенеза с включением в воспалительный процесс клеток иммунной системы.

Дистрофические изменения обнаруживаются в стенке сосудов микроциркуляторного русла мышечного слоя маточной трубы. Изменение маточных труб у женщин, больных урогенитальным хламидиозом, а также характер возникающего при этом патологического процесса позволил предположить, что «неагрессивные» качества хламидий и их преимущественная внутриклеточная локализация обуславливают хронический вялотекущий воспалительный процесс, ведущий к изменению всех компонентов стенки маточных труб и формированию структурных основ трубного бесплодия.

Нами установлено, что у женщин с малыми сроками заболевания (которое субъективно протекало без симптомов и выражалось только в проявлении бесплодия), обнаруживались выраженные изменения эпителия слизистой с нарушением структуры реснитчатого аппарата и организации мембранных структур цитоплазмы, с изменением структуры ядер и формированием своеобразных инвагинатов ядерной оболочки. Отражением воспалительного процесса являлось обнаружение между эпителиоцитами лимфоцитов с активной ультраструктурой цитоплазмы. Такого же рода изменения определялись в фибробластах подслизистой и миоцитах мышечной оболочки с выраженными изменениями структуры эндотелиоцитов капилляров микроциркуляторного русла.

Увеличение срока заболевания приводит к появлению разнообразных деструктивных форм эпителиоцитов, вплоть до полной десквамации эпителия и формирования изъязвлений. Одновременно такие же изменения клеток с формированием распространенных полей склероза обнаруживались в подслизистой и мышечной оболочке, причем отчетливо прослеживался периваскулярный склероз с изменением структуры эндотелиоцитов. Во всех случаях весьма



скудно были представлены клеточные компоненты воспалительного процесса в виде редко обнаруживаемых межэпителиальных лимфоцитов, периваскулярных лимфоцитов и макрофагов.

Обнаружение хламидий в цитоплазме клеток крови и в просвете сосудов микрогемоциркуляторного русла показывает механизм гематогенного распространения инфекции в половых органах. Поглощенные макрофагами и другими клетками крови, способными к фагоцитозу, хламидии могут быть «доставлены» в самые отдаленные участки полового тракта.

Резюмируя данные ультраструктурной патологии стенки маточных труб у больных урогенитальным хламидиозом можно сказать, что характер выявленных морфологических изменений сильно затрудняет, а то и вовсе исключает, возможность осуществления репродуктивной функции.

### 8.3. УЛЬТРАСТРУКТУРА СПЕРМАТОЗООНОВ У БОЛЬНЫХ ХЛАМИДИОЗОМ

В эякуляте больных мочеполовым хламидиозом, по сравнению с контрольной группой, существенно возрастает количество патологических форм половых клеток. Определяются сперматозооны с деформированной головкой, на апикальной поверхности которой часто отсутствует акросома. Некоторые половые клетки имеют умеренно набухшую шейку увеличенных размеров и укороченный хвостик. В таких сперматозоонах часто отсутствует акросома либо определяются ее фрагментированные участки. Ядерная оболочка головки патологически измененных сперматозоонов имеет многочисленные повреждения. На поверхности мембраны промежуточной части тела некоторых сперматозоонов, полученных от больных урогенитальным хламидиозом, также выявляются ЭТ. Как нормальные, так и патологические формы сперматозоонов больных несут на себе элементарные тельца хламидий.

В эякуляте больных мочеполовым хламидиозом определяются различные клетки, в т.ч. эпителиоциты слизистых оболочек мочеполовой системы. Нами установлено, что в цитоплазме десквамированных эпителиальных клеток обнаруживаются включения хламидий, которые по своим морфологическим признакам можно отнести к ЭТ, РТ и ПТ (рис. 8.17).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что в эякуляте больных, помимо сперматозоонов, носителями хламидийной инфекции являются также десквамированные эпителиоциты мочеполовых путей, содержащие хламидии зрелой и вегетативной формы. Следовательно, при эякуляции в половые пути женщин попадают не только инфицированные сперматозооны, но и многочисленные десквамированные эпителиоциты слизистой оболочки, содержащие хламидии.

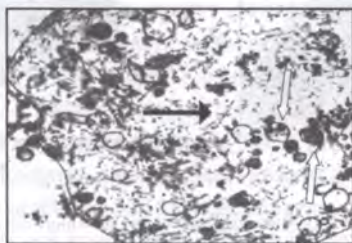


Рисунок 8.17.

**Рисунок 8.17.** Ультраструктура десквамированного эпителиоцита половых путей больного урогенитальным хламидиозом. В цитоплазме клетки определяются небольшие включения, содержащие ЭТ, РТ и ПТ хламидий (белые стрелки), а также фрагменты цитоскелета (черная стрелка). Увеличение  $\times 15\,000$ .

Было проведено электронномикроскопическое исследование взаимодействия сперматозоонов человека и *C. trachomatis* в эксперименте (Мавров, 1995). Через 60 минут после начала инкубации суспензии сперматозоонов человека со взвесью элементарных телец хламидий, при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ , в осадке половых клеток определяются сперматозооны с морфологическими проявлениями взаимодействия с хламидиями.

Проведенные электронномикроскопические исследования позволили установить, что адгезия микробных телец к поверхности сперматозоонов человека обнаруживается преимущественно в области головки и промежуточной части. На боковой поверхности головки некоторых половых клеток определяется тесный контакт промежуточных телец хламидий с наружной поверхностью акросомы. В зоне контакта выявляется небольшое выпячивание со стороны мембраны акросомы и адгезия к ней локального участка клеточной стенки микроорганизма (рис. 8.18). Межклеточные взаимодействия «сперматозооны плюс хламидии» инициируют появление ультраструктурных повреждений в виде фрагментации, гомогенизации, разрыхления и умеренного набухания акросомы половых клеток. Однако в условиях проведенного эксперимента нами не обнаружены морфологические признаки, свидетельствующие о проникновении микроорганизмов в ядродержащий компонент сперматозоонов человека. Определяется лишь тесный контакт и прикрепление единичных хламидий к боковой поверхности головки половых клеток.

Более значительные изменения ультраструктуры обнаруживаются в промежуточной части шейки сперматозоонов. Определяется видимое набухание цитоплазмы промежуточной части половых клеток, выявляются локальные участки разрыва цитолеммы. Со стороны цитоплазмы в непосредственной близости к плазмалемме, в промежуточной части шейки сперматозоонов обнаруживаются оптически плотные, округлой формы микробные тельца, которые по морфологическим признакам можно отнести к тельцам хламидий (рис. 8.19).

Изучение электронномикроскопических препаратов позволило заключить, что тельца хламидий могут частично проникать в цитоплазму промежуточной части сперматозоонов не путем эндоцитоза, а вероятно, вследствие перемещения через локальные участки поврежденной плазмалеммы. Проведенное исследование показало, что ультраструктурные особенности организации сперматозоонов допускают возможность прикрепления хламидий в области

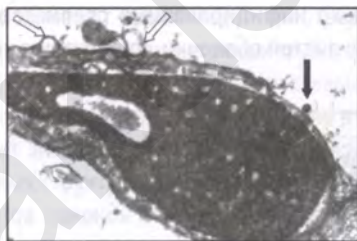


Рисунок 8.18.

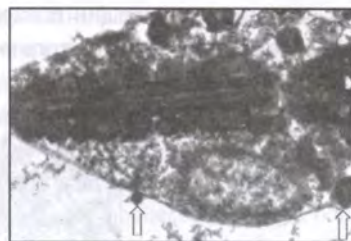


Рисунок 8.19.

**Рисунок 8.18.** Ультраструктура сперматозоонов человека через 60 минут после начала их инкубации с микротельцами хламидий. Адгезия промежуточных телец к поверхности набухшей акросомы (черная стрелка) и контакт элементарного тельца с головкой сперматозоона человека (белые стрелки). Увеличение  $\times 25\ 000$ .

**Рисунок 8.19.** Ультраструктура сперматозоонов человека через 60 минут после начала их инкубации с микротельцами хламидий. Контакт элементарных телец хламидий с набухшей промежуточной частью сперматозоона (стрелки). Увеличение  $\times 25\ 000$ .



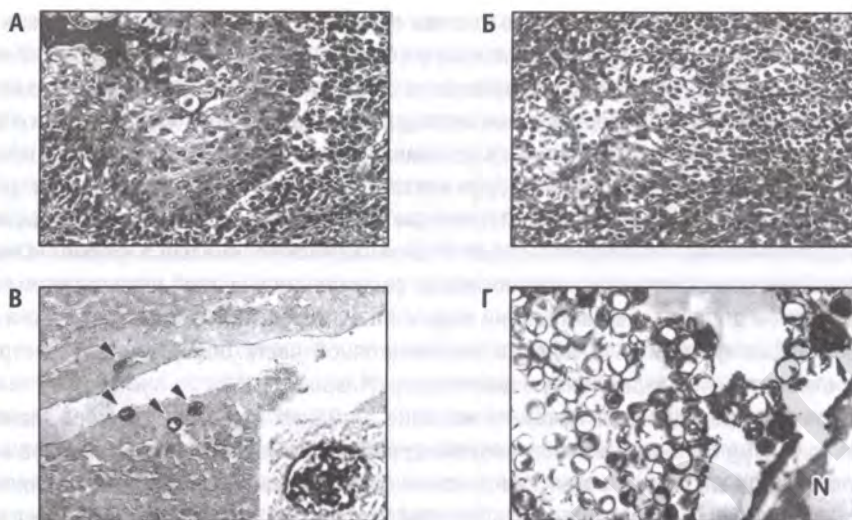
головки и шейки половых клеток, где менее плотная организация цитоплазмы может быть возможным местом частичной пенетрации хламидий в области поврежденной мембраны. Имеются данные, что возможна адгезия микротеллец к поверхности хвостика сперматозоонов (Wolner-Hanssen, Mardh, 1984). Проведенное исследование возможного межклеточного взаимодействия хламидий со сперматозоонами в условиях *in vitro* показало, что хламидии прикрепляются к поверхности сперматозоонов в двух местах: в области головки и в области шейки. В области головки прикрепление хламидий приводит к изменению структуры акросомы, ее набуханию и фрагментации, что свидетельствует об активации акросомальных ферментативных систем. Одновременно отмечается неравномерное расширение участков нуклеоплазмы в головке, что может быть следствием активации эндогенных ферментных процессов и вести к изменению состояния хроматина. В области промежуточной части определяется пенетрация хламидий в относительно разрыхленную цитоплазму (Мавров, 1995).

Таким образом, исследования показали наличие активных взаимоотношений хламидий с мужскими половыми органами, их частичное внедрение в цитоплазму сперматозоонов и возможность переноса с эякулятом в женские половые органы. В связи с этим представляли интерес исследования эякулята мужчин, больных урогенитальным хламидиозом. Следует отметить значительное увеличение в составе эякулята сперматозоонов с различными формами патологии структурной организации головки, шейки и хвостика. То, что эти изменения являются следствием прямого действия хламидий, подтверждается обнаружением элементарных телец, контактирующих с нуклеоплазмой головки и цитоплазмой шейки половых клеток. В составе эякулята обнаруживались эпителиоциты слизистой оболочки с выраженными дистрофическими и деструктивными изменениями цитоплазмы, в которой определялись включения хламидий различной величины и с различной внутренней структурой. Эякулят больных хламидиозом обеспечивает перенос хламидий не только в семенной плазме, но и на поверхности сперматозоонов, и в десквамированных эпителиоцитах. Это предохраняет возбудителя от действия факторов защиты макроорганизма и повышает вероятность заражения внутренних половых органов женщин при половых контактах.

#### 8.4. ГИСТОПАТОЛОГИЯ ХЛАМИДИЙНОГО ЭПИДИДИМИТА

Воспаление придатка яичка хламидийной этиологии может возникнуть в результате распространения *C. trachomatis* из простатической части уретры, предстательной железы или семенных пузырьков. Также может иметь место гематогенный путь попадания инфекции в *Epididimus*. До того как была установлена роль хламидий в возникновении воспаления придатка яичка, многие такие эпидидимиты считались «идиопатическими» (Mitttemeyer, 1966). Ряд авторов установили метаплазию эпителия, что в дальнейшем было описано как характеристики хламидийной инфекции (Mostofi, Davis, 1990).

Хламидийное поражение придатка яичка характеризуется острым или подострым воспалением и имеет гистологические особенности. Это, как правило, неструктурный пролиферативный эпидидимит с перидуктальной инфильтрацией лимфоцитами, плазматическими клетками и гистиоцитами. Нейтрофилы (полиморфноядерные лейкоциты) концентрируются в области просвета протоков. Весьма характерна реактивная эпителиальная пролиферация. Интраэпителиальная инфильтрация клетками лимфоидного ряда и нейтрофилами обнаруживается во всех исследованных образцах хламидийного эпидидимита (Hori, Tsutsumi, 1995). Часто отмечается



**Рисунок 8.20.** Гистопатология хламидийного эпидидимита (Hori and Tsutsumi, 1995).

- А.** Проллиферативный эпидидимит. Выраженная воспалительная инфильтрация вокруг протоков и в эпителиальной выстилке. Местами наблюдается пролиферация и метаплазия эпителия. Нейтрофилы находятся в просвете протока. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200$ .
- Б.** Проллиферативный эпидидимит. Формирование лимфоэпителиального комплекса. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение  $\times 200$ .
- В.** Включения хламидий в цитоплазме эпителиоцитов придатка яичка (стрелки). Непрямой иммунопероксидазный метод. Обработка двумя мышинными моноклональными антителами A21.65 (против родоспецифического гликолипида хламидий) и K14.67 (против главного белка наружной мембраны МОМР). Увеличение  $\times 300$ . Вставка: включение содержит гранулированные структуры, реагирующие с моноклональными антителами. Увеличение  $\times 1\ 500$ .
- Г.** Иммуноэлектронная микроскопия хламидийного включения в цитоплазме эпителиальной клетки. Перед запайкой препарат обработан моноклональными антителами против хламидий (см. В). Включение заполнено элементарными тельцами, размером приблизительно 300 нм. Видна клеточная стенка хламидий. Имеются также большие по размерам ретикулярные тельца (стрелки). N – ядро эпителиоцита. Длина отрезка = 500 нм. Увеличение  $\times 11\ 000$ .

метаплазия эпителия. На некоторых участках в результате интенсивной интраэпителиальной инфильтрации лимфоцитами и активной пролиферации эпителия формируются фолликулоподобные лимфоэпидермальные комплексы (рис. 8.20).

Внутри этих комплексов могут образовываться микроабсцессы, размером до 3 мм. Ксантогранулемы, как правило, отсутствуют. Иммуногистологическим методом могут быть выявлены хламидии, концентрирующиеся в больших цитоплазматических включениях в эпителиальных клетках протоков. С помощью иммуноэлектронной микроскопии можно выявить типичные и атипичные формы хламидий, соответствующие различным стадиям жизненного цикла – элементарные и ретикулярные тельца, размером 300–500 нм (рис. 8.20).

Гистологически хламидийный эпидидимит отличается от эпидидимитов гонококковой и другой бактериальной этиологии (Hori, Tsutsumi, 1995). Хламидийный эпидидимит характеризуется минимальной выраженностью деструктивных процессов и наличием значительной инфильтрации внутри эпителия протоков и вокруг протоков. При гонококковом и бактериальном



эпидидимите (например, вызванном патогенными штаммами *Escherichia coli*) деструктивные процессы более выражены и в больших количествах формируются микроабсцессы. На стадии разрешения для бактериальных эпидидимитов характерна ксантогранулематозная реакция.

Морфологические структуры, напоминающие включения хламидий, можно обнаружить при большом увеличении в клетках эпителия придатка при традиционных методах окраски гистологических препаратов. Для безусловного подтверждения хламидийной этиологии эпидидимита желательно подтвердить нахождение хламидий в ткани придатка яичка гистохимическим (антиген) или молекулярнобиологическим методом (ДНК и/или РНК). Но поскольку хламидийный эпидидимит имеет характерные гистологические признаки, то можно с достаточной вероятностью подтвердить морфологический диагноз у больного при наличии у него маркеров уrogenитальной хламидийной инфекции (обнаружение хламидий в уретре, секрете простаты, эякуляте, наличие антител в сыворотке крови, а также при диагностике хламидиоза у полового партнера).

### 8.5. ВЕНЕРИЧЕСКАЯ ЛИМФОГРАНУЛЕМА

Гистологическая картина при венерической лимфогранулеме зависит от стадии заболевания и степени выраженности клинических проявлений. Первичное поражение, которое существует очень непродолжительное время – внутриэпидермальный, или субэпидермальный, пузырь. Затем быстро нарастает инфильтрация. Первичные поражения кожи характеризуются небольшой плотностью в шиповидном слое, окруженной островоспалительной клеточной инфильтрацией из лимфоцитов, полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов. Клеточный инфильтрат вначале скапливается в поверхностных слоях кожи и состоит главным образом из макрофагов и лимфоцитов с примесью полиморфноядерных лейкоцитов. В дальнейшем, по мере формирования эрозии или язвы, в центре инфильтрата формируются некроз и массивные скопления полиморфноядерных лейкоцитов и мононуклеаров. По периферии инфильтрата имеется зона эпителиоидных клеток и гигантских многоядерных клеток, которые скапливаются в виде очагов и формируют инфекционную гранулему (Бабаянц, 1984).

Весьма характерные изменения наблюдаются в лимфатических узлах. Они имеют насыщенно-красный цвет с сероватым оттенком, отечны и спаяны между собой. Определяется значительное утолщение их капсулы. На макроскопических препаратах видно множество мелких абсцессов или очажков некроза с типичным лучеобразным очертанием – «звездчатые» абсцессы, окруженные «палисадообразно» расположенными эпителиоидными клетками. Их окружает зона воспалительного инфильтрата с большим количеством плазматических клеток. Аналогичные микроабсцессы обнаруживаются и в очагах поражения при различных формах генитоаноректального синдрома. При локализации вблизи поверхности лимфатического узла абсцессы вскрываются в окружающую ткань и обуславливают развитие фистул, а глубже расположенные участки некроза ограничены пролиферирующей соединительной тканью. Гистопатология пораженных лимфатических узлов при венерической лимфогранулеме соответствует острому или хроническому лимфадениту с разрушением нормальной структуры узлов и замещением фиброзной соединительной тканью. Типичны также множественные мелкофокусные очаги некроза со скоплением полиморфноядерных лейкоцитов и скудного количества лимфоцитарного ряда и эритроцитов. Очажки некроза окружены зоной грануляционной ткани, состоящей в основном из лимфоцитов, фибробластов и частично эпителиальных и гигантских клеток Пирогова-Ланганса.

Значительные изменения претерпевают ткани вокруг пораженных лимфатических узлов. Отмечаются выраженная гиалинизация сосудов, гиперплазия эндотелия, вплоть до полной их облитерации, и множественные тромбы. Кроме того, отмечается выраженный периваскулярный инфильтрат, состоящий преимущественно из крупных клеток. В случаях же распространения патологического процесса на другие ткани, в частности при формировании аногениторектального синдрома, наиболее характерным изменением является развитие грануляционной ткани с инфильтрацией преимущественно полиморфноядерными лейкоцитами, макрофагами и плазматическими клетками (Майсюк, 1959, 1962; Шапошников, 1980; Бабаянц, 1984).

### 8.6. ОРНИТОЗ

При патологоанатомическом исследовании инфекции, вызванной *Chlamydoxyla psittaci*, обнаруживают признаки катарального трахеобронхита и гиперплазию перибронхиальных лимфатических узлов, в легких – участки инфильтрации, интерстициальные изменения и ателектазы. Пневмония, как правило, односторонняя, нижнедолевая и носит интерстициальный характер. Морфологически выявляют экссудацию жидкости в альвеолы. В экссудате содержатся мононуклеары и клетки слущенного эпителия. В альвеолярной и интерстициальной ткани обнаруживают значительное количество мононуклеарных клеток (рис. 8.21). При присоединении вторичной инфекции развиваются гнойный трахеобронхит и крупноочаговая, или лобарная, пневмония. В других внутренних органах наблюдаются полнокровие, отек, дистрофические изменения, пролиферация клеток, иногда встречаются фокальные некрозы.

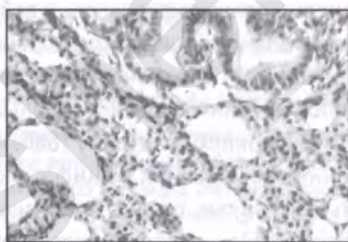


Рисунок 8.21.

**Рисунок 8.21.** Интерстициальная пневмония, вызванная *Chlamydoxyla psittaci*. В альвеолярной и интерстициальной ткани значительное количество мононуклеарных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 220$ .

### 8.7. ТРАХОМА

В основе патологической анатомии трахомы лежит хроническое пролиферативное воспаление соединительной оболочки век и глазного яблока с размножением клеток, воспалительной гипертрофией ткани и постепенным рубцеванием. Характерно сочетание признаков прогрессивного развития (инфильтрации, отека, гиперемии) и перерождения, сопровождающегося пролиферацией соединительной ткани. Клинически видное утолщение конъюнктивы связано с отеком и инфильтрацией ткани плазматическими и эпителиоидными клетками, лимфоцитами, гистиоцитами, эозинофилами, лимфобластами. (Золотарева, 1964).



Фолликул состоит из скопления лимфоцитов. В центральной части имеются эпителиоидные клетки, гистиоциты, лимфобласты. Многие клетки находятся в состоянии митоза. В разные сроки развития фолликулов и инфильтрации в них наступают явления дегенерации, клеточного распада, сопровождающиеся разрыхлением ткани, появлением фибробластов, ростом соединительной ткани. Фолликулы не являются специфическими элементами только для трахомы, их строение и склонность к увеличению, слиянию может быть как при трахоме, так и при других фолликулярных конъюнктивитах (паратрахома).

Покровский (1960) отмечал сходство клеточного состава инфильтрации при трахоме с воспалительными изменениями лимфоидной ткани других слизистых оболочек. Образование инфильтрации происходит за счет эмиграции элементов из сосудов и пролиферации клеток самой конъюнктивы (Зайцева, 1976). В активной фазе отмечается большое количество митозов, появление юных недифференцированных форм. В особо тяжелых случаях лимфобласты и плазматические клетки встречаются в большом количестве, отмечаются опухолевидные разрастания конъюнктивы — плазмы (Покровский, 1960; Левкоева, 1966). В исходе плазмноклеточной инфильтрации отмечается гомогенизация соединительнотканых волокон в стенке сосудов, распад клеточных элементов и последующее разрастание соединительной ткани с образованием рубца. Источником развития инфильтрации и фибробластов являются стенки сосудов и элементы аденоидной ткани конъюнктивы. В активном периоде трахомы выражена реакция мелких и крупных сосудов с пролиферацией эндотелиальных и периваскулярных клеток, дифференцировка ретикулоэндотелия в сторону лимфопозза с выраженной бласттрансформацией. Появляется значительное количество новообразованных сосудов.

Степень выраженности и распространенности описанных изменений варьирует в больших пределах, что осложняет гистологическую диагностику. Поэтому гистологическая картина начальных и слабо выраженных форм трахомы (несмотря на достаточно характерный патологический субстрат) не дает материала, который бы позволил с определенностью дифференцировать трахому в этой стадии от фолликулярного катара или конъюнктивита с включениями. При паратрахоме имеется ограниченный характер инфильтративного процесса, меньшая выраженность некробиотических изменений клеток, активное новообразование лимфатических сосудов с пролиферацией эндотелия и формированием очажков ретикулярных клеток и лимфоцитарных узелков (Кудояров, 1970).

Маслова (1963) изучала изменения эпителия при трахоме. На ранних стадиях болезни в эпителии обнаруживают явления пролиферации и дегенерации, с 3-4-го дня отмечают амитоз и метаплазию эпителия, превращение его из цилиндрического в плоский. Эпителий инфильтрируется сегментоядерными нейтрофилами, лимфоцитами с образованием микроабсцессов, имеет место отек, дистрофия, десквамация, появление бокаловидных клеток. В рубцовом периоде обычно наблюдается кератинизация эпителия. Эпителиальный покров становится многослойным (8-10 слоев), верхний слой состоит из плоских, плохо окрашивающихся продолговатых клеток, иногда образуется блестящая пленка — кутикулярная мембрана. В тяжелых случаях отмечается гиалиновое и амилоидное перерождение эпителия. Весьма характерным является разрастание и врастание тяжелой эпителия в аденоидный слой конъюнктивы с образованием островков — желез Иванова. Эти явления отмечаются в активном периоде в 1-2-й месяц и без лечения могут обнаруживаться годами (Маслова-Хорошилова, Анджелов, 1973).

В хрящевой соединительной ткани наряду с очаговой инфильтрацией отмечаются типичные трахоматозные фолликулы. В мейбомиевых железах отмечается кистевидное перерождение,

их выводные протоки сдавливаются или закрываются вследствие инфильтрации, пролиферации, вакуолизации и слущивания эпителия. На месте желез образуются скопления лимфоцитов, а в исходе наступает рубцевание и сморщивание хряща, который в зависимости от бывшей инфильтрации может иметь вид тонкой, искривленной пластинки или толстого, бугристого искривления. Явления хронического воспаления в области хряща приводят к сморщиванию желез и замещению их рубцовой тканью. В период регрессивных изменений наблюдается жировая дегенерация железистых клеток. Процесс гиалинизации и амилоидоза выражен на участках, где отмечалась распространенная плазмноклеточная инфильтрация. Здесь нередко находят амилоидные включения в клетках (тельца Русселя) и гиалиновые отложения (гиалиновые шары). Исходом трахоматозного процесса в хряще может быть его рубцовое сморщивание, атрофия, в других случаях размеры хряща не меняются.

В слезной железе при трахоме отмечено диффузное воспаление, сопровождающееся плазмноклеточной инфильтрацией с нередкой дегенерацией паренхимы железы. В поздних периодах наступает рубцевание с кистевидным расширением отдельных ее частей. Регрессивные изменения в хряще заметны как в инфильтрации, так и в ткани хряща, и проявляются его гиалинизацией и амилоидным перерождением.

Гистологические исследования роговицы при трахоматозном паннусе показали, что изменения в эпителии роговицы и конъюнктивы склеры идентичны. Основным является диффузная инфильтрация подэпителиальной ткани тем же клеточным составом, что и в слизистой век, и в новообразовании сосудов. Целостность боуменовой оболочки нарушается, и инфильтрация обнаруживается над и под ней. В ряде случаев в лимбе или вблизи него появляются фолликулы. Наряду с инфильтрацией, в роговице определяются дегенеративные изменения и рубцевание, захватывающие поверхностные и глубокие слои. В исходе остаются помутнения роговицы разной интенсивности. Ксероз роговицы наступает после тяжелых поражений, с патогенезом, как при ксерозе конъюнктивы. После паннуса изменяется кривизна меридианов роговицы, из-за чего развивается астигматизм или возникают более грубые нарушения ее формы в виде эктазий, кератоконуса.

Таким образом, в патологической анатомии трахомы характерными являются не отдельные гистологические компоненты (фолликул или диффузное воспаление), а совокупность анатомических изменений конъюнктивы и роговицы, сопровождающиеся поражением хряща и слезных путей (Зайцева, 1976).

## 8.8. ХЛАМИДИЙНОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЛАЦЕНТЫ

Впервые связь между абортom и хламидийной инфекцией доказал Giroud в 1956 году. Roberts с соавторами (1967) впервые выделили возбудителя энзоотического аборта овец (*Chlamydophila abortus*) из плаценты абортировавшей женщины. Между 1987 и 2002 годами описано более 20 случаев абортов, вызванных *C. abortus* (Hyde and Benirschke, 1997; Pospischil et al., 2002). Аборты происходят в 14–36 недель беременности и сопровождаются лихорадкой и общими явлениями. *C. abortus* обладает тропностью к трофобластному эпителию плаценты, где она усиленно размножается. Функции плаценты нарушаются, что приводит к гибели плода. Возбудитель также проникает в сам плод и вызывает поражение легких и печени. Гистопатология плаценты характеризуется острым виллитом (рис. 8.22).

Трофобластный эпителий буквально нафарширован хламидиями (рис. 8.23).



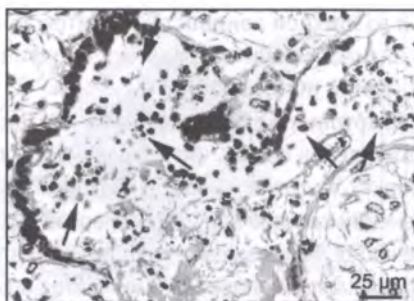


Рисунок 8.22.



Рисунок 8.23.

**Рисунок 8.22.** Поражение плаценты, вызвавшее аборт на 20-ой неделе беременности. Картина острого виллита (стрелки). Окраска по Koester и Stamp. Длина отрезка 25 мкм. (Pospischil et al., 2002.)

**Рисунок 8.23.** Поражение плаценты, вызвавшее аборт на 20-ой неделе беременности. Хламидийный антиген в цитоплазме трофобластного эпителия (стрелки), выявленный с помощью моноклональных антител иммуногистологическим методом. Длина отрезка 25 мкм. (Pospischil et al., 2002.)

Патогенез инфекции *C. abortus* у человека связан с беременностью. Аборты у женщин являются результатом первичного инфицирования при контакте с животными или в результате обострения бессимптомной персистентной инфекции (Hyde, Benirschke, 1997; Entrican et al., 2001). При беременности иммунный статус женщины существенно меняется. Поскольку плод, с точки зрения иммунологии, можно рассматривать как аллотрансплантат, то необходима иммуносупрессия и состояние иммунологической толерантности, чтобы предотвратить его отторжение. Продукция интерферона гамма в плаценте снижается и усиливается продукция Th2-регуляторных цитокинов (Mellor, Munn, 1999). При этом создаются благоприятные условия для развития внутриклеточных организмов, поскольку продукция провоспалительных цитокинов может вызвать отторжение плода (Ragupathy, R. 1997; Dealtry, 2000). Состояние Т-клеточной толерантности опосредуется дефицитом аминокислоты триптофана. Недостаток триптофана развивается в результате повышенной экспрессии клетками трофобластного эпителия фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (Kudo et al., 2000). Таким образом, в зоне фетоплацентарного контакта создаются особые благоприятные условия для хламидийной инфекции.

### 8.9. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИНФЕКЦИИ *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA* ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

*Chlamydomypha pneumoniae* является респираторным патогеном, который в последние годы связывают с атеросклерозом (Kuo et al. 1995). Возбудитель был продемонстрирован в атеросклеротических поражениях всех крупных артерий с помощью иммуногистохимии, электронной микроскопии, полимеразной цепной реакции и гибридизации *in situ* (Stille et al., 1997; Ramirez, 1996; Jackson et al., 1997; Meijer et al., 1999; Maass et al., 1997). Существуют расхождения между различными авторами в частоте выявления *C. pneumoniae* в стенке атеросклеротических сосудов, как и расхождения между разными методами в рамках одного исследования. Эти различия объясняются особенностями взятия и приготовления материала для исследования,

ингибцией полимеразной цепной реакции и различной avidностью антител, применяемых при иммуногистохимии. Было показано, что антиген может сохраняться в инфицированных клетках сосудистой стенки дольше, чем ДНК (Meijer et al., 2000).

Атеросклероз – воспалительное заболевание крупных и средних артерий, характеризующееся утолщением (*athero*) и затвердением (*sclerosis*) стенки сосуда, что в конечном итоге приводит к полной или частичной окклюзии сосуда, инфаркту, гангрене и нарушению функции органа или конечности. На воспалительный характер изменений сосудов при атеросклерозе указывали еще Von Rokitansky (1852) и Virchow (1956). Отмечается четко выраженная стадийность развития атеросклеротической бляшки с характерными для каждой стадии типами клеток и компонентами стромы. Охарактеризовано шесть типов нарушений, последовательно сменяющих друг друга (рис. 8.24, 8.25, 8.26, 8.27) (Stary et al., 1992, 1994, 1995; Meijer, 1999; Ross, 1999).

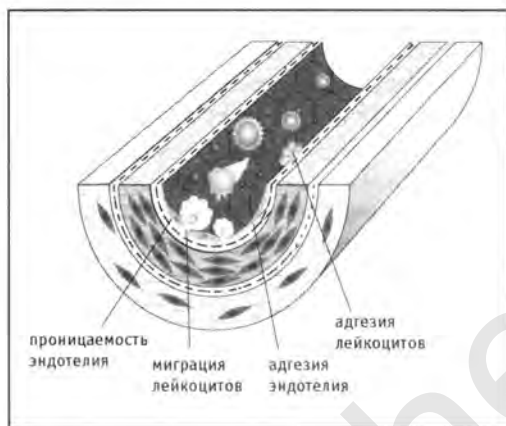


Рисунок 8.24.

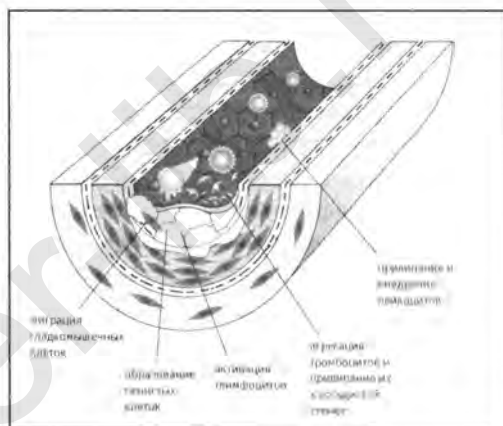


Рисунок 8.25.

**Рисунок 8.24.** Дисфункция эндотелия при атеросклерозе (Ross, 1999).

Самые ранние изменения, предшествующие формированию атеросклеротических поражений, происходят в эндотелии. Проницаемость эндотелия к липопротеидам и другим компонентам плазмы увеличивается, что опосредуется оксидом азота, простаглиндином, фактором роста тромбоцитов, ангиотензином II, эндотелином. Усиливается адгезия лейкоцитов под воздействием L-селектина, интегринов и адгезия тромбоцитов под воздействием адгезивных молекул «тромбоцит-эндотелий». Из-за регуляции E-селектина, P-селектина, межклеточных адгезивных молекул, эндотелиальных адгезивных молекул возрастают адгезивные свойства эндотелиальных клеток. Начинается миграция лейкоцитов внутрь артериальной стенки, которая опосредуется окисленными липопротеидами низкой плотности, моноцитарным хемотаксическим протеином 1, интерлейкином-8, тромбоцитарным фактором роста, макрофагальным колониестимулирующим фактором, остеопонином.

**Рисунок 8.25.** Формирование жировых полосок (прослоек) (поражение типа I-III) (Ross, 1999).

Жировые прослойки вначале состоят из нагруженных жиром моноцитов и макрофагов (пенистые клетки), а также T-лимфоцитов (поражение типа I). Затем к ним присоединяются гладкомышечные клетки, которые мигрируют под влиянием тромбоцитарного фактора роста, фактора роста фибробластов 2, трансформирующего фактора роста  $\beta$ . Активация T-лимфоцитов опосредуется фактором некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкином-2, колониестимулирующим фактором гранулоцитов-макрофагов (поражение типа II-III). Образование пенистых клеток происходит под воздействием окисленных липопротеидов низкой плотности, колониестимулирующего фактора макрофагов, фактора некроза опухолей  $\alpha$ , интерлейкина-1. Агрегация и прилипание тромбоцитов стимулируется интегринами, P-селектином, фибрином, тромбоксаном A2, тканевым фактором.

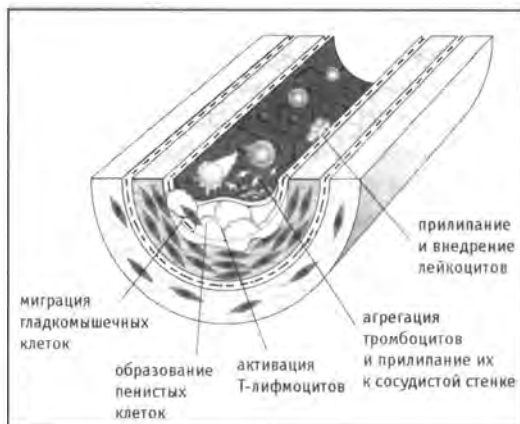


Рисунок 8.26.

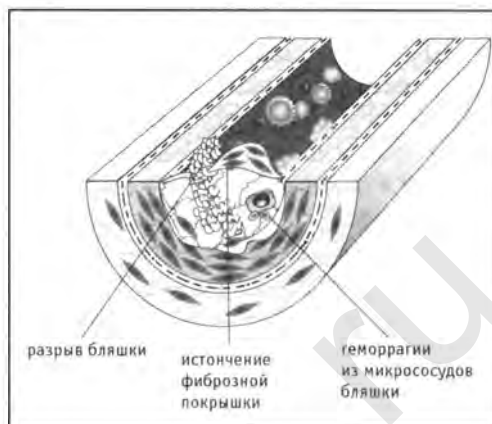


Рисунок 8.27.

**Рисунок 8.26.** Формирование атеромы и фиброатеромы с некрозом в центре (поражение типа IV-V) (Ross, 1999).

По мере того как жировые отложения прогрессируют, формируется фиброзная покрышка, которая отгораживает поражение от просвета сосуда. Этот процесс напоминает заживление раны. Фиброзная оболочка закрывает смесь лейкоцитов, липидов, тканевого детрита. В центре, как правило, формируется некротическое ядро. Поражение продолжает расти за счет адгезии и внедрения лейкоцитов. Продолжается аккумуляция макрофагов. Некротическое ядро представляет собой результат апоптоза и некроза, усиленной протеолитической активности и накопления жира. Фиброзная покрышка образуется за счет тромбоцитарного фактора роста, трансформирующего фактора роста  $\beta$ , интерлейкина-1, фактора некроза опухолей  $\alpha$ , остеопонина и ослабления деградации соединительной ткани.

**Рисунок 8.27.** Нестабильный атеросклероз – распад бляшки и окклюзия сосуда (поражение типа VI) (Ross, 1999).

Разрыв фиброзной покрышки в местах ее истончения и изъязвление бляшки быстро приводит к тромбозу. Истончение фиброзной покрышки происходит за счет продолжающегося притока и активации макрофагов, которые высвобождают металлопротеазы и другие протеолитические ферменты. Эти ферменты вызывают разрушение стромы, что ведет к геморрагиям из *vasa vasorum* и приводит к образованию тромбов и закупорке артерий.

Вначале (тип I) поражение содержит изолированные макрофаги и «пенистые» клетки (макрофаги и гладкомышечные клетки, содержащие липидные включения). Увеличение количества пенистых клеток приводит к развитию жировых полосок (прослоек) (тип II). Дальнейшее накопление липидов формирует небольшие экстрацеллюлярные скопления липидов (бляшек) (тип III). Усиленная аккумуляция липидов и разрыв пенистых клеток формируют атерому, характеризующуюся внеклеточным отложением жира и некрозом в центре (тип IV). В дальнейшем фиброз и кальцификация приводят к образованию фиброатеромы с одним или несколькими жировыми ядрами (тип V). На последней стадии атерома осложняется поверхностными дефектами, гематомами, геморрагиями, тромбозами, что приводит к окклюзии сосуда (тип VI). При атеросклерозе в патологический процесс вовлекаются эндотелиальные и гладкомышечные клетки артериальной стенки, «привлеченные» макрофаги и лимфоциты, а также адгезированные тромбоциты и дендритические клетки сосудов (Bobryshev, Lord, 1998; Libby, Hansson, 1991; Munro, Cotran, 1988; Ross, 1993, 1999; Stary et al., 1992, 1994, 1995; Meijer, 1999; Meijer et al., 2000).

Существенная роль в формировании атеросклероза отводится липидам и их метаболитам, что получило выражение в гипотезе измененных «липопротеидов низкой плотности» – ЛНП (Steinberg, Witztum, 1990). Согласно этой концепции, модифицированные ЛНП захватываются



эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками и макрофагами через особые рецепторы-«сборщики». Модификация ЛНП происходит в сосудистом русле или при прохождении через эндотелиальные клетки. Измененные ЛНП в субэндотелиальном пространстве привлекают моноциты, которые мигрируют в субэндотелиальное пространство и превращаются в зрелые макрофаги. Эти макрофаги и гладкомышечные клетки захватывают измененные ЛНП и трансформируются в пенистые клетки, которые формируют жировые отложения. Дальнейшее прогрессирование процесса опосредуется цитокинами и факторами роста, которые привлекают к месту поражения новые моноциты.

Ross и Glomset сформулировали в 1973 году другую гипотезу, которую они назвали «ответом на повреждение». Суть ее заключается в том, что эндотелиальные клетки могут повреждаться не только окисленными липопротеидами низкой плотности, но и в результате механических воздействий, гомоцистеина, иммунологических агентов, токсинов, вирусов, бактерий и других факторов. Поврежденный эндотелий адгезирует моноциты/макрофаги, а также Т-лимфоциты и липопротеиды, которые откладываются в стенке сосуда. Прилипание тромбоцитов формирует тромбы. Высвобождение цитокинов и факторов роста из вовлеченных клеток вызывает воспалительную реакцию, которая усиливает повреждение (Ross, Glomset, 1973; Ross, 1993).

Изучение атерогенеза на животных моделях привело к созданию альтернативной гипотезы «первичной иммунологической реакции», которая постулирует, что атеросклероз начинается с воспалительной реакции (Wick et al., 1995; Ross, 1999). Первичной реакцией на повреждение эндотелия является стресс (экспрессия HSP60), который приводит к аутоиммунной реакции в интиме. Под действием известных факторов риска происходит прогрессирование процесса и развитие атеросклероза. Роль иммунной системы в этом процессе ряд авторов считают ведущей (Bobryshev, Lord, 1998; Libby, Hansson, 1991; Munro, Cotran, 1988).

Еще в конце XIX века Osler (1898) предположил этиологическую связь атеросклероза и инфекционных агентов, поражающих сосудистую стенку. В 1970-х годах интерес к хроническим инфекциям, как к причинному фактору атеросклероза, усилился (Fabricant et al., 1973). В последние годы инфекционная теория атеросклероза привлекает все больше сторонников, поскольку накапливается все больше данных о связи некоторых бактерий и вирусов и атерогенеза (Neito, 1998; Gibbon, 1998). Результаты исследований предполагают связь между атеросклерозом и *Chlamyophyla pneumoniae*, цитомегаловирусом (CMV), вирусом простого герпеса (HSV), *Helicobacter pylori* и *Porphyromonas gingivalis*, которая вызывает периодонтит. Наибольшее место среди этих инфекций отводят *Chlamyophyla pneumonia* (Cook, Lip, 1996; Dariesh et al., 1997; Ellis R.W. 1997; Libby et al., 1997; Mattila et al., 1998; Mehta et al., 1998; Meniconi et al., 1998; Valtonen, 1991; Fong, 2000; Johnston et al., 2001; Heuschmann et al., 2001; Shor, 2001; LaBiche et al., 2001; Nadareishvili et al., 2001; Huittinen et al., 2002; Mahdi et al., 2002; Vainas et al., 2002; Ciervo et al., 2002) (таблица 8.1).

Adam Meijer с коллегами продемонстрировали присутствие мембранного белка *C. pneumoniae* в макрофагах поздних атеросклеротических поражений (тип IV–VI) сонных артерий. Авторам не удалось обнаружить геномную ДНК *C. pneumoniae* с помощью гибридизации *in situ* и 16S-рибосомальную ДНК с помощью полимеразной цепной реакции. Фрагментированная ДНК *C. pneumoniae* была обнаружена в клетках, иммунореактивных по отношению к мембранному белку хламидий (Meijer, 1999; Meijer et al., 2000) (рис. 8.28).

Ранее Kuo с соавторами удалось обнаружить антиген *C. pneumoniae* в ранних атеросклеротических поражениях (тип II) у 7 из 16 больных (Kuo et al., 1993a). В другом исследовании



Таблица 8.1.

## Доказательства связи некоторых инфекций и атеросклероза (Fong, 2000)

Инфекционный агент	Эпидемиологические доказательства	Морфологические доказательства	Экспериментальные доказательства (животные модели)	Клинические доказательства
<i>Цитомегаловирус</i>	+	+	++	0
<i>Chlamyphyla pneumoniae</i>	++	+++	++	+
<i>Helicobacter pylori</i>	+	0	0	0
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+	+	+	0

антиген *C. pneumoniae* был найден как в макрофагах, так и в гладкомышечных клетках (Кюо et al., 1993б). Ramirez (1996), Jackson et al (1997) и Maass et al (1998) удалось выделить *C. pneumoniae* в культуре клеток из атеросклеротических поражений.

Таким образом, по аналогии с *Chlamydia trachomatis*, вызывающей длительную персистентную инфекцию и приводящей в местах инфицирования к повреждению тканей (трахома, сальпингит, болезнь Рейтера), *Chlamyphyla pneumoniae* может заноситься макрофагами в стенки артерий и включаться в патогенез атеросклероза. Этот механизм реализуется через воспалительные иммунопатологические механизмы в интиме артерий.

Во время персистентной инфекции хламидии продуцируют большое количество белка теплового шока (Hsp60) (Cook, Honeybourne, 1994). Hsp60 стимулирует функцию макрофагов, которые участвуют в процессе атерогенеза. Они продуцируют провоспалительные цитокины, такие как тканевой некротический фактор альфа (TNF- $\alpha$  и матрикс-деградирующие металлопротеазы). Поскольку атеросклероз рассматривается в настоящее время как воспалительное заболевание, то влияние провоспалительных цитокинов играет важную роль в процессе атерогенеза.



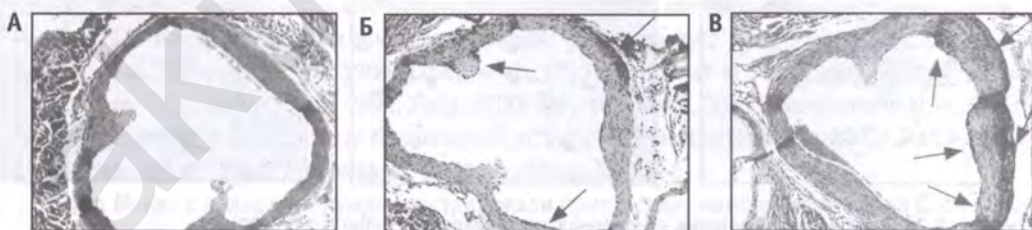
Рисунок 8.28. Участок сонной артерии, пораженной атеросклерозом (Meijer et al., 2000).

- Несколько клеток в зоне поражения содержат мембранный протеин *C. pneumoniae* (стрелки), выявляемый иммуногистологическим методом. Контрастирующая окраска – nuclear fast red. Увеличение  $\times 31$ .
- Эти клетки являются макрофагами, поскольку выявляются иммуногистологическим методом с помощью маркера макрофагов CD68. Контрастирующая окраска – nuclear fast red. Увеличение  $\times 31$ .
- В макрофагах также выявляются фрагменты ДНК *C. pneumoniae* с помощью метода гибридизации *in situ* (белая стрелка). Показаны макрофаги, которые не содержат ДНК *C. pneumoniae* (черные стрелки). Контрастирующая окраска – гематоксилин по Маюг. Увеличение  $\times 125$ .

В норме белки теплового шока играют защитную роль, стабилизируя структуру клеточных молекул при воздействии неблагоприятных факторов (тепловой шок, недостаток питательных веществ, инфекция, воспаление) (Young, Elliot, 1989). Поэтому поврежденные клетки сосудов экспрессируют эндогенные белки теплового шока. Наличие в этих же местах хламидийного HSP (являющегося объектом иммуноагрессии со стороны иммунной системы) может вызвать перекрестную реакцию, поскольку структура этих белков очень консервативна и мало отличается у различных организмов. В результате эндотелий может подвергнуться цитотоксическому воздействию со стороны собственных иммунцитов (Kleindienst et al., 1993; Schett et al., 1995). Wick и соавторы (1995) предположили, что Hsp60/65 могут способствовать атеросклерозу через стимуляцию аутоиммунных реакций. Установлено, что хламидийный Hsp60 локализуется вместе с Hsp60 человека в атеросклеротических бляшках, располагаясь в макрофагах (рис. 8.28). Как хламидийные, так и эндогенные белки теплового шока могут индуцировать продукцию TNF- $\alpha$  и металлопротеаз – медиаторов, которые способствуют прогрессированию атеросклеротических поражений (Kol et al., 1998).

В последние годы появились доказательства, что смешанная инфекция, в частности, «цитомегаловирус + хламидии», потенцирует воспалительные проявления в стенке артерий (Danesh et al., 1997; Campbell et al., 1998). Экспериментальные исследования на мышах с нормальным содержанием холестерина в крови показали потенцирующий эффект инфекции, вызванной *Cytomegalovirus murium* (мышиный цитомегаловирус) и *S. pneumoniae* (Burian et al., 2001). После заражения мышей цитомегаловирусом у отдельных особей воспалительный процесс в стенке артерий продолжал персистировать, несмотря на разрешение общих симптомов инфекции. Вирусная этиология этих изменений была доказана выявлением вируса *in situ*. В дальнейшем у таких животных в месте поражения развивается атеросклероз (Berencsi et al., 1998). Если этих животных интраназально заразить *S. pneumoniae*, то хламидийная инфекция концентрируется в измененной артериальной стенке, вызывает усиление воспаления и существенное ускорение формирования атеросклероза, по сравнению с контрольной группой (рис. 8.29).

Характерно, что это происходило у мышей линии C57/BL, которые генетически не склонны к развитию атеросклероза. Изучение смешанной инфекции «хламидии + возбудители», поражающей сосудистую стенку, является перспективным направлением разработки инфекционной теории атеросклероза (Burian et al., 2001).



**Рисунок 8.29.** Воспалительные изменения в аорте мыши (линия C57/BL) в результате экспериментальной инфекции мышинным цитомегаловирусом (MCMV) и *S. pneumoniae*. Окраска гематоксилин-эозин. Малое увеличение. (Burian et al., 2001).

- А.** Аорта контрольной мыши. Отсутствие воспалительных изменений в стенке аорты.
- Б.** Очаги воспаления (стрелки) в стенке аорты через 7 дней после заражения MCMV.
- В.** Очаги воспаления (стрелки) в стенке аорты через 7 дней после одновременного заражения MCMV и *S. pneumoniae*. Отмечается более выраженная воспалительная реакция.



## ГЛАВА 9 . ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ХЛАМИДИИ

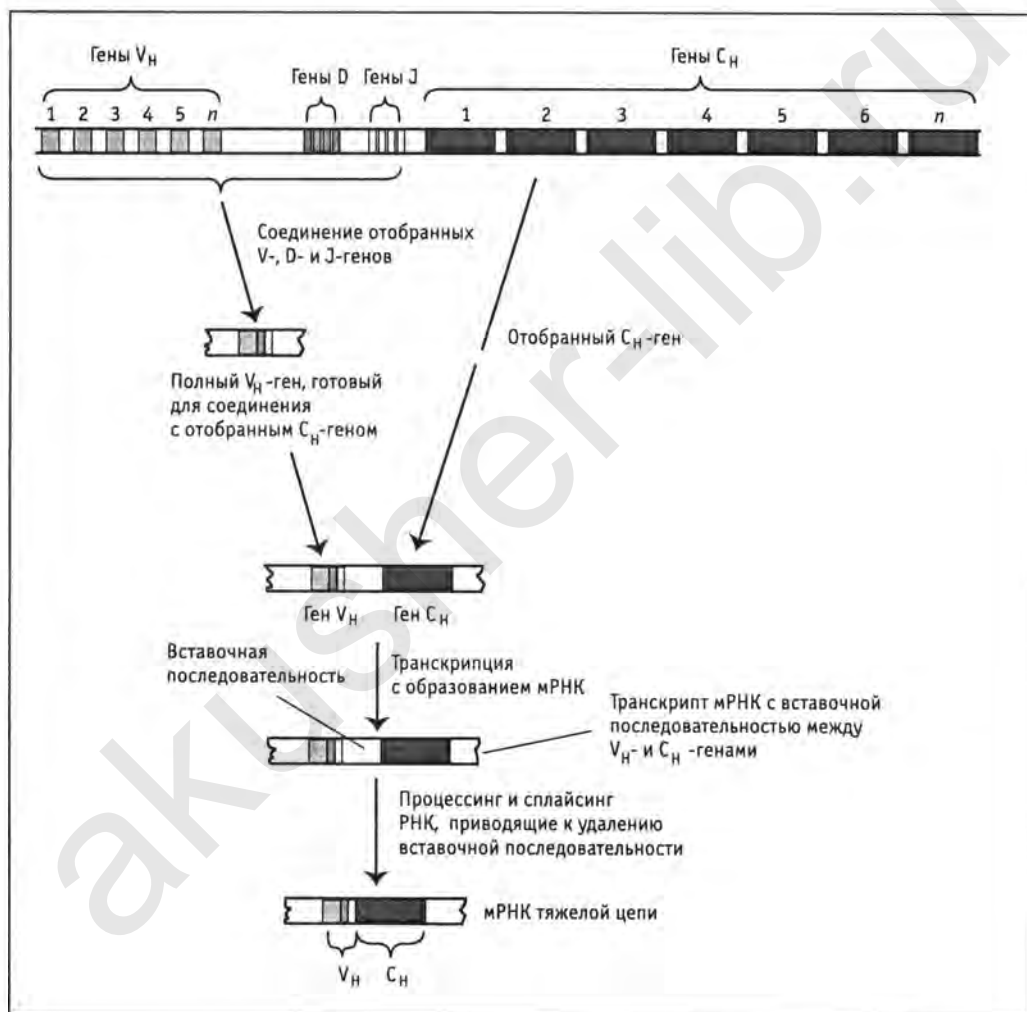
Хламидии способны паразитировать у разных представителей животных, в том числе у моллюсков и одноклеточных (Amann et al., 1997; Harshbarger et al., 1997). У всех хозяев хламидии способны преодолевать различные факторы защиты, включая адаптивные иммунные механизмы позвоночных (Brunham, 1999). Широкий филогенетический спектр животных, которые могут быть инфицированы хламидиями, предполагает длительный период совместной эволюции паразита и хозяев. Это подтверждается генотипированием 16S-рибосомальной РНК у *Chlamydiales*. Хламидии являются отдельной ветвью эволюционного дерева зубактерий, отделившейся на ранних этапах биологической истории (до 1 миллиарда лет назад) от пурпурных бактерий, грамположительных бактерий и спирохет (Woese, 1987). Поскольку хламидии паразитируют у многих позвоночных, можно предположить, что их эволюция происходила совместно с эволюцией иммунной системы, достигшей наивысшей сложности у млекопитающих. Основные элементы иммунной системы, с которыми взаимодействуют протеины хламидий – молекулы главного комплекса гистосовместимости (у человека HLA), которые имеются во всех клетках, а также антиген-специфические рецепторы, кодируемые генами V, D, J, и рекомбинантные ферменты RAG1 и RAG2, имеющиеся у лимфоцитов (Bartl et al., 1994). HLA во многом определяют ответ лимфоцитов, поскольку от них зависит спектр антигенных пептидов, представляемых Т-лимфоцитам. По сути HLA-гены являются наследственными детерминантами иммунного ответа. Антигенные рецепторы на поверхности лимфоцитов создаются в результате процесса перераспределения генов внутри лимфоцитов. Способность распознавать отдельные антигены лимфоцитами хозяина является результатом стохастического процесса генерации и последующего клонирования соответствующих иммуноглобулиновых рецепторов и не является результатом прямого наследования. Наличие тех или иных рецепторов на лимфоцитах является результатом инфекционного анамнеза отдельного организма, т.е. с какими антигенами он сталкивался в течение жизни.

Гуморальные антитела и антигенспецифичные рецепторы на поверхности лимфоцитов имеют иммуноглобулиновую природу. Иммуноглобулины – это белки, продуцируемые лимфоцитами (иммуноцитами) позвоночных в ответ на вторжение в организм хламидий. Каждый тип хламидийного антигена способен связываться с иммуноцитами одного специфического типа, вызывая рост и деление этих клеток и приводя к образованию клона полностью идентичных иммуноцитов. Клетки такого клона вырабатывают только один вид иммуноглобулинов, специфически связывающих только тот антиген, который индуцировал их размножение. Млекопитающие могут синтезировать миллионы разных видов антител, каждое из которых способно связываться только с одним из миллионов различных антигенов, воздействию которых организм может подвергнуться. Антитела образуются не только против белков и полисахаридов хламидий, но и против других бактерий, вирусов, животных и растений – практически против любой чужеродной макромолекулы (в том числе и искусственного происхождения).

Для того чтобы синтезировать антитела, каждое из которых взаимодействует лишь с одним из многих миллионов возможных антигенов, организм не может содержать соответствующее число разных генов – для каждого из возможных антител в отдельности. В ядрах клеток млекопитающих просто нет столько ДНК, чтобы кодировать миллионы различных

антител в дополнение ко многим тысячам белков, определяющих структуру, метаболизм и индивидуальность каждого организма. Это противоречие было разрешено в результате исследования структуры антител и генов, которые их кодируют.

Молекула антитела, масса которого у человека составляет около 160000 Дальтон, состоит из двух тяжелых полипептидных цепей (по 446 аминокислотных остатков в каждой) и из двух легких цепей (по 214 аминокислотных остатков). Цепи соединены между собой поперечными дисульфидными мостиками. В обеих цепях имеются еще и внутренние S-S-связи. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь содержит область с неизменной аминокислотной



**Рисунок 9.1.** Схема «сборки» гена тяжелой цепи антитела в результате перемещения генов  $V$ ,  $D$  и  $J$  из разных участков генома. Образуется полный  $VH$ -ген, соединенный с  $CH$ -геном. Затем транскрипт матричной РНК подвергается процессингу, в ходе которого удаляются спейсерные участки и образуется зрелая мРНК, кодирующая тяжелую цепь иммуноглобулина (Ленинджер, 1985).



последовательностью, характерной для данного вида; она называется константной, или С-областью. В каждой цепи находится также переменная V-область, аминокислотная последовательность которой различна у антител разных типов. Константная область тяжелых цепей состоит из трех доменов, имеющих сходные аминокислотные последовательности. Молекула антитела содержит два антигенсвязывающих участка, каждый из которых расположен в углублении (кармане) между концами переменных областей тяжелой и легкой цепей. ДНК, направляющая синтез легких цепей, образуется в результате сплайсинга двух генов, один из которых кодирует переменную область, а другой – константную. ДНК, кодирующая переменные области легких и тяжелых цепей, состоит из генов нескольких типов, которые могут менять свое положение и собираться вместе с образованием разнообразных комбинаций (рис. 9.1). У человека ДНК, определяющая переменные области антител, составлена приблизительно из четырехсот переменных (V-генов), двенадцати так называемых генов разнообразия (D-гены) и четырех соединительных (J-генов). Сочетание этих генов в различных комбинациях позволяет составить ДНК более чем для  $2 \times 10^4$  переменных областей. Эти гены, в свою очередь, претерпевают дополнительные изменения в своих нуклеотидных последовательностях и присоединяются к различным участкам ДНК, кодирующим константные области. В результате в иммуноцитах образуются миллионы разных генов, ответственных за синтез антител и иммуноглобулиновых рецепторов (Ленинджер, 1985).

Важным элементом, который обеспечивает иммунный ответ на хламидии, являются сигнальные факторы и факторы транскрипции, контролирующие цитокинный ответ типа 1 и типа 2. Функциональный полиморфизм этих генов и их регуляторов наследуется, что во многом определяет спектр клинических проявлений хламидийной инфекции в популяции и у отдельных индивидуумов (см. раздел 7. Патогенез заболеваний, вызванных хламидиями). В результате естественного отбора хламидии приобрели особые свойства, позволяющие им существовать внутри клеток позвоночных и обходить защитные механизмы хозяина на уровне клетки и организма (Marrack, Kappler, 1994; Rasmussen, 1998).

В данном разделе рассматриваются вопросы естественного иммунитета при хламидийной инфекции у человека. Иммунология как область биологической науки и, в частности иммунология инфекционных заболеваний человека, претерпевает бурное развитие. Иммунология хламидийных инфекций не является исключением. Буквально в последние годы получены данные, позволяющие пересмотреть многие положения, связанные с иммунитетом при хламидиозах. Формируется концепция иммунитета при хламидиозах, познаются причины и механизмы индивидуальной восприимчивости и устойчивости к инфекции (Rasmussen, 1998; Mabey, 2000).

### 9.1. ИММУНИТЕТ ПРИ ХЛАМИДИОЗАХ

До недавнего времени считалось, что естественный, генетически обусловленный иммунитет отсутствует при хламидийной инфекции у человека, поскольку перенесенное заболевание не создает стойкого иммунитета (Шаткин, Мавров, 1983). Однако уже в результате ранних исследований стало ясно, что при различных формах хламидийной инфекции иммунный ответ макроорганизма неодинаков. При локализованных формах урогенитальной инфекции антигенная стимуляция хламидиями иммунной системы не столь интенсивна, как при системных хламидиозах. Тем не менее, в ответ на инфицирование хламидиями мочеполовой

системы, макроорганизм включает ряд механизмов клеточного и гуморального иммунитета и факторы неспецифической защиты. Доказательства того, что хламидии могут индуцировать защитный иммунитет у человека, получены в результате эпидемиологических исследований, экспериментов по самозаражению и заражению добровольцев, а также в результате испытаний вакцин против трахомы.

Возраст является важным фактором, определяющим риск инфицирования хламидиями и возникновения заболевания. Это относится к трахоме и урогенитальным хламидиозам, заболеваемость которыми с возрастом существенно уменьшается, практически сходя на нет к старости (Brunham et al., 1980; Bailey et al., 1989). Возраст также позитивно коррелирует со степенью обсеменения при урогенитальных хламидиозах (Hobson et al., 1980; Barnes et al., 1990). Влияние возраста на восприимчивость к хламидийной инфекции может быть объяснено несколькими причинами. Это – поведение, снижающее риски инфицирования, возрастные изменения организма, не связанные с иммунной системой, и приобретенный иммунитет. Brunham и соавторы (1996) изучали группу женщин, занимающихся проституцией, в Найроби (Кения). (У данного контингента риск инфицирования большой и является постоянным). Молодой возраст женщин был независимым фактором риска заражения хламидиозом при многофакторном анализе. При этом возраст и время занятия проституцией выступали как коллинеарные факторы. Авторы не изучали показатели иммунного ответа на хламидии, поэтому нельзя утверждать, что этот факт связан с приобретением защитного иммунитета. Ряд авторов объясняют влияние возраста на восприимчивость к половой хламидийной инфекции не иммунологическими факторами. В частности, у молодых женщин намного чаще встречается эктопия цервикального эпителия, что повышает вероятность инфицирования хламидиями при половом контакте (Critchlow et al., 1995; Harrison et al., 1985). Katz и соавторы (1987) считали, что иммунитет к *Chlamydia trachomatis* после перенесенного генитального хламидиоза является частичным и длится короткое время. При обследовании пациентов клиник, занимающихся лечением болезней, передаваемых половым путем, авторы установили значительное снижение риска заражения хламидиозом при наличии хламидийной инфекции в анамнезе. Существенное значение имела давность предыдущего заболевания. Своеобразным «водоразделом» служил срок 6 месяцев. У мужчин, имевших хламидиоз до 6 месяцев, хламидии после случайных половых контактов выделяли у 20%, а у имевших хламидиоз после 6 месяцев – у 41% ( $P=0,0006$ ). Аналогичная картина наблюдалась и у женщин – 14% и 35% ( $P=0,003$ ).

При наблюдении за больными трахомой, которые не лечились, установлено спонтанное излечение от хламидиоза (отсутствие клинических и лабораторных признаков инфекции) спустя несколько лет. Самоизлечение от трахомы предполагает приобретенный иммунитет к этой инфекции. Так, Grayston и соавторы (1985) отметили спонтанное разрешение в течение 8 лет всех случаев семейной трахомы в 28 из 31 семьи, где дети болели трахомой. Известны опыты по заражению добровольцев трахомой, проведенные Jawetz и соавторами (1965). Четырнадцать из 15 добровольцев (93%), у которых ранее не было хламидийной инфекции, заразились. Пять из 9 добровольцев (56%), у которых ранее была инфекция, удалось заразить путем скарификации *C. trachomatis* в конъюнктиву. Это отличие оценено как достоверное ( $P=0,044$ ; тест Фишера). Резистентность к повторному заражению наблюдалась исключительно у тех, кого повторно заражали одним и тем же штаммом. Ни одного из 4 пациентов не удалось заразить вновь тем же штаммом, тогда как все 5 из 5, кого повторно заражали другим (гетерогенным) штаммом, вновь заразились трахомой ( $P=0,008$ ). Срок между

первичным и вторичным заражением был около 6 месяцев. Таким образом, авторы заключили, что *C. trachomatis* создает штаммоспецифичный иммунитет к последующему заражению. Данное исследование расценивается как прямое доказательство наличия естественного иммунитета (хотя и неполного, штаммоспецифичного и краткосрочного) при хламидийной инфекции (Brunham, 1999).

Испытания вакцин также показывают, что иммунизация *C. trachomatis* порождает протективный иммунитет к инфекции и заболеванию. Примечательным в этой связи является испытание, проведенное Grayston и Wang, данные которого опубликованы в 1978 году. 332 ребенка, свободных от трахомы, но имевших высокий риск заразиться трахомой, были вакцинированы внутримышечно либо инактивированными тельцами хламидий, либо плацебо. Схема иммунизации включала три инъекции. В дальнейшем детей наблюдали в течение 3 лет. В течение первого года в вакцинированной группе частота трахомы была на 73% меньше, чем в группе сравнения, что указывало на определенный защитный эффект. В последующие два года этот защитный эффект ослабевал и уже не был различим через три года после вакцинации. Позже аналогичные результаты были получены на приматах с применением более строгих контролей (Grayston, Wang 1978; Taylor, 1990). Штаммоспецифичный характер приобретенного иммунитета при генитальном хламидиозе был показан в уже упомянутом исследовании Brunham и соавторов (1996). Реинфекция хламидиоза у проституток была вызвана штаммом, отличным от штамма, который вызвал первичную инфекцию: у 63% через 1 месяц и у 90% – через 6 месяцев.

Наличие большого разнообразия штаммов (серотипов) *C. trachomatis* свидетельствует о наличии давления естественного отбора, связанного с иммунным ответом хозяина на внедрение паразита. Основным полиморфным белком у *C. trachomatis*, отражающим это разнообразие, является MOMP – главный белок наружной мембраны. Stephens и соавторы (1986; 1987) предложили генетическое объяснение антигенных вариаций MOMP. Расшифровка гена *ompA*, кодирующего данный белок, и определение его первичной структуры показали, что он имеет четыре варибельных участка. Vaehr et al. (1988) показали с помощью нейтрализующих моноклональных антител, что варибельные участки молекулы MOMP находятся на поверхности клетки, выступая в качестве антигенных детерминант. Авторы предположили, что антигенные варианты MOMP являются аллельными вариациями гена *ompA*. Протективный иммунитет хозяина является фактором окружающей среды, который направляет естественный отбор в сторону антигенного разнообразия и возникновения штаммов паразита, не дающих перекрестных иммунных реакций со стороны протективного иммунитета хозяина. Поэтому разнообразие штаммов (сероваров) антропогенных хламидий может служить косвенным эволюционным доказательством наличия естественного иммунитета к хламидиозу (Anderson et al., 1997; Brunham, 1999).

В популяциях, где происходят множественные реинфекции паразита, передаваемого горизонтально, имеется тенденция к эволюции данного паразита в сторону увеличения вирулентности, чтобы преодолеть защитные иммунные механизмы хозяина (Nowak, May, 1994; Herre, 1995; Ebert, 1998). Серозидемиологические исследования генитального хламидиоза показывают применимость этого общего положения к хламидийной инфекции. Возбудители генитального хламидиоза принадлежат к двум биоварам – LGV и *Trachoma*, которые сильно различаются по степени вирулентности. Биовар LGV более вирулентный, обладает способностью преодолевать защитные силы организма, склонен к диссеминированной инфекции.

Серовары L1-3 *C. trachomatis*, относящиеся к LGV-биовару, чаще регистрируются в популяциях с высоким риском реинфекции. Так, среди проституток в Найроби они обнаруживались в 16% от всех генитальных хламидийных инфекций, тогда как в общей популяции города Виннипег (Канада) это число не превышало 2% (Yang et al., 1993; Brunham et al., 1996).

## 9.2. ВРОЖДЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ПРИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Хламидии чувствительны к действию защитных механизмов, направленных на борьбу с инфекцией. Хламидии активируют комплемент, стимулируют хемотаксис нейтрофилов и инактивируются сывороткой крови здоровых субъектов, которая не содержит антихламидийных антител (Johnson et al., 1983; Megran et al., 1985). В сыворотке крови содержится маннозосвязывающий белок, который является мощным ингибитором инфекции *C. trachomatis* в клетках HeLa (Swanson et al., 1998). Комплемент и маннозосвязывающий белок, очевидно, играют определенную роль в предотвращении гематогенной диссеминации хламидийной инфекции, поскольку содержатся в сыворотке крови и практически отсутствуют на поверхности слизистой оболочки – первичной мишени хламидийной инфекции. На уровне слизистой хламидии подвержены действию лизоцима (Kondo et al., 1973).

Еще в ранних исследованиях было показано, что рост хламидий подавляется интерфероном (Merigan, Hanna, 1966). Клетки, инфицированные хламидиями, продуцируют интерфероны гамма и бета (IFN- $\gamma$  и IFN- $\beta$ ), а также значительное число других хемокинов и цитокинов, включая интерлейкины (IL) 8, 6, 1 $\beta$ , колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) и GRO- $\alpha$  (Hess et al., 1992; Rasmussen et al., 1997; Возианов и соавт., 2002). Продукция данных цитокинов запускается размножением хламидий внутри клетки, но не простым контактом с инактивированными тельцами хламидий. Это означает, что иммунные механизмы не принимают участия в пусковом механизме синтеза цитокинов, предполагая не адаптивный, а неспецифический характер защиты. Многие из цитокинов активируются в результате воздействия фактора NF- $\kappa$ B, который запускает транскрипцию соответствующих генов в инфицированной клетке. (Ghosh et al., 1998). Хламидийная инфекция вызывает транслокацию NF- $\kappa$ B, возможно, через особый фактор роста, который размножающиеся хламидии высвобождают в цитоплазму клетки-хозяина. Данный фактор вызывает диссоциацию I- $\kappa$ B и NF- $\kappa$ B (Ingalls et al., 1995). IL-8 имеет особое значение среди цитокинов, вырабатываемых клеткой в ответ на инфицирование хламидиями. Данный цитокин является сильным хемоаттрактантом для нейтрофилов, которые собираются вокруг инфицированных клеток. Нейтрофилы способны инактивировать хламидии *in vitro* с помощью оксидантных и других механизмов (Yong et al., 1986). Они играют важную роль в защите от хламидий на ранних стадиях инфекции. На мышинной модели хламидиоза было показано экстравазальное проникновение нейтрофилов в брюшную полость в ответ на заражение биоваром MoPn (*Chlamydophyla muridarum*), которое зависит от поверхностного  $\beta$ -2-интегрина CD18 (Barteneva et al., 1996).

Каким образом хламидиям удастся преодолевать неспецифические факторы защиты и вызывать инфекцию, не установлено. Этот вопрос является важным для понимания природы восприимчивости и устойчивости к хламидиозу. Возможно, ответом является способность хламидий быстро и эффективно внедряться в эпителиальные клетки. При хламидийной инфекции не наблюдается выраженная активность NK-клеток, и таким образом инфицированные клетки



избегают лизиса (Onsrud, Qvigstad, 1984). Это может происходить за счет снижения чувствительности инфицированных клеток к естественным киллерам, поскольку при хламидиозе снижается экспрессия молекул HLA класса I (Black et al., 1992). Однако недавними исследованиями установлено, что инфицирование NK-чувствительных клеток *C. trachomatis* не защищает эти клетки от лизиса, вызванного естественными киллерами. NK-клетки человека обладают способностью селективно распознавать и уничтожать инфицированные хламидиями клетки (Hook, Gaston, 2000).

### 9.3. АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Склонность хламидий вызывать персистентную инфекцию отражает их способность при определенных условиях обходить защитные механизмы хозяина и, прежде всего, адаптивный иммунитет. Клинические наблюдения показывают, что у части инфицированных лиц хламидии исчезают через несколько недель или месяцев после заражения на фоне адаптивных иммунных реакций, а у части – остаются в форме хронической, активной или условно бессимптомной персистентной инфекции. Каково соотношение этих частей в конкретной популяции людей и что определяет принадлежность к ним того или иного индивидуума, зависит от сложного комплекса взаимоотношений паразит-хозяин. В этих взаимоотношениях ключевую роль играют взаимодействия между хламидийными антигенами, антиген-презентирующими молекулами и антиген-специфическими лимфоцитами.

Адаптивный ответ включает функционирование различных субпопуляций Т-лимфоцитов (клеточный иммунный ответ) и В-лимфоцитов (гуморальный иммунный ответ). Оба компонента, действующие в пределах слизистой оболочки, формируют слизистый иммунитет, складывающийся из местных антител (IgA, IgG) и особых субпопуляций Т-лимфоцитов ( $\gamma\delta$  Т-лимфоциты, лимфоциты lamina propria- LPL) (Abbas et al., 1996; Abreu-Martin, Targan, 1996).

#### 9.3.1. Клеточный иммунный ответ

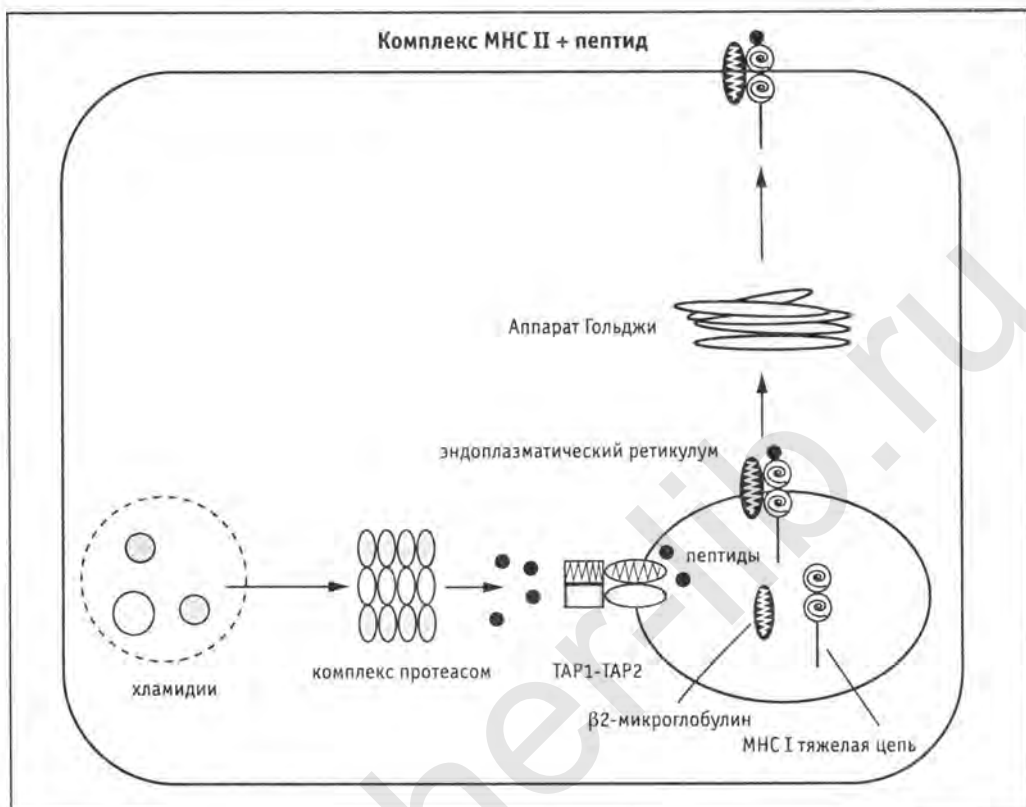
На проявление клеточных механизмов иммунитета при хламидиозах указывает цитологический состав инфильтрированных пораженных тканей, содержащих выраженный лимфоидный компонент (см. раздел 8. Патологическая анатомия хламидийной инфекции). При динамическом изучении цитологического состава соскобных препаратов у больных хламидийным уретритом после первичной полинуклеарной лейкоцитарной реакции, на 7-10 день болезни возникает лимфоидная инфильтрация. Иногда в соскобных препаратах определяют лишь единичные клетки лимфоидного ряда. Не удалось установить корреляцию этих показателей с характером течения болезни, ее прогнозом, а также с реинфекцией, вызываемой гомологичным или гетерологичным штаммом *C. trachomatis* (Шаткин, Мавров, 1983).

Т-лимфоцитарный ответ является ключевым в сопротивляемости организма хламидийной инфекции. Гетерогенность Т-хелперного ответа при хламидиозе определяет соотношение защитного и иммунопатологического компонентов в патогенезе заболевания, вызванного хламидиями (Yang, Brugham, 1998). Хелперные Т-лимфоциты подразделяются на две группы (популяции), в зависимости от строения антигенного рецептора –  $\alpha\beta$  Т-клетки и  $\gamma\delta$  Т-клетки (Abbas et al., 1996).  $\gamma\delta$  Т-лимфоциты содержатся в основном на поверхности слизистой и практически отсутствуют в кровотоке. Они играют важную роль в защите организма от хламидийной

инфекции. При хламидиозе их роль не изучена. Большинство накопленных научных данных по клеточному иммунитету при хламидиозах относится к  $\alpha\beta$  Т-лимфоцитам. Две основные субпопуляции  $\alpha\beta$  Т-лимфоцитов – это CD8 Т-клетки (класс I ограниченные) и CD4 Т-клетки (класс II ограниченные).

Т-клетки играют центральную роль в регулировании иммунного ответа на хламидии. Они имеют антиген-специфические рецепторы, первичная структура которых в высокой степени гомологична таковой у иммуноглобулинов, В-лимфоцитов. Процесс связывания антигенов с рецепторами Т- и В-лимфоцитов, в принципе, аналогичен. Однако имеется существенное различие в процессе распознавания. Рецепторы В-клеток способны распознавать структурные эпитопы непосредственно на белковой молекуле, тогда как рецепторы Т-клеток распознают антигены только в форме небольших пептидов (обычно 8-13 аминокислот), связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I и класса II. Получение антигенных пептидов из молекулы нативного антигена и связывание их с молекулами МНС называется процессингом и презентацией антигена. Этот процесс довольно сложный и осуществляется он в специализированных антигенпрезентирующих клетках – макрофагах, дендритических клетках, а также в эпителиальных клетках. Существенным является то, что механизм презентации антигена для CD8 и CD4 Т-лимфоцитов совершенно разный. Представляются разные эпитопы молекулы антигена (в форме пептидов) и связываются они с разными классами молекул главного комплекса гистосовместимости, соответственно с классом I и классом II. Отсюда и термин «класс I (или II) ограниченные» (Karlsson, et al., 1996). Этот момент является весьма важным для понимания иммунопатогенеза инфекционных заболеваний вообще, и хламидиоза в частности.

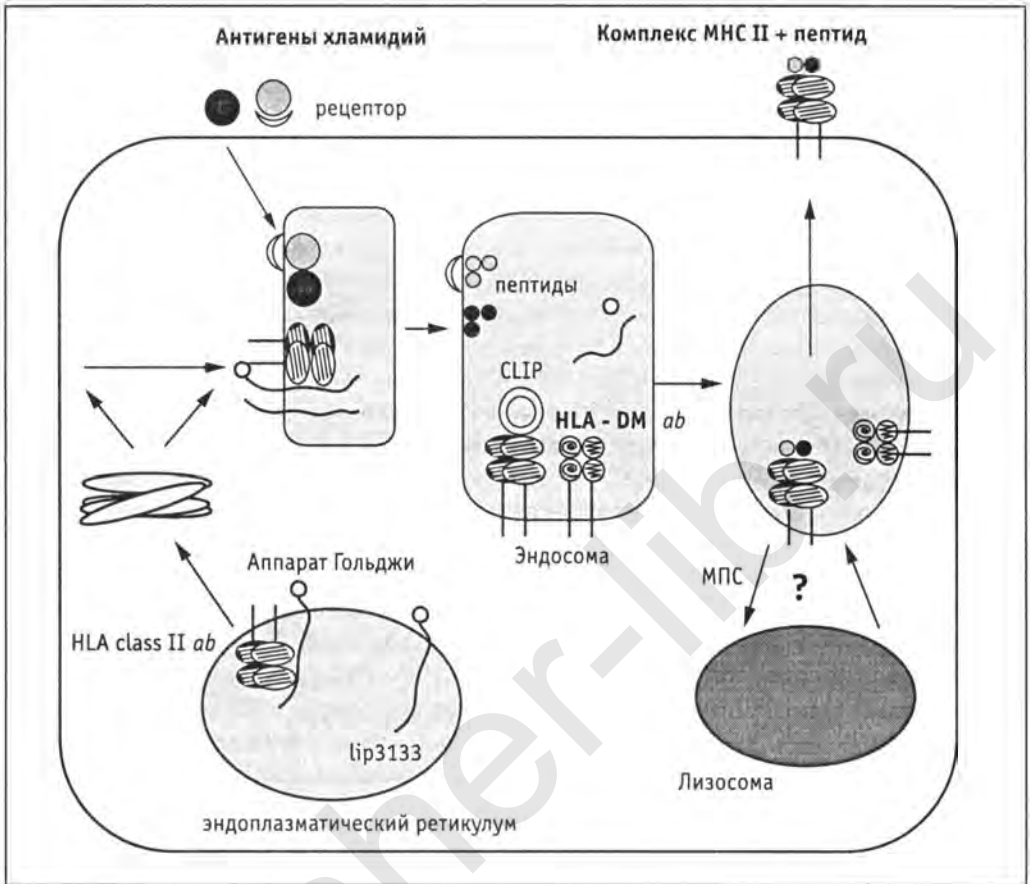
Молекулы МНС класса I и класса II активируют различные субпопуляции Т-лимфоцитов и представляют пептиды, полученные разным путем при участии различных органелл антигенпрезентирующей клетки. Наличие двух отдельных, но взаимосвязанных систем распознавания и Т-клеточного ответа отражают разные пути внедрения и размножения паразитов в организме хозяина. Внутриклеточные паразиты (вирусы) синтезируют в клетке свои антигены, которые связываются с молекулами МНС класса I и представляются на поверхности клетки. Они распознаются CD8<sup>+</sup> цитотоксичными лимфоцитами, и пораженная клетка уничтожается. Антигены внеклеточных паразитов (бактерий) захватываются из межклеточного пространства в эндосомную систему, где они деградируют до пептидов, связываются с молекулами МНС класса II и экспрессируются на поверхности клетки. Там они распознаются CD4<sup>+</sup>-хелперами, которые выполняют регуляторную роль: потенцируют антителсинтезирующие В-лимфоциты и цитотоксические Т-лимфоциты. Различия между молекулами МНС класса I и класса II связаны с разными путями их транспортировки в клетке и с разными местами, где они соединяются с пептидами (Teyton, Peterson, 1992). Оба класса МНС молекул синтезируются в аппарате Гольджи. Молекулы класса I здесь же связываются с пептидами, откуда они попадают в цитоплазму и транспортируются в эндоплазматическую сеть. Вновь синтезируемые молекулы МНС класса II связываются в эндоплазматической сети с дополнительным белком – инвариантной цепью, которая предохраняет их от преждевременного связывания с нежелательными пептидами (Teyton et al., 1990; Roche, Cresswell, 1990). Инвариантная цепь направляет молекулы класса II в систему эндосом, где после удаления инвариантной цепи молекулы класса II связываются с пептидами, полученными из внеклеточного антигена. После этого комплекс аккумулируется на поверхности клетки и распознается (Karlsson, et al., 1996) (рис. 9.2, 9.3).



**Рисунок 9.2.** Гипотетическая схема презентации хламидийного антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, класса I (MHC I – major histocompatibility complex, class I).

Антигены хламидий, образовавшиеся внутри клетки, при повреждении мембраны включения попадают в цитоплазму, где подвергаются деструкции до уровня пептидов посредством мультикаталитического комплекса протеасом. Затем пептиды транспортируются через мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭР) с помощью транспортера, связанного с обработкой антигена (TAP1-TAP2 – transporter associated with antigen processing). Внутри ЭР молекулы MHC I, состоящие из трансмембранной тяжелой цепи и растворимого β2-микроглобулина, связываются с пептидами и образуют тримолекулярный комплекс «MHC I – пептид». Затем этот комплекс транспортируется из ЭР через аппарат Гольджи к поверхности клетки-хозяина посредством экзоцитного пути. На поверхности клетки комплекс «MHC I – пептид» представляется CD8<sup>+</sup> T-хелперам (по материалам Karlsson, A., R. Castano, Per A. Peterson, 1996).

В эндоплазматическом ретикулуме молекулы класса II главного комплекса гистосовместимости (HLA class II αβ) связываются с инвариантными цепями Iip31 и Iip33. Затем через аппарат Гольджи (либо прямо, либо через поверхность клетки) они попадают в эндосомы. Антигены хламидий, находящиеся вне клетки, попадают в клетку путем жидкофазного захвата или опосредованного рецепторами эндоцитоза. Протеазы эндосом расщепляют антигены



**Рисунок 9.3.** Гипотетическая схема презентации хламидийного антигена молекулами главного комплекса гистосовместимости, класса II (MHC II – major histocompatibility complex, class II).

до уровня пептидов, а цепи lip31 и lip33 – до CLIP-пептида. HLA-DM, который находится в эндосомах, выступает посредником в замене комплекса «MHC II – CLIP» на комплекс «MHC II – пептид». Окончательное формирование комплекса «MHC II – пептид» происходит в M II C (MHC class II compartment) – мультивезикулярной, мультипластинчатой структуре, сходной с лизосомой. Возможно, лизосомы также участвуют в данном процессе. Молекулярный комплекс «MHC II – пептид» доставляется к поверхности клетки, где представляется CD4<sup>+</sup> T-хелперам (по материалам Karlsson, A., R. Castano, and Per A. Peterson, 1996).

CD4 T-лимфоциты, по данным большинства исследователей, являются ключевыми в осуществлении протективного иммунитета при хламидиозах. В исследовании Brunham и соавторов (1996) в популяции женщин коммерческого секса ВИЧ-положительные были более подвержены цервикальной хламидийной инфекции, чем ВИЧ-негативные. Среди ВИЧ-инфицированных воспалительный процесс органов малого таза чаще наблюдается у женщин со сниженным количеством CD4 T-лимфоцитов (Kimani et al., 1996). Эти данные наглядно иллюстрируют



важность CD4 Т-клеток в иммунологии хламидийной инфекции. У лиц, ранее перенесших хламидиоз, можно выявить в периферической крови ответ со стороны класс II ограниченных CD4 Т-лимфоцитов на стимуляцию хламидийным антигеном.

О бласттрансформации стимулированных дозированным хламидийным антигеном лимфоцитов периферической крови больных хламидийным уретритом или цервицитом *in vitro* первыми сообщили R. Brunham и соавторы (1981), затем Qvigstad и Thorsby (1983), а также Qvigstad и соавторы (1983; 1984). Авторы установили, что показатели теста бласттрансформации лимфоцитов являются надежным маркером свежей инфекции при индексе их стимуляции более 3,5. Индекс стимуляции представляет отношение среднего количества импульсов 3H-тимидина в 1 мин в культуре стимулированных хламидийным антигеном лимфоцитов к тем же показателям, устанавливаемым для нестимулированной контрольной культуры лимфоцитов. На ранних этапах инфекции, выявляемой у мужчин, показатели индекса более 3,5 коррелировали с выделением возбудителя и предшествовали появлению гуморальных антител. У женщин, обычно обследуемых в более поздние сроки инфекции, при показателях индекса выше 3,5 не наблюдалось корреляции этого показателя с выделением возбудителя, но отмечалась его взаимосвязь с появлением сывороточных хламидийных антител. В других наблюдениях было показано, что у мужчин с болезнью Рейтера лимфопролиферативный ответ был более выражен, чем у мужчин с неосложненным хламидийным уретритом (Martin et al., 1984). У беременных женщин с хламидийным цервицитом бласттрансформация лимфоцитов была снижена, по сравнению с небеременными женщинами с данной инфекцией. При этом степень лимфопролиферативного ответа коррелировала со сниженным количеством хламидий, выделяемых из шейки матки, и не коррелировала с титром сывороточных антител к хламидиям (Brunham et al., 1983). В отличие от гуморального иммунного ответа лимфопролиферативный ответ не является специфичным в отношении индивидуальных сероваров *C. trachomatis*, хотя проявляет видовую специфичность. Он в равной степени может быть индуцирован как элементарными, так и ретикулярными тельцами (Brunham et al., 1981; Qvigstad et al., 1983b; Qvigstad et al., 1985).

Картирование Т-клеточных эпитопов молекулы MOMP показало, что практически все они расположены в консервативных частях аминокислотной последовательности (Alien et al., 1991; Stagg et al., 1993; Ortiz et al., 1996). Этим и объясняется не штаммоспецифичность, а видоспецифичность Т-клеточного иммунного ответа при хламидийной инфекции. В-клеточные эпитопы расположены в переменных участках молекулы MOMP, что определяет штаммоспецифичность В-клеточного (гуморального) ответа на *C. trachomatis* (Zhong, Brunham, 1991). Это отражает различную регуляцию Т-клеточного и гуморального ответа при хламидиозах. Хотя активность клеточного иммунного ответа по тесту бласттрансформации обычно несколько угасает к 3-4 неделе болезни, степень лимфопролиферации в ответ на воздействие хламидийного антигена сохраняется в течение жизни, усиливаясь с возрастом. Этим объясняются возрастные отличия в восприимчивости к хламидиозу (Шаткин, Мавров, 1983; Arno et al., 1993). Степень лимфопролиферативного ответа регулируется генетически. У монозиготных близнецов степень Т-клеточного ответа на хламидии практически совпадает, тогда как у дизиготных близнецов она может существенно различаться (Bailey et al., 1993).

Mabeu и соавторами были проведены иммуноэпидемиологические исследования у больных трахомой в Гамбии (Mabeu, Bailey, 1996). Авторы подтвердили выявленный ранее лимфопролиферативный ответ на хламидийные антигены у больных трахомой (Mabeu et al., 1991).

У больных с самопроизвольно разрешившейся трахомой наблюдался усиленный Т-клеточный ответ на лимфоциты хламидий, а у больных с рубцующейся трахомой такой ответ был снижен. Степень Т-клеточного ответа имела обратную корреляцию с тяжестью течения трахомы и степенью рубцевания. При этом решающую роль в патогенезе рубцевания играли ТН2-цитокины (Holland et al., 1993; 1996; Bailey et al., 1995). Выраженность защитного и патологического иммунитета зависела от иммунного ответа на определенные антигены, что было доказано серией экспериментов с синтетическими пептидами хламидий. У больных с рубцующейся трахомой в периферической крови чаще выявлялись лимфоциты, секретирующие интерлейкин 4 (IL-4) и реагирующие на антиген теплового шока Hsp60, чем у тех, кто перенес хламидийный конъюнктивит без рубцевания. У таких больных реже обнаруживались (IFN- $\gamma$ ) гамма-интерферон-секретирующие лимфоциты, специфичные к МOMP. Таким образом, было установлено, что МOMP-специфичные ТН1-CD4-клетки играют важную роль в протективном иммунитете при трахоме, тогда как ТН2-CD4-клетки ассоциируются с патологическими последствиями персистентной хламидийной инфекции. Пролиферация В-лимфоцитов с формированием лимфоидных фолликулов может быть объяснена воздействием ТН2-цитокинов, таких как IL-4, IL-5 IL-6 и IL-10.

Bobo и соавторы (1996) установили, что у больных с рубцующейся трахомой значительно чаще обнаруживается в глазном секрете транскрипт цитокина TGF- $\beta$  (трансформирующий фактор роста  $\beta$ ). Известно, что экспрессия TGF- $\beta$  изменяет тип антигенпрезентирующих клеток для Т-лимфоцитов, приводя к сдвигу Т-клеточного ответа в сторону секреции ТН2-цитокинов (King et al., 1998). Лица с рубцующейся трахомой реже имеют транскрипты IL-2, IFN- $\gamma$  и IL-12, а транскрипты для ТН2-цитокинов, таких как IL-4 и IL-10, не определяются. И хотя ТН1-ТН2-парадигма, объясняющая взаимоотношения протективного иммунитета и иммунопатологии, не вполне доказана для хламидийной инфекции, она может служить «эвристической платформой» для новых исследований по патогенезу хламидиозов (Romagnani, 1997; Brunham, 1999).

По сравнению с CD4 Т-лимфоцитами, данные об ответе CD8 Т-лимфоцитов в литературе скудные. Qvigstad и Hirschberg (1984) первыми попытались определить клеточно-опосредуемую цитотоксичность против клеток, инфицированных *C. trachomatis*. Тогда у лиц, имевших лимфопрролиферативный ответ, такая цитотоксичность не была выявлена. Однако с позиций сегодняшних знаний это можно объяснить методическими причинами. В настоящее время установлено, что антигенспецифичные CD8 Т-лимфоциты присутствуют при хламидийной инфекции. Так, они были обнаружены у больных болезнью Рейтера. Пролиферация CD8 Т-лимфоцитов в синовиальной жидкости подавлялась моноклональными антителами против молекул МНС класса I (Sieper et al., 1991). Holland и соавторы (1994; 1997), используя в качестве клеток-мишеней фибробласты (которые экспрессируют синтетические пептиды МOMP), показали, что в различных популяциях в эндемичной по трахоме зоне от 10 до 49% имеют цитотоксичные лимфоциты (CTL) к данным клеткам. По-видимому, CD8 Т-лимфоциты имеют определенное значение в иммунном ответе на хламидии. Пока нет единого мнения относительно способности таких лимфоцитов лизировать инфицированные хламидиями клетки. Известно, что хламидийная инфекция клетки подавляет апоптоз путем блокирования высвобождения митохондриального цитохрома с и активации каталазы. Хламидии изменяют механизмы апоптоза для того, чтобы избежать лизиса этих клеток (Fan et al., 1998; Zhong, Brunham, 1998). Даже если CD8 Т-лимфоциты и не в состоянии лизировать инфицированные клетки, они могут влиять на иммунопатогенез хламидийной инфекции через синтез соответствующего набора цитокинов.

### 9.3.2. Гуморальный иммунный ответ

Специфические антитела и активированные В-лимфоциты выявляются при хламидийной инфекции (Wang, Grayston, 1974). Их иммунобиологическая роль неоднозначна. С одной стороны, хламидиозы обычно протекают на фоне гуморальных реакций иммунитета, для которых характерны низкий уровень антителообразования, особенно при локализованных формах инфекции, а также неоднозначность показателей, получаемых различными серологическими методами. При серологическом исследовании хламидийные антитела выявляются не у всех больных, определяются в различных титрах, часто обнаруживаются у переболевших и нередко у лиц, считающих себя здоровыми. Хламидийные антитела в сыворотке внешне здоровых людей часто отражают анамнестический характер этих антител, указывая на перенесенную хламидийную урогенитальную инфекцию в прошлом или на существование бессимптомной хламидийной инфекции. Персистентный антительный ответ может быть связан с другой хламидийной инфекцией (*Chlamydomypha pneumonia et psittaci*).

У мужчин с хламидийным уретритом с первых дней болезни хламидийные IgM-антитела выявляются у  $\approx 80\%$  обследованных. Тот же тип антител определяется у  $\approx 5\%$  больных хроническим НГУ. При длительном наблюдении у ряда больных устанавливалась сероконверсия по показателям накопления IgG-антител в парных сыворотках. Наибольшие показатели титра IgG-антител у мужчин выявляют при осложненных уретритах, особенно при эпидидимитах (Treharne et al., 1979). Хламидийная урогенитальная инфекция у женщин больше активизирует антителообразование. По данным серологического обследования половых партнерш мужчин с НГУ, хламидийные антитела обнаруживали в сыворотке у 86-88% женщин, у которых *C. trachomatis* выделялась из шейки матки, и только у 25-49% женщин, у которых этот микроорганизм в момент обследования выделить не удалось. Сероположительные реакции выявляются, как правило, у всех матерей, новорожденные которых больны хламидийным конъюнктивитом. (Мавров и соавт. 1989). Большая частота гуморальной реакции и более высокие титры хламидийных IgG-антител у женщин объясняются значительным распространением бессимптомной нелеченной хламидийной инфекции, а также большим поражением женских половых органов и более интенсивной антигенной стимуляцией иммунной системы.

Обнаружение в сыворотке хламидийных IgG-антител может указывать и на текущую инфекцию, и на перенесенные в прошлом, которые способны оставлять следовую реакцию на протяжении многих месяцев и лет. Установление текущей инфекции по классической сероконверсии редко достигается при урогенитальных хламидиозах, вследствие невысокого уровня антител, а также частой недоступности серологического анализа начала инфекции, обусловленной поздним обращением больных в лечебные учреждения. В то же время выявление в сыворотке обследуемых ранних IgM-антител определяет текущую хламидийную инфекцию. Согласно традиционному представлению о последовательности синтеза иммуноглобулинов различных классов, наличие IgM-антител даже в одной пробе сыворотки позволяет подозревать свежее инфицирование.

Общие показатели гуморальной реакции при различных формах хламидийной урогенитальной инфекции можно представить следующим образом. IgM-антитела обычно выявляют в сыворотке на 1-2-й неделе после инфицирования и обнаруживают в течение 30 дней (в среднем) у нелечившихся лиц. IgG-антитела также обнаруживают рано, но они нередко

способны персистировать в течение месяцев и лет на различном уровне с наибольшим накоплением в сыворотке через 1-2 мес. после заражения (Мавров, 1988).

Циркулирующие антитела могут быть также выявлены в выделениях из половых органов, в слезах, синовиальной жидкости и перитонеальном экссудате, которые содержат секреторные иммуноглобулины, в том числе и IgA, реагирующие с типоспецифическими хламидийными антигенами.

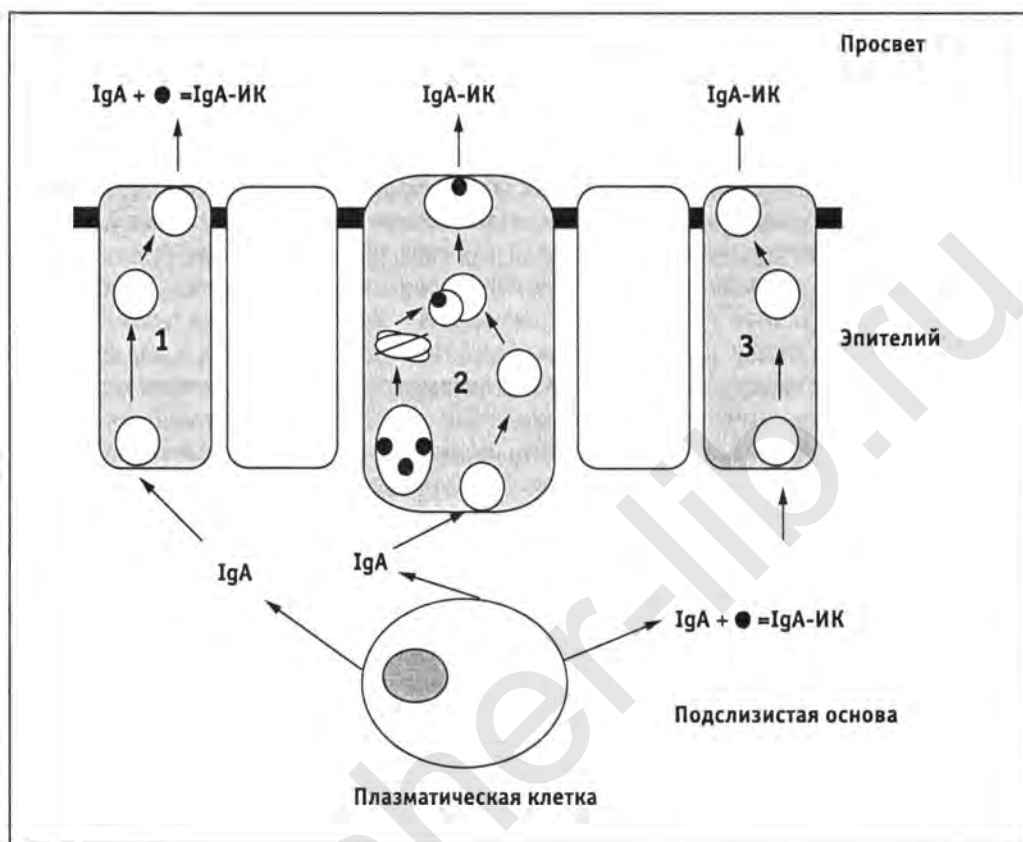
Количество выявляемых антител непостоянно. Они отражают иммуногенность инфицирующего штамма возбудителя и реактивность иммунной системы макроорганизма. При реинфекциях обычно определяются IgM-антитела и нередко повышается титр IgG-антител. Причем при раннем обнаружении этих антител наиболее характерно появление IgM-антител к иммунотипу последнего инфицирующего штамма возбудителя, а IgG-антител – к иммунотипу первично инфицировавшего микроорганизма. Высокие титры сывороточных антител обычно коррелируют с осложнениями – острым сальпингитом, перигепатитом, трубным бесплодием, болезнью Рейтера (Treharne et al., 1979; Wang et al., 1980; Punnonen et al., 1979; Martin et al., 1984). Эти данные в свое время были истолкованы таким образом, что сывороточные антитела не защищают от развития осложнений. Однако имеются данные о том, что высокие титры сывороточных антител предотвращают развитие восходящих осложнений у женщин с хламидиозом, подвергшихся аборт (Osser, Persson, 1984).

В отличие от сывороточных антител, секреторные иммуноглобулины А (IgA) принимают прямое участие в защите организма от хламидийной инфекции (Brunham, 1999). Защитная функция слизистых антител осуществляется на трех уровнях (Mostov, 1994; Lamm, et al., 1996). Первый уровень осуществляется в просвете половых путей, куда вначале попадает возбудитель. Там он может быть нейтрализован путем связывания с IgA, находящимся в секретах слизистой. Связывание хламидий с IgA предотвращает их прикрепление к эпителию и внедрение в клетку. При массивном внедрении возбудителя первый уровень защиты может оказаться недостаточным. Если инфицирование клеток эпителия произошло, то на ранних этапах инфекции включается синтез локальных IgA-антител. Они могут нейтрализовать внедрившиеся в клетку хламидии. Таким образом, IgA – единственные из 5 классов иммуноглобулинов, способные действовать внутриклеточно. Если инфекция продолжает персистировать и хламидии попадают в подслизистую основу, то там локальные IgA образуют с ними иммунные комплексы, которые затем транспортируются через эпителий в просвет (рис. 9.4).

Специфические IgA секретируются плазматическими клетками в подслизистой основе. Они транспортируются через эпителий путем опосредованного специальными рецепторами трансцитоза (клетка 1) и попадают в просвет мочеполовых путей, где нейтрализуют хламидии с образованием иммунных комплексов (IgA-ИК) (1-й уровень). В клетке 2, уже инфицированной хламидиями, трансцитозные везикулы, содержащие IgA, сливаются с везикулами, выходящими из аппарата Гольджи и содержащими хламидийный антиген. Происходит внутриклеточная нейтрализация хламидий специфическими IgA-антителами (2-й уровень). При проникновении хламидий в подслизистую основу они могут быть нейтрализованы IgA с последующей транспортировкой в виде иммунных комплексов в просвет (клетка 3) (3-й уровень) (по материалам Lamm, M. E., et al. 1996).

Экзоцитоз IgA эпителиальными клетками осуществляется посредством полимерного иммуноглобулинового рецептора и проходит через экзоцитный путь сквозь аппарат Гольджи.





**Рисунок 9.4.** Три уровня иммунной защиты с помощью иммуноглобулина класса А (IgA) при локальной хламидийной инфекции слизистой оболочки (гипотетическая схема).

Поскольку эндосомы, содержащие хламидии, также проходят подобный путь (см. раздел 3. Структурные и функциональные характеристики *Chlamydiales*), то IgA могут иметь доступ к хламидиям и вызвать нейтрализацию их роста и метаболизма (Brunham, 1999). По-видимому, для такой нейтрализации необходим IFN- $\gamma$ , поскольку у мышей с генетическим дефектом IFN- $\gamma$ -рецептора хламидийная инфекция персистирует, несмотря на большое количество местных IgA-антител.

Наличие слизистых IgA-антител обуславливает снижение количества хламидий в шейке матки, тогда как даже высокие титры сывороточных антител не влияют на цервикальную инфекцию (Brunham et al., 1983). Локальные IgA-антитела ускоряют процесс санирования слизистой при антибиотикотерапии и снижают риск возникновения бесплодия при лечении хламидийного сальпингита (Puolakkainen et al., 1986; Cunningham, 1995). В исследовании Puolakkainen и соавторов (1986), 7 женщин с бесплодием из 16, имевших IgA-антитела к хламидиям, забеременели, тогда как только одна из 13, не имевших антител, смогла забеременеть. Местные IgG- и IgA-антитела к *C. trachomatis*, содержащиеся в слезной жидкости, существенно снижают вероятность заражения трахомой (Bailey et al., 1993).

В последние годы появились новые иммунологические тесты, которые позволили глубже изучить В-клеточный иммунный ответ при хламидийной инфекции. В частности, ELISPOT-анализ позволяет идентифицировать клетки, секретирующие IgM-, IgG- и IgA-антитела к *C. trachomatis*. Антител-секретирующие клетки обнаружены в периферической крови у лиц с хламидийной инфекцией. Причем у больных с неосложненным уретритом и цервицитом преобладали плазматические клетки, синтезирующие IgA-антитела к *C. trachomatis*. Циркулирующие IgA-секретирующие клетки затем «заселяют» слизистую оболочку, причем в местах, далеких от первичного заражения. Так, у мужчин с хламидийным уретритом они обнаруживаются в слезной жидкости при отсутствии окулохламидиоза. (Vaahoranta-Lehtonen et al., 1993; Ghaem-Maghami et al., 1996; 1997). У детей с тяжелой трахомой антител-секретирующие клетки, вырабатывающие IgA-антитела к *C. trachomatis*, практически не обнаруживаются. Отсутствие местных IgA-антител является одним из факторов, существенно снижающих резистентность к хламидиозу.

При хламидийной инфекции, в особенности осложненной, наблюдается поликлональная активация В-системы иммунитета (Белозоров, и соавт., 2000; Bard, Levitt, 1984, 1986; Rasanen et al., 1986). Липополисахаридный компонент клеточной стенки хламидий является мощным активатором макрофагов, которые синтезируют цитокины и хемокины, активирующие В-клетки. Возианов и соавт. (2002) проанализировали состояние иммунитета у 70 больных хроническим урогенитальным хламидиозом и установили, что средние уровни В-лимфоцитов и иммунных комплексов превышают норму здоровых доноров. Более чем у половины пациентов наблюдается снижение количества Т-хелперов и иммунорегуляторного индекса (соотношение Т-хелперов и Т-супрессоров). Таким образом, хламидийная инфекция характеризуется активацией гуморального звена иммунитета на фоне нарушений иммунорегуляции.

#### 9.4. ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ

При хламидийной инфекции в большинстве случаев мобилизуется гуморальный и клеточный иммунный ответ. В идеале должен развиваться адаптивный иммунитет и привести к самопроизвольной санации организма в течение нескольких недель или месяцев. В ряде случаев так и происходит, однако на практике чаще имеет место другой вариант течения событий. Рост и размножение хламидий в специальных вакуолях в эпителиальных клетках предоставляет хламидиям убежище от нейтрализующих и опсонизирующих антител и предохраняет их от класс I- и класс II-опосредованного распознавания Т-лимфоцитами. Более того, поскольку в инфицированной хламидиями клетке нарушается естественный процесс апоптоза, она становится «невидимой» для цитотоксических Т-лимфоцитов. Однако на определенной стадии хламидии покидают эпителиальную клетку, поскольку эпителий подвергается естественному слущиванию и для поддержания инфекции необходимо инфицирование новых клеток. На этой стадии хламидии более чувствительны к действию защитных механизмов и могут быть элиминированы.

Наибольшую роль в элиминации хламидий играют CD4 TH<sub>1</sub>-зависимые цитокины (прежде всего – IFN-γ) и нейтрализующие антитела (прежде всего – слизистые IgA). При этом клеточный и гуморальный иммунитет должны взаимодействовать, поскольку и тот и другой необходимы для элиминации возбудителя. Так IFN-γ проявляет большую ингибирующую активность

в отношении роста хламидий в культуре клеток, если перед заражением клеток ЭТ обработать антителами. Тем не менее общеизвестно, что часто организм не может элиминировать хламидийную инфекцию, даже несмотря на антибактериальное лечение. Такие люди остаются инфицированными и чрезвычайно чувствительными к реинфекциям. Именно этот контингент чаще всего попадает в поле зрения врачей из-за вторичных последствий хронического хламидиоза (Hillis et al., 1997; Глазкова, Акилов 1999; Кондакова и соавт., 2001).

Одним из проявлений персистентной инфекции может быть воспалительный процесс органов малого таза у женщин детородного возраста. У таких больных ДНК хламидий постоянно присутствует в тканях фаллопиевых труб, несмотря на лечение. Campbell с соавторами (1993) и Patton с соавторами (1994) обнаружили ДНК хламидий в маточных трубах, соответственно, в 56% и 79% случаев бесплодия, связанного с хламидиозом. В дополнение к эпителиальным клеткам, хламидии обнаруживаются в тканевых макрофагах и гладкомышечных клетках маточных труб (Мавров, 1996). Локализация инфекции в данных клетках может частично объяснить персистенцию, поскольку тканевые макрофаги и гладкомышечные клетки живут дольше, чем эпителиальные клетки. Это же можно сказать о макрофагах синовиальной жидкости. У пациентов с болезнью Рейтера в таких макрофагах обнаруживается антиген и ДНК *C. trachomatis* (Taylor-Robinson et al., 1992; Bas et al., 1995).

При хронической персистентной хламидийной инфекции хламидии существуют в организме не в быстрорастущих размножающихся формах, которые можно обнаружить с помощью культуры клеток, а в атипичных, «криптических» формах, описанных в свое время при моделировании персистентной инфекции в клеточных культурах (Moulder et al., 1980; Lee, Moulder, 1981). Однако, несмотря на «ползучий», «дремлющий» характер инфекции, инфицированные клетки синтезируют цитокины, происходит постоянное, хотя и незначительное, антигенное раздражение на фоне снижения защитных и повышения иммунопатологических реакций организма. Все это приводит к хроническому воспалению и повреждению тканей (Beatty et al., 1993; Мавров, Мальцева, 2002). Установлено, что персистирующие хламидии синтезируют другой набор протеинов (меньше MOMP и больше Hsp60) по сравнению с быстроразмножающимися хламидиями. Это происходит потому, что при изменении условий в клетке метаболизм возбудителя перестраивается, экспрессия генов меняется (Beatty et al., 1993; 1994). В этом случае преобладает гуморальный ответ на белок теплового шока Hsp60, что эпидемиологически связано с осложненной хламидийной инфекцией (Brunham, Peeling, 1994).

## 9.5. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ХЛАМИДИИ

Возникновение, течение и исход хламидийной инфекции во многом определяется генотипом хозяина. Большинство индивидуумов с хламидийной инфекцией выздоравливают без последствий. Например, в зонах, эндемичных по трахоме, практически все население инфицировано оculoгенными штаммами *C. trachomatis*, однако лишь у сравнительно небольшого процента населения развивается трахома. Восприимчивость к хламидийной инфекции и механизмы ее развития определяются сложными взаимоотношениями биологических свойств возбудителя и организма. Имеет значение штамм или серовар *C. trachomatis*, свойства которого определяются MOMP и другими поверхностными белками (Dean et al., 1995).

Патогенность хламидий связывают со строением углеводной части главного липополисахарида их внешней мембраны. Куо и Takahashi (1996) показали, что ведущая роль в инвазивности

по отношению к различным клеткам организма принадлежит остаткам маннозы в олигосахаридах, связанных с МOMP, которые опосредуют прикрепление хламидий к заражаемым клеткам. У хламидий имеются ассоциированные с хроматином белки, типичные для эукариотов и обеспечивающие эукариотический механизм нуклеотидной конденсации и деконденсации. Индуцирование в процессе хламидийной инфекции аутоиммунных заболеваний может быть связано с захватом хламидиями фрагментов последовательностей белков хозяина, которые, будучи экспрессированы на поверхности хламидий, провоцируют аутоиммунные реакции против собственных тканевых антигенов. Наиболее вероятным таким антигеном является Hsp60, который имеет высокую степень консервативности аминокислотной последовательности. Другим примером является L7 – один из рибосомальных белков, взаимодействующих с антителами при аутоиммунных заболеваниях. (Hemmerich et al 1998). Компьютерный анализ выявил область внутри иммунодоминантного эпитопа L7 (пептид II), которая в высокой степени гомологична аминокислотной последовательности 264-286 сигма-фактора РНК-1 полимеразы *C. trachomatis*. Связывание аутоантител с пептидом II ингибировалось гомологичным сигма-пептидом. Эти результаты показывают, что молекулярная мимикрия объясняет иммунопатологию хламидий при аутоиммунных заболеваниях. О существовании влияния на генетическую организацию белков наружной мембраны хламидий со стороны иммунной системы организма-хозяина свидетельствуют данные по сравнительному генетическому анализу МOMP. Вариации в последовательности МOMP обусловлены скорее давлением со стороны иммунной системы (поскольку этот белок является основным лигандом для ответа со стороны различных типов иммунокомпетентных клеток), чем функциями патогенности и тканевого тропизма.

Большинство факторов, определяющих исход заболевания, связано с хозяином. Прежде всего, это генетические детерминанты, контролирующие воспалительный и иммунный ответ на хламидийную инфекцию. Так, при исследовании sibлов с легким и тяжелым течением трахомы был установлен наследственный характер склонности к заболеванию (Bobo et al., 1997; West et al., 1996). Установлен ряд генетических факторов, определяющих чувствительность к хламидиозу. Прежде всего, это аллели HLA класса I – A31, которые коррелируют с острыми воспалительными заболеваниями органов малого таза и бесплодием, A\*6802, встречающийся у больных с рубцующейся трахомой и B27, который связывают с болезнью Рейтера (Kimani et al., 1996; Conway et al., 1996; Martin et al., 1984).

Механизм, объясняющий восприимчивость к инфекции от данных генетических маркеров хозяина, неизвестен. Он предполагает участие CD8 Т-лимфоцитов в иммунопатологии, поскольку именно они распознают антигены, ассоциированные с HLA класса I. Наличие гена-промотора фактора некроза опухолей альфа (TNF- $\alpha$ ) непосредственно связано с рубцующейся трахомой, а сам TNF- $\alpha$  определяется в повышенных количествах в слезной жидкости больных рубцующейся трахомой (Conway et al., 1997). У больных хроническим урогенитальным хламидиозом выявлены HLA-A10, HLA-B27, HLA-B51. Манифестация хламидиоза и переход воспалительного процесса в хронический происходят вследствие активной секреции интерлейкина-10 (IL-10) Т-хелперами 2 типа (TH<sub>2</sub>) со снижением синтеза гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ) Т-хелперами 1 типа (TH<sub>1</sub>). При этом происходит активация гуморального звена иммунитета с синтезом антител, не обладающих защитными свойствами (Возианов и соавт., 2000; 2002).

Известны другие генетические маркеры, определяющие восприимчивость и тяжесть течения хламидийной инфекции. Это гены, регулирующие гуморальный ответ к хламидийному



белку теплового шока Hsp60 и определяющие, какой тип цитокинного ответа на антигены хламидий будет преобладать – CD4 TH<sub>1</sub> или CD4 TH<sub>2</sub>. Считается, что это ген HLA-DQ. У человека CD4 TH<sub>1</sub>-ответ на аллергены регулируется генами кластера цитокина IL-4, который картирован на хромосоме 5q 31-33 (Marsh et al., 1994). Дальнейшее изучение генов данного локуса в популяции больных хламидийной инфекцией, возможно, позволит выявить генетико-эпидемиологические закономерности возникновения и течения различных клинических форм хламидиоза.

## 9.6. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE*

Об иммунном ответе на *C. pneumoniae* известно намного меньше, по сравнению с *C. trachomatis*. В целом иммунология этих двух инфекций схожа, однако имеются и существенные различия, поскольку возбудители принадлежат к разным родам семейства *Chlamydiaceae*. Цикл развития рода *Chlamydia* всегда протекает в одной вакуоли, ограниченной унитарной мембраной, отделившейся от плазмолеммы клетки. Представители рода *Chlamydoiphila* образуют много плотных включений. Некоторые штаммы *Chlamydoiphila pneumoniae* образуют включения, где отдельные хламидийные тельца могут быть окружены клеточной мембраной хозяина (рис. 9.5) (см. раздел 3. Структурные и функциональные характеристики *Chlamydiales*).

Данное биологическое свойство *C. pneumoniae* позволяет этому микроорганизму, в отличие от *C. trachomatis*, непосредственно передаваться от клетки к клетке без предшествующего лизиса (Kuo, Grayston, 1990). Это позволяет *C. pneumoniae* лучше защищаться от механизмов иммунного распознавания хозяина. Пептиды, происходящие из белков наружной мембраны *C. pneumoniae*, вероятно, поэтому в меньшей степени включаются в презентацию по классу I и по классу II. Это обуславливает широкое распространение инфекции, персистенцию ее в организме, переход в субклинические и бессимптомные формы. Естественно, данное предположение нуждается в дополнительной экспериментальной проверке. Однако клинико-эпидемиологические данные поддерживают эту гипотезу. Установлено, что 90% людей, инфицированных *C. pneumoniae*, имеют незначительные клинические симптомы инфекции или полное их отсутствие. Это может быть связано с тем, что хроническая инфекция *C. pneumoniae* делает неэффективными защитные механизмы иммунной системы.

Кроме эпителиальных клеток, *C. pneumoniae* способна размножаться в других специализированных клетках человека – эндотелии сосудов, гладкомышечных клетках и в моноцитах (Gaydos et al., 1996). Инфицированные моноциты усиливают экспрессию CD14 и увеличивают секрецию цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 (Heinemann et al., 1996; Numazaki et al., 1995). Инфицированные эндотелиальные клетки секретируют тканевый фактор, обладающий прокоагулянтной активностью (Fryer et al., 1997).

Как профессиональные фагоциты, моноциты/макрофаги ответственны за передний край «обороны» от внедрившихся хламидий. Они регулируют функции других клеток, участвующих в иммунном ответе. Течение хламидийной инфекции во многом зависит от способности профессиональных и непрофессиональных фагоцитов поглощать и переваривать возбудителя и способности *C. pneumoniae* избегать гибели, длительно существовать и даже размножаться в фагоцитах (Rank, Vavouil, 1996). Пребывание хламидий в моноцитах крови позволяет инфекции распространиться в органы и ткани, далекие от места первичного инфицирования,

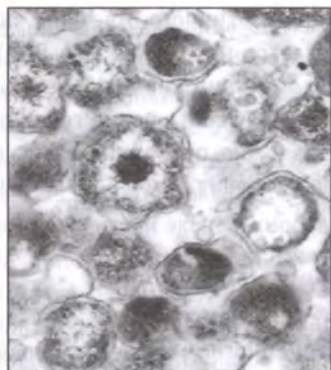


Рисунок 9.5.

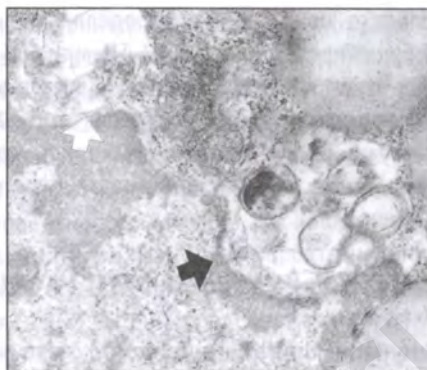


Рисунок 9.6.

**Рисунок 9.5.** Электронная микрофотография *C. pneumoniae* в клетке культуры HL через 72 часа после заражения. Хламидийная клетка кроме собственной мембраны окружена мембраной клетки-хозяина (стрелка). Увеличение  $\times 11\,000$ .

**Рисунок 9.6.** Электронная микроскопия моноцитов человека через 72 ч после инфицирования *C. pneumoniae* (штамм Кажаани 7). Множественные очень мелкие включения, содержащие несколько хламидийных телец на разных стадиях развития (черная стрелка) или одно тельце (белая стрелка). Видна клеточная мембрана, окружающая эти включения. Увеличение  $\times 10\,400$  (Aïrenne et al., 1999).

и участвовать в местных иммунологических и воспалительных реакциях. Механизмы персистенции *C. pneumoniae* в мононуклеарных клетках были тщательно изучены в ряде исследований *in vitro* (Kaukoranta-Tolvanen et al., 1996; Koehler et al., 1997; Aïrenne et al., 1999; Haranaga et al., 2001). Группа финских исследователей показала, что свежееизолированные моноциты человека могут быть инфицированы *C. pneumoniae*, хотя инфекция развивается неактивно (Aïrenne et al., 1999). С помощью электронной микроскопии было показано, что включения содержат тельца хламидий на разных стадиях развития, хотя и в небольших количествах (рис. 9.6).

Синтез хламидийной матричной РНК обнаруживается в течение 7 дней после заражения, что указывает на метаболическую активность возбудителя. Инфицированные моноциты могут в течение 7 дней индуцировать антиген-специфическую пролиферацию лимфоцитов в ответ на хламидийный антиген.

Основным цитокином, регулирующим бактерицидную активность фагоцитирующих клеток, является IFN- $\gamma$ . Однако в случае инфекции моноцитов *C. pneumoniae* (так же, как и *C. trachomatis*, серовар К), IFN- $\gamma$ -антитела или избыток триптофана в среде не отменяли ингибиции роста хламидий в моноцитах. Это свидетельствует о том, что здесь могут быть вовлечены и другие механизмы (Koehler et al., 1997). В отличие от моноцитов, макрофаги хорошо поддерживают рост *C. pneumoniae* (Godzik et al., 1995; Kaukoranta-Tolvanen et al., 1996; Gaydos et al., 1996). Показано, что *C. pneumoniae* способна диссеминировать из дыхательных путей в другие органы, включая эндотелий сосудов, посредством инфицированных моноцитов/макрофагов (Moazed et al., 1998).

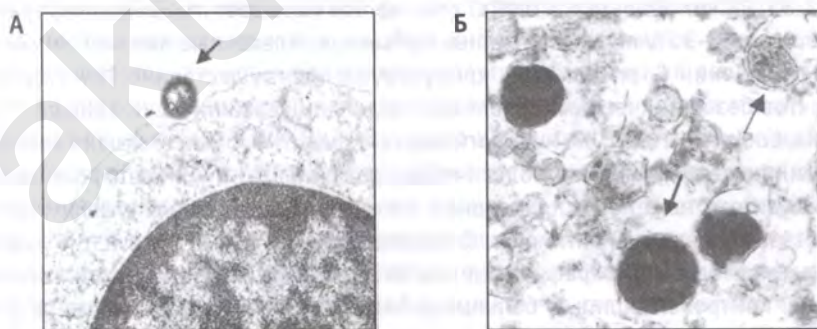
Исследования Kaul и соавторов (2000) показали, что ДНК *C. pneumoniae* может быть выявлена в CD3<sup>+</sup>-лимфоцитах периферической крови у больных с кардиологическими заболеваниями. Таким образом, не только макрофаги, но и лимфоциты могут быть клетками-хозяевами



при инфекции *C. pneumoniae*. Экспериментальные исследования Haranaga и соавторов (2001) показали, что Т-лимфоциты *in vitro* могут быть инфицированы данным возбудителем и служат местом накопления и распространения инфекции. С помощью электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии были продемонстрированы морфологические структуры и антиген хламидий в Т-лимфоцитах человека. Хламидии располагаются в цитоплазме и имеют морфологические признаки, сходные с таковыми при размножении в клетках. Через 3 суток после заражения выявляются ретикулярные тельца с характерным периплазматическим пространством (рис. 9.7). Наличие ДНК было показано с помощью полимеразной цепной реакции. Инфицирование лимфоцитов *C. pneumoniae* изменяет функционирование иммунокомпетентных клеток, что может играть важную роль в иммунном ответе при инфекции, вызванной данным возбудителем. Продукция провоспалительных цитокинов лимфоцитами усиливается при заражении их *C. pneumoniae*.

Имеются индивидуальные различия в чувствительности лимфоцитов к хламидийной инфекции. Лимфоциты, взятые от некоторых индивидуумов, не удается заразить *C. pneumoniae*. Возможно, это связано с генетически обусловленной устойчивостью к заражению или с приобретенным иммунитетом, поскольку *C. pneumoniae* – чрезвычайно распространенный патоген, инфицирующий значительную часть популяции. Поражение *C. pneumoniae* Т-лимфоцитов может нарушить их функции как важнейших иммунокомпетентных клеток и повлиять на иммунный ответ при этой инфекции.

Инфицирование организма *C. pneumoniae* индуцирует сильный гуморальный иммунный ответ. Антитела в сыворотке крови появляются в основном в возрасте 5-14 лет, достигая уровня 50-70% в популяции. При инфекции, вызванной *C. pneumoniae*, антитела персистируют в организме в течение 3-5 лет, затем их уровень существенно падает. Поскольку столь значительный процент взрослых людей имеют антитела, можно предположить, что многие инфицируются неоднократно в течение жизни. Эти антитела могут иметь защитный характер, поскольку моноклональные антитела к поверхностным детерминантам *C. pneumoniae* нейтрализуют инфекционность возбудителя в культуре клеток (Kuo et al., 1995).



**Рисунок 9.7.** Электронная микрофотография Т-лимфоцитов человека, инфицированных *in vitro* *C. pneumoniae*.

- А.** Прикрепление элементарного тельца (стрелка) к поверхности Т-лимфоцита сразу после заражения.  
**Б.** Тельца *C. pneumoniae* на разных стадиях развития (стрелки) в цитоплазме Т-лимфоцита через три дня после заражения. Увеличение  $\times 11\ 000$ . (Haranaga et al., 2001).

У *C. pneumoniae* другие иммунодоминантные антигены по сравнению с *C. trachomatis*. Это белки массой 53, 60, 73 и 90 килоДальтон. МOMP, массой 40 килоДальтон, который является иммунодоминантным у *C. trachomatis*, у *C. pneumoniae* является относительно иммунорецессивным белком (Iijima et al., 1994). МOMP *C. pneumoniae* не имеет разнообразия вариабельных доменов (Melgosa et al., 1991; Gaydos et al., 1992; Molestina et al., 1998). Молекулярная природа иммунодоминантных эпитопов *C. pneumoniae* не установлена. Essig и соавторы (1999) с помощью радиоактивной метки синтезированных *de novo* антигенов *C. pneumoniae* TW183 с последующей иммунопреципитацией определили иммунодоминантные протеины. Сыворотки больных с респираторной инфекцией *C. pneumoniae* реагировали с протеинами 160, 97-99, 60-62, 40, 27, 15 kDa. В иммуноблоттинге сыворотки реагировали только с белковой фракцией массой 60-62 килоДальтон. Данный белок появляется в клетках хламидий через 24-48 ч после заражения и является иммунодоминантным при инфекции *C. pneumoniae*. Кроме того, иммунный ответ вызывают поверхностные белки массой 97-99, 40 и 15,5 kDa, а также белки массой 160, 27 kDa, которые соответствуют известным компонентам клеточной стенки ОМС *C. pneumoniae* (Knudsen et al., 1999; Essig et al., 1999; Wolf et al., 2001; Marston et al., 2002).

При некоторых обстоятельствах сывороточные антитела к *C. pneumoniae* могут вызывать иммунопатологические реакции. Циркулирующие иммунные комплексы, содержащие липополисахарид *C. pneumoniae*, обнаруживаются у больных с ишемической болезнью сердца и острым инфарктом миокарда (Белозоров и соавт., 2000; Рудык, 2002; Leinonen et al., 1990; Linnanmäki et al., 1993; Mavrov et al., 1994). Антитела против Hsp60 человека коррелируют с антителами против *C. pneumoniae* и часто встречаются у больных с аневризмой аорты (Blanchard et al., 1998).

При инфекции, вызванной *C. pneumoniae*, регистрируется и клеточный ответ. Мононуклеарные клетки периферической крови и синовиальной жидкости демонстрируют выраженный лимфопролиферативный ответ (Surcel et al., 1993; Braun et al., 1994). Данный ответ в значительной степени является видоспецифичным – 55% клонов Т-лимфоцитов распознают только антигенные детерминанты ЭТ *C. pneumoniae*, а остальные реагируют как с *C. pneumoniae*, так и с *C. trachomatis* (Halme et al., 1997). Т-лимфоциты распознают антигены 32, 53, 98 килоДальтон. МOMP *C. pneumoniae* вызывает лимфопролиферативный ответ примерно у 18-30% инфицированных субъектов. Клеточные линии Т-лимфоцитов, активных в отношении *C. pneumoniae*, продуцируют преимущественно IFN- $\gamma$  матричную РНК у субъектов без клинических проявлений и IL-4 у лиц с клинически манифестной инфекцией (Vix, Locksley, 1998). Иммунологическая парадигма, объясняющая соотношения защитного иммунитета и иммунопатологических реакций TH<sub>1</sub>- и TH<sub>2</sub>-клеточным ответом на антигены возбудителя, может быть применена и к инфекции, вызванной *C. pneumoniae*. Dahlen и соавторы (1995) определили антитела к *C. pneumoniae* и уровень IFN- $\gamma$  и IL-6 в сыворотке крови у 60 пациентов с ангиографически подтвержденным атеросклерозом коронарных артерий и у 60 контрольных лиц. У больных уровень антител и IL-6 был выше, а у здоровых лиц – преобладал IFN- $\gamma$ .

Влияние инфекции *C. pneumoniae* на патогенез аутоиммунных заболеваний органов дыхания окончательно не установлено. Были получены доказательства роли данной инфекции в развитии астмы (Hahn et al. 1996; Hahn, McDonald 1998; Halme et al., 1997). *C. pneumoniae* может вызывать острые респираторные заболевания (синуситы, бронхиты,



пневмонию), которые могут привести к хронической астме и к другим осложнениям. Kogman и соавторы (1997) описали пациента с инфекцией *S. pneumoniae*, у которого развилась церебральная дисфункция, сопровождающаяся расстройством дыхания.

### 9.7. КОНЦЕПЦИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ХЛАМИДИОЗАХ

Хламидии первично инфицируют эпителиальные клетки, что вызывает системный и слизистый гуморальный и клеточный иммунный ответ. Основа защитного иммунитета против хламидий – продукция IgA и IFN-γ, которые (каждый на основе собственного механизма действия) обеспечивают, в идеале, быструю санацию эпителиальных клеток от внедрившихся хламидий. IgA связываются с поверхностными детерминантами хламидийного MOMP и препятствуют прикреплению хламидий к чувствительной клетке, а если такое произошло, то они мешают поступлению питательных веществ в хламидийную клетку из цитозоля клетки-хозяина. Т-лимфоциты накапливаются под эпителием и секретируют IFN-γ, который изменяет биохимию эпителиальных клеток и ограничивает возможность метаболизма хламидий в инфицированных клетках за счет лишения их триптофана и других питательных компонентов.

Если хламидийной инфекции удастся преодолеть защиту, то развивается персистентная инфекция, которая постепенно запускает иммунопатологические механизмы, повреждающие ткани. Примерно в 80% случаев инфекции, вызванные *S. trachomatis* и *S. pneumoniae*, протекают бессимптомно. При декомпенсации иммунологических функций могут возникать системные поражения многих органов и тканей, а также аутоиммунные реакции. По-видимому, в их основе лежат особенности организации генома хламидий. Длительное существование внутри клеток-хозяев, при котором продукты генов, происходящих от эукариотов, экспрессируются на поверхности внешней мембраны хламидий, может приводить к развитию иммунного ответа организма хозяина против собственных антигенов.

Персистенция инфекции происходит не только (и не столько) в эпителиальных клетках, но и в тканевых макрофагах и гладкомышечных клетках подслизистой основы. Этим объясняются сложности лабораторной диагностики и дискордантность различных лабораторных тестов, подтверждающих наличие инфекции. Хламидии находятся в особом, «дремлющем» состоянии, когда практически отсутствует типичный репродуктивный цикл развития со сменой фаз и лизисом клеток. При этом хламидии содержат меньше главного белка наружной мембраны (MOMP) – основного иммуногена при хламидийной инфекции, и больше белков теплового шока (Hsp60). При персистентной инфекции включаются механизмы, вмешивающиеся в естественный процесс апоптоза клеток. Отодвигая запрограммированную смерть клеток-хозяев на неопределенный срок, хламидии тем самым обеспечивают себе возможность длительного существования при минимальном метаболизме и репродукции. При этом защитный иммунитет со стороны организма хозяина подавляется, а иммунопатологические реакции возрастают. Преобладает гуморальный ответ на Hsp60 хламидий с перекрестным иммунитетом к белкам теплового шока собственных тканей. Клеточный ответ характеризуется появлением клонов Т-лимфоцитов, которые секретируют IL-10 и/или IL-4, но не IFN-γ. Инфицированные клетки высвобождают хемокины и цитокины, что провоцирует хроническое воспаление с исходом в фиброз.

## ГЛАВА 10. ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Среди стратегических направлений борьбы с хламидийными инфекциями специфическая иммунопрофилактика (вакцинация) является наиболее многообещающей. Существует мнение, разделяемое многими специалистами, что без тотальной и эффективной вакцинации отдельных популяций справиться с эпидемией хламидиоза невозможно (Piot, Islam, 1994; Brunham et al., 2000). В особенности это касается половой хламидийной инфекции. В 1987 году May и Anderson опубликовали в журнале Nature статью, где математически описали динамику передачи инфекций, передающихся половым путем. Распространение заболеваний, передающихся половым путем (ЗППП), в заданный отрезок времени описывается простым уравнением:

$$R = b \cdot c \rightarrow D$$

где:

- R** – количество заразившихся половых контактов,
- b** – вероятность передачи заболевания половому контакту,
- c** – количество половых партнеров,
- D** – длительность заразного периода заболевания.

Из уравнения понятно, что при  $R > 1$  заболеваемость растет. При создании невосприимчивости к заражению у большинства потенциальных половых партнеров величина **b** стремится к нулю, вследствие чего эпидемия в данной популяции прекращается даже при рискованном сексуальном поведении (**c**) и отсутствии лечения больных заразными формами заболевания (**D**).

Несмотря на появление новых антибиотиков и мероприятий, направленных на формирование безопасного полового поведения – использование презервативов, пропаганда здорового образа жизни, популярная информация о хламидийной инфекции – попытки ограничить эпидемию хламидиоза безуспешны. В связи с этим в последние годы внимание к вакцинам, как методу профилактики и лечения хламидиоза, возросло (Burke 1993). Последние достижения микробиологии, иммунологии, биохимии хламидий позволили по-новому взглянуть на проблему вакцинации населения против этой инфекции. Рекомбинантная генная инженерия дала возможность получать высокоочищенные антигены в больших количествах, а создание эффективных иммуномодуляторов и адъювантов позволяет надеяться, что в недалеком будущем будут созданы вакцины против хламидийных инфекций.

На возможность создания вакцин влияют различные факторы: биологические свойства возбудителя, в частности его антигенная структура и возможность культивироваться *in vitro*, патогенез инфекционного процесса, способность макроорганизма вырабатывать естественный иммунитет после перенесенной болезни, наличие подходящих животных моделей. Хламидии имеют сложную антигенную структуру, обладают большой вариабельностью антигенов внутри порядка *Chlamydiales*, не оставляют стойкого иммунитета у реконвалесцентов. Венерические хламидиозы являются антропонозами и не вызывают в естественных условиях патологии у животных. Это осложняет создание животных моделей инфекционного процесса и не позволяет прямо экстраполировать заболевание у животных на заболевание у людей.

Но с другой стороны, отсутствие резервуара инфекции у животных способствует искоренению заболевания при массовой вакцинации (Ada, 1992).

Вакцины могут действовать различными способами: защищать здоровых субъектов от заражения, блокировать передачу инфекции от больных, предотвращать развитие клинических проявлений, рецидивов болезни (Burke 1993). При конструировании вакцин и определении стратегии иммунизации главной целью является создание защитного иммунного ответа. При хламидиозах протективными являются слизистый иммунитет (СИ), с наличием большого количества S-IgA, и клеточный иммунитет. Создавая конкретную вакцину, следует определить, какие звенья иммунитета необходимо стимулировать.

*Chlamydiales*, являясь облигатными внутриклеточными паразитами, большую часть своего жизненного цикла скрыты внутри клетки-хозяина и малодоступны для иммунной системы. Однако внеклеточно расположенные хламидии и антигены, которые зараженная клетка экспрессирует на поверхности, могут быть объектом иммунной агрессии. Патогенез хламидийной инфекции в значительной степени опосредован повреждающими иммунологическими реакциями. Поэтому иммунизация может иметь и обратный эффект. Так, вакцинация убитыми хламидиями от обезьян часто приводила к развитию более тяжелой трахомы после реинфекции (Wang et al., 1967). При иммунизации животных 57-кД протеином хламидий, вызывающим тепловой шок (Hsp60), развивалась гиперчувствительность замедленного типа с развитием конъюнктивитов и артритов (Morrison et al., 1989). У женщин, инфицированных хламидиями, наличие антител к этому белку связано с высоким риском аднекситов и развитием бесплодия (Toy et al., 1993). Другие антигены хламидий, в частности MOMP – главный белок наружной мембраны, могут индуцировать протективный иммунитет. MOMP – единственный поверхностный компонент *C. trachomatis*, к которому вырабатываются нейтрализующие антитела. Антитела против MOMP защищают клетки от инфекции в культуре, а также мышей от токсического шока при заражении хламидиями. Ген, кодирующий MOMP, содержит четыре гипервариабельных домена (VD I-IV), отвечающих за связывание хламидий с чувствительными клетками. Семь пептидов VDIV весьма консервативны и присутствуют у большинства сероваров *C. trachomatis*. Моноклональные антитела к этим пептидам обладают нейтрализующим свойством. Эти пептиды связываются с рецептором A8 T-хелперов и индуцируют T-клеточную иммунологическую память. Однако вакцина на основе A8-VDIV не защищала обезьян от заражения в шейку матки, что объяснялось наличием ингибирующих IgG-антител на поверхности эпителия (Su, Caldwell, 1993).

Неизученность патогенеза хламидийной инфекции *in vivo*, отсутствие адекватных животных моделей затрудняет создание вакцин. Научная информация, накопленная в последние годы, показывает, что создание профилактических и лечебных вакцин против хламидиоза реально. Необходимо конструирование вакцин на основе генной инженерии, а не использование инактивированных микроорганизмов или их отдельных компонентов, как это пытались сделать в прошедшие годы (Grayston, Wang, 1978). В последние годы был достигнут существенный прогресс в создании вакцин против хламидий, однако клинические испытания на людях не были проведены (Brunham, 1994; Rank, 1999). Считается, что вакцина против *Chlamydia trachomatis* должна в качестве обязательного компонента содержать MOMP – как иммунодоминантный антиген у данного вида хламидий. Поскольку иммунный ответ на MOMP носит штаммоспецифический характер, то вакцина должна содержать много компонентов MOMP, расположенных последовательно и отражающих основные серотипы *C. trachomatis*.

Для того чтобы создать протективный иммунитет, надо обеспечить достаточный уровень антихламидийных слизистых IgA-антител и размножение антигенспецифических CD4 TH<sub>1</sub>-лимфоцитов. Здесь могут быть различные варианты – парентеральная вакцина с пептидами МOMP или денатурированным МOMP, рекомбинантные виды *Salmonella* или вируса полиомиелита, экспрессирующие эпитопы МOMP. Многообещающими представляются вакцины, содержащие интактный МOMP и парентеральные вакцины с эукариотной ДНК со вставленной плазмидой, содержащей генетическую последовательность МOMP. Иммунизация ДНК индуцирует сильный CD4 TH-ответ, но не приводит к появлению антител, в том числе и слизистых (Batteiger et al., 1993; Pal et al., 1997; Zhang et al., 1997; 1998).

Первые попытки создания антихламидийных вакцин были сосредоточены на трахоме. В дальнейшем основное направление исследований сместилось в сторону генитальной хламидийной инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis*. В последние годы был предпринят ряд попыток создать протективный иммунитет к респираторной и сосудистой инфекции, вызванной *Chlamydoxyla pneumonia*. Данные исследований суммированы в табл. 10.1.

В 1960-70-х годах при попытках иммунизации использовались убитые или инактивированные элементарные тельца (Schachter, Dawson 1978). Эти вакцины обладали защитными свойствами, но у отдельных индивидуумов они вызывали обострение заболевания. Были проведены исследования на приматах (Wang, Grayston, 1967; MacDonald et al., 1984). Группа под руководством Грейстона провела на Тайване полевые испытания инактивированной формалином вакцины против трахомы и показала ее эффективность в плане отдаленных результатов (Grayston et al., 1963; Woolridge et al., 1967). Аналогичные данные были получены при испытании вакцины в Гамбии (Collier, 1966).

Терских и соавторами (1968) была разработана вакцина против орнитоза в виде мелкодисперсной фазы аэрозоля с диаметром частиц от 1 до 3-5 мкм. Методика приготовления вакцины была основана на инаktivации возбудителя в культуральной среде (199) в течение 10 дней при температуре 37°C (в присутствии мертиолатата). Эффективность иммунизации была изучена в опытах на обезьянах и добровольцах. Авторы применили вакцину у лиц, занятых на птицеперерабатывающих предприятиях. Исследования подтвердили безвредность вакцинации. При серологическом исследовании крови вакцинированных у 77-90% лиц отмечено нарастание титра антигемагглютининов, которые сохранялись до 10-11 мес. Ревакцинация через 11 месяцев стимулировала синтез антител. Авторы утверждали, что вакцина предохраняла от профессионального заражения орнитозом или значительно снижала заболеваемость.

Вакцинация против трахомы не получила широкого распространения из-за частых осложнений, сопровождающихся обострением уже существующей латентной инфекции. Исходя из современных представлений об иммунопатогенезе хламидийной инфекции, эти осложнения могут быть объяснены. Вакцинация проводилась среди населения, практически тотально инфицированного с раннего возраста. То есть вакцинированные хотя и не имели клинической трахомы, но у них были циркулирующие Т-лимфоциты с иммунологической памятью, способные заселять слизистую оболочку глаза. Поскольку вакцина вводилась парентерально, она вызывала сильный гуморальный и клеточный ответ, но лимфоциты не могли мигрировать в слизистую, поскольку не имели соответствующих рецепторов. Защитный эффект был обусловлен лишь циркулирующими антителами. Т-клеточный ответ



## Исследования по иммунизации против хламидийной инфекции 1951-2002 гг.

Год	Авторы	Место заражения	Объект исследования	Способ иммунизации	Антиген <sup>1</sup>	Результат
1951	McEwen et al.	Кожа	Овца	Подкожно	Взвесь желточного мешка куриных эмбрионов, зараженных <i>Chlamydia abortus</i>	Снижение числа абортос
1963	Grayston et al.	Конъюнктивa	Человек	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые формалином)	Снижение заболеваемости в популяции, легкая форма заболевания
1964	Терских и соавт.	Конъюнктивa	Мышь, человек, макака-резус, кролик, петух	Внутрибрюшинно, внутримышечно	Убитая тканевая вакцина <i>Chlamydia trachomatis</i> (штаммы Мирза и Бурхан) (37°С плюс мертиолат)	Выраженный гуморальный иммунный ответ, снижение повторного заражения мышей, отсутствие вредного влияния на человека
1966	Collier	Конъюнктивa	Человек	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (живые)	Легкая форма заболевания
1967	Collier and Biyth	Конъюнктивa	Бабуин	Подкожно, внутривенно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые нагреванием, ультрафиолетовыми лучами, формалином или живые)	Без эффекта или легкая форма заболевания
1967	Wang et al.	Конъюнктивa	Тайваньская макака	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые формалином)	Зависимость от дозы и адьюванта. В некоторых случаях усиление заболевания
1967	Murray and Radcliffe	Конъюнктивa	Морская свинка	Внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые формалином)	Без эффекта
1967	Dhir et al.	Конъюнктивa	Человек	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые формалином)	Снижение заболеваемости в популяции
1967	Woolridge et al.	Конъюнктивa	Человек	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (убитые формалином)	Легкая форма заболевания

<sup>1</sup> Названия возбудителей даны по классификации 1999 года.

Год	Авторы	Место заражения	Объект исследования	Способ иммунизации	Антиген	Результат
1968	Терских и соавт.	Легкие	Макака резус, человек	Ингаляционно	<i>Chlamydomphila psittaci</i> (инактивированные нагреванием в присутствии мертиолатата)	Предотвращение инфекции, легкая форма заболевания
1971	Grayston et al.	Конъюнктивa	Тайваньская макака	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (целые ЭТ)	Отсутствие заражения или легкая форма заболевания при инфицировании гомологичным штаммом
1976	Howard et al.	Конъюнктивa	Морская свинка (самцы)	В уретру	<i>Chlamydomphila caviae</i> (живые)	Уменьшение продолжительности заболевания, снижение процента заражений
1978	Nichols et al.	Конъюнктивa, алагалище	Морская свинка	Внутрь	ЭТ <i>Chlamydomphila caviae</i> (живые и ультрафиолет-инактивированные)	Снижение количества включений, уменьшение продолжительности заболевания
1980	Shewen et al.	Конъюнктивa	Кошка	Внутримышечно	<i>Chlamydomphila felis</i> (живые и инактивированные)	Легкая форма заболевания
1982	Williams et al.	Носовые ходы	Мышь	В матку	Элементарные тельца <i>Chlamydomphila muridarum</i> (живые)	Предотвращение гибели
1983	Rodolakis	Брюшная полость	Мышь	В брюшную полость	Аттенуированные <i>Chlamydomphila muridarum</i>	Предотвращение гибели
1984	MacDonald et al.	Конъюнктивa	Ночная обезьяна дурукули	На конъюнктиву	<i>Chlamydia trachomatis</i> (облученные)	Усиление заболевания
1984	Rodolakis and Bernard	Кожа	Мышь	Подкожно	Аттенуированная <i>Chlamydomphila abortus</i>	Снижение числа абортос
1987	Wills et al.	Конъюнктивa	Кошка	Подкожно	<i>Chlamydomphila felis</i> (живые)	Легкая форма заболевания
1987; 1988	Taylor et al.; Taylor and Prendergast	Конъюнктивa	Павиан	На конъюнктиву, в брюшную полость, внутрь	Живые и убитые формалином <i>Chlamydia trachomatis</i> , SDS- и OGP-экстрагированный MOMP, липополисахарид	Легкая форма заболевания или без эффекта

Год	Авторы	Место заражения	Объект исследования	Способ иммунизации	Антиген	Результат
1990	Rank et al.	Влагалище	Морская свинка	На конъюнктиву, внутривенно, внутрь	ЭТ <i>Chlamydomphila caviae</i> (живые и ультрафиолет-инактивированные)	Снижение количества возбудителя и продолжительности инфекции
1990	Anderson et al.	Кожа	Овца	Подкожно	<i>Chlamydomphila abortus</i> (инактивированные ЭТ)	Снижение числа абортос
1990	Tap et al.	Кожа	Овца	Подкожно	Клеточная стенка <i>Chlamydomphila abortus</i>	Снижение числа абортос
1991	Cui et al.	Влагалище	Мышь	Внутрь	<i>Chlamydia trachomatis</i> L2 (живые)	Снижение длительности заболевания
1992	Tuffrey et al.	Матка, влагалище	Мышь	В брюшную полость, подкожно, внутримышечно, в Пейеровы бляшки	<i>Chlamydia trachomatis</i> L2 (рекомбинантные фрагменты МOMP, инактивированные МOMP-олигопептиды)	Снижение количества возбудителя, снижение инфицирования
1993	Su and Caldwell	Влагалище	Павиан	Внутримышечно	<i>Chlamydia trachomatis</i> (MOMP-пептид)	Без эффекта
1993	Batteiger et al.	Влагалище	Морская свинка	Подкожно	<i>Chlamydomphila caviae</i> (OGP-MOMP, SDS-MOMP)	Снижение продолжительности инфекции
1995	Campos et al.	Конъюнктивa	Павиан	Внутримышечно, внутрь, на конъюнктиву	<i>Chlamydia trachomatis</i> (SDS- и OGP-экстрагированный МOMP)	Снижение длительности заболевания или без эффекта
1995	Knight et al.	Фабрициева сумка	Мышь	Интраназально	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydomphila muridarum</i> ЭТ (живые) (Т-клеточный пептид)	Предотвращение развития бесплодия
1995	Jones et al.	Кожа	Овца	Подкожно	<i>Chlamydomphila abortus</i> (инактивированные)	Снижение числа абортос
1996	Whittum-Hudson et al.	Конъюнктивa	Мышь	На конъюнктиву	Антидиотипический гликолипид <i>Chlamydia trachomatis</i> , серовар С	Снижение количества включений, легкая форма заболевания
1996	Patterson et al.	Уретра	Морская свинка (самцы)	Подкожно	<i>Chlamydomphila caviae</i> (облученные ультрафиолетовыми лучами)	Снижение количества включений; длительности заболевания

Год	Авторы	Место заражения	Объект исследования	Способ иммунизации	Антиген	Результат
1996	Kelly et al.	Влагалище	Мышь	Внутрь, в носовые ходы	<i>Chlamydomyphila muridarum</i> ЭТ (живые и ультрафиолет-инактивированные)	Снижение продолжительности инфекции
1997	Zhang et al.	Носовые ходы	Мышь	Внутримышечно	МOMP и ДНК <i>Chlamydomyphila muridarum</i>	Снижение количества включений, легкая форма заболевания
1997, 1998	Pal et al.	Фабрициева сумка, влагалище	Мышь	Внутримышечно, в носовые ходы, подкожно	<i>Chlamydomyphila muridarum</i> (живые, клеточная стенка, OGP-экстрагированный МOMP, ДНК)	Предотвращение развития бесплодия
1998	Su et al.	Влагалище	Мышь	Внутривенно	Дендритические клетки, содержащие убитые нагреванием ЭТ <i>Chlamydomyphila muridarum</i>	Снижение продолжительности инфекции и снижение гидросальпинкса
1998	Herring et al.	Кожа	Овца	Подкожно	Рекомбинантный МOMP, вставленный в вирус PVX-VS2, получен из растений	Снижение числа абортос
1999	Brunham and Zhang	Легкие	Мышь	Интраназально, внутримышечно, внутрь	Нативная ДНК и <i>Salmonella typhimurium</i> , содержащие ген МOMP <i>Chlamydomyphila muridarum</i>	Развитие протективного иммунитета
2000	Svanholm et al.	Легкие	Мышь	Интраназально, внутримышечно	ДНК, экспрессирующая ген белка теплового шока 60 (HSP-60) <i>Chlamydomyphila pneumoniae</i>	Высокий уровень мРНК, кодирующей гамма-интерферон в легких, снижение количества включений, легкая форма заболевания
2001	Vern et al.	Легкие	Индейка	Интраназально, внутримышечно, «генная пушка»	ДНК, экспрессирующая ген pсDNA1/МOMP <i>Chlamydomyphila psittaci</i> , серовар А	Выраженный клеточный и гуморальный ответ, независимо от метода иммунизации. Развитие протективного иммунитета
2002	Shaw et al.	Влагалище	Мышь	Внутривенно	Дендритические клетки, содержащие рекомбинантный МOMP <i>Chlamydia trachomatis</i>	Иммунизация не предотвращает повторного заражения
2002	Pal et al.	Носовые ходы	Мышь	Внутримышечно, подкожно	МOMP <i>Chlamydomyphila muridarum</i> ( <i>Chlamydia trachomatis</i> MoPn) с использованием Срб- олигонуклеотидов в качестве адъювантов	Выраженный клеточный и гуморальный ответ. Снижение количества включений, легкая форма заболевания



вызывал только гиперчувствительность замедленного типа. В случае, если вакцинировались индивидуумы, не сталкивавшиеся с инфекцией, то вакцина давала хорошую защиту от последующего заболевания.

В настоящее время вакцины на основе целых телец используются в ветеринарии, в частности против энзоотического аборта овец (*Chlamydophyla abortus*) (Оболадзе и Терских, 1970; Rodolakis, Bernard, 1984; Anderson et al., 1990). Одна из таких вакцин представляет собой мутантный штамм *C. psittaci* (современное название *Chlamydophyla abortus*), который является термолабильным и имеет специфическую морфологию. Он способен размножаться в организме животных (мышей, овец, крупного рогатого скота), не вызывая заболевания и не приводя к абортам, но индуцируя иммунитет против диких штаммов *C. abortus* у коз, овец и коров (Rodolakis, Bernard, 1984). Это пока единственная живая аттенуированная вакцина против хламидий.

С помощью испытаний вакцин на основе целых ЭТ были изучены различные пути введения иммуногенов. При иммунизации внутрь и интравагинально живым возбудителем конъюнктивита с включениями морских свинок (*Chlamydophyla caviae*) у животных развивалась устойчивость к окулярному заражению (Nichols et al. 1978; Howard et al., 1976). Taylor и Prendergast (1987) иммунизировали приматов против трахомы перорально. Протективный иммунитет вызывался живым сероваром *C. trachomatis* L2. Инактивированный L2 и живой серовар В (возбудитель трахомы) при иммунизации внутрь не предохраняли от заражения сероваром В в конъюнктивальный мешок. Rank и соавторы (1990) иммунизировали морских свинок живыми и инактивированными ультрафиолетовым светом *C. caviae* внутрь, подкожно, внутривенно и конъюнктивально, чтобы вызвать у животных устойчивость к заражению в половые пути. Все пути иммунизации живыми тельцами, кроме перорального, вызывали частичный иммунитет к повторному заражению. При пероральном пути иммунизации гуморальный и клеточный ответы были менее выраженными. УФ-облученные тельца частично снижали интенсивность инфекции, не уменьшая ее длительности. Клеточный и гуморальный ответы были меньше, чем при иммунизации живыми организмами. Иммунизация мышей живыми *Chlamydophyla muridarum* через слизистую оболочку вызывала иммунитет как в том же месте, так и в отдаленных местах. УФ-инактивированные тельца индуцировали слабый иммунитет по сравнению с живыми. У мышей защитный иммунитет был обусловлен Т-клеточным ответом, а не гуморальным (Williams et al., 1982; Pal et al., 1996; Kelly et al., 1996).

Отсутствие прогресса при создании вакцин против урогенитального хламидиоза объясняется отсутствием понимания механизмов протективного иммунитета против инфекции слизистой оболочки мочеполювых путей. В этой связи для разработки вакцин оказалась полезной мышинная модель восходящей хламидийной инфекции половых органов (Barron et al., 1981). Появление линий мышей с определенным иммунодефицитом позволило изучить особенности иммунитета при хламидийной инфекции. Экспериментальная инфекция этих мышей, иммунизация поликлональными и моноклональными Т-лимфоцитами показали большое значение МНС класс II ограниченных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в развитии адаптивного иммунитета при генитальной хламидийной инфекции (Williams et al., 1997; Morrison et al., 1995; Su, Caldwell, 1995; Igietseme et al., 1993). Протективный иммунитет у мышей, который характеризуется ускоренной санацией эпителия половых органов и уменьшением выделения возбудителя из половых органов, связан с IL-12-зависимым Т-хелперным ответом 1-го типа (Th<sub>1</sub>). Сывороточные и локальные антитела и CD8<sup>+</sup> Т-клетки играют второстепенную роль (Cotter et al., 1997; Perry et al., 1997; Su et al., 1997).

Дендритические клетки, как профессиональные антигенпрезентирующие клетки, играют центральную роль в индукции Т-клеточного иммунитета *in vivo* (Steinman, 1991; Banchereau, Steinman, 1998; Ahuja et al., 1999). Дендритические клетки, способные проявлять выраженные антигенпрезентирующие способности *in vivo*, могут быть выращены *in vitro* с помощью рекомбинантных цитокинов (Inaba et al., 1992). Использование культуры дендритических клеток, подвергшихся воздействию антигена, может служить в качестве иммунотерапии при инфекционных заболеваниях. Su и соавторы (1998) показали, что адаптивный перенос дендритических клеток, инкубированных с убитыми хламидиями *ex vivo*, способен индуцировать мощный иммунитет к генитальному заражению хламидиями штамма мышинной пневмонии (*Chlamydoxyla muridarum*). Этот иммунитет является CD4<sup>+</sup> TH1-зависимым и не уступает такому при заражении живым штаммом MoPn. У иммунизированных мышей, подвергшихся экспериментальному заражению, из половых путей выделялось в 1000 раз меньше хламидий, воспалительная реакция со стороны урогенитального тракта была минимальной и, в отличие от контрольных мышей, гидросальпинкс не развивался. Дендритические клетки обладают рядом свойств, благодаря которым они потенцируют CD4<sup>+</sup> TH1-ответ. Им присущи высокий уровень экспрессии молекул класса II главного комплекса гистосовместимости, секреция интерлейкина 12, способность прицельно мигрировать в парафолликулярные зоны лимфоидной ткани, где они своими отростками опутывают Т-лимфоциты (Macatonia et al. 1995; Hart, 1997; Steinman et al. 1997; Lipscomb et al. 2002). Миграция дендритических клеток, содержащих хламидийные антигены, в слизистую мочеполовых органов активирует дифференцировку и размножение специфических CD4<sup>+</sup> TH1-лимфоцитов (рис. 10.1 и 10.2).

Они могут служить средством доставки хламидийных антигенов, используемых в качестве вакцин. Show и соавторы (2002) применили для иммунизации рекомбинантный белок наружной мембраны – MOMP. Дендритические клетки после воздействия MOMP секретировали

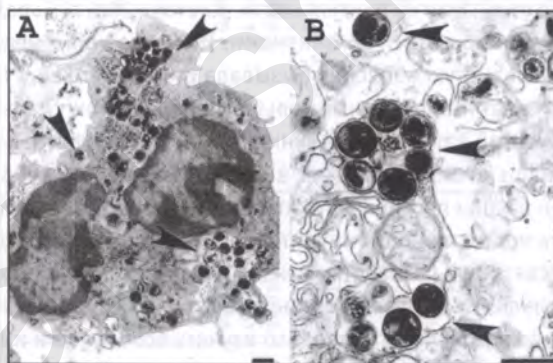


Рисунок 10.1.



Рисунок 10.2.

**Рисунок 10.1.** Электронная микрофотография дендритических клеток после 4 часов инкубации с *Chlamydoxyla muridarum* (штамм мышинной пневмонии), предварительно убитых нагреванием (56°C 30 мин). Цитоплазма содержит вакуоли, содержащие ЭТ (стрелки). Длина отрезка в правом нижнем углу соответствует 0,5 мкм (Su et al., 1998).

**Рисунок. 10.2.** Дендритическая клетка периферической крови, окруженная CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами в процессе презентации антигена. Окраска по Маю-Грюнвальду-Гимза (May-Grunwald-Giemsa). Увеличение x1197. Длина отрезка = 10 мкм. (Hart, 1997).

IL-12 и стимулировали сенсibilизированные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты к пролиферации и секреции гамма-интерферона *in vitro*. Однако, когда был осуществлен адаптивный перенос этих клеток мышам, то они генерировали TH<sub>2</sub>-, а не TH<sub>1</sub>-ответ против МОМР. Данный иммунный ответ не был протективным и не защищал от последующего заражения. Это исследование показало, что способность дендритических клеток, подвергшихся воздействию антигена *ex vivo*, стимулировать протективный иммунитет зависит от природы антигена и от TH<sub>2</sub>/TH<sub>1</sub>-баланса в иммунной системе организма.

МОМР является главным иммуногеном *C. trachomatis* и составляет значительную часть поверхностно экспрессированных структур данного микроорганизма. Поэтому не удивительно, что большинство попыток создания вакцин против *C. trachomatis* основано на иммунизации МОМР. Fan и Stephens (1997) экспрессировали МОМР на поверхности *Escherichia coli*. Используемый в качестве иммуноадсорбента, данный препарат убирал на 98% нейтрализующую активность сыворотки, полученной при заражении животных хламидиями. Таким образом, антитела к МОМР нейтрализуют инфекционность хламидий. Как серовар-специфический антиген, МОМР – наиболее перспективный элемент вакцины, поскольку обеспечивает иммунитет к гомологичным штаммам *C. trachomatis* (Zhang et al., 1987). МОМР был впервые получен в чистом виде Caldwell и соавторами (1981). Он составляет по массе примерно 60% наружной мембраны *C. trachomatis*. Stephens и соавторы (1988) определили структуру МОМР. Они показали, что его молекула состоит из четырех участков с переменными последовательностями (VSI-VS4), которые иначе называются переменными доменами (VDI-VDIV). Эти участки молекулы выходят на поверхность хламидийной клетки. Имеется также пять консервативных участков аминокислотной последовательности (CS1-CS5). Поскольку четко установлено, что нейтрализующие антитела являются штаммо- или серовар-специфическими, то они содержат эпитопы, являющиеся мишенями для протективного иммунного ответа (Rank, 1999). Иммуноблоттинг показывает, что у больных окулярным и генитальным хламидиозом имеются сывороточные и секреторные антитела к МОМР *Chlamydia trachomatis* (Newhall et al., 1982; Cevenini et al., 1986). Примечательно, что *Chlamydoxyla pneumonia* не индуцирует выраженный гуморальный ответ к своему МОМР. По крайней мере, эти антитела не выявляются с помощью иммуноблоттинга (Campbell et al., 1990).

На основании того, что МОМР вызывает сильный иммунный ответ при инфекциях, вызванных *C. trachomatis*, были предприняты попытки иммунизировать животных очищенным МОМР в додецилсульфате натрия. Taylor и соавторы (1988) иммунизировали павианов, инокулируя очищенный МОМР в конъюнктиву, интраперитонеально и внутрь, в конъюгации с холерным токсином. И хотя вакцинация несколько стирала клинические проявления болезни, количество возбудителя у контрольных и иммунизированных животных не различалось. Гуморальный ответ в опытной группе был слабым, антитела против МОМР в слезной жидкости не были обнаружены. Авторы объяснили неудачу данной вакцинации тем, что в процессе приготовления антигена были разрушены конформационные эпитопы МОМР. Следующим этапом явилось использование рекомбинантного МОМР в качестве иммуногена. Однако это явилось довольно сложной задачей, поскольку целая молекула МОМР оказалась токсичной для *E. coli* и свертывалась таким образом, что не была иммуногенной (Koehler et al., 1992; Fan, Stephens, 1997; Manning, Stewart, 1993; Dascher et al., 1993). Conlan и соавторам (1990) удалось получить набор рекомбинантов МОМР, которые индуцировали выработку антител против *C. trachomatis*, L2. Была произведена иммунизация мышей участком молекулы МОМР,



составлявшим 2/3 всей последовательности, что привело к уменьшению поражения яйцеводов при экспериментальном заражении в матку сероваром F, но не предотвращало инфекцию (Tuffrey et al., 1992).

В свое время были проведены классические исследования по картированию молекулы МOMP с целью определить иммунодоминантные эпитопы (Maclean et al., 1988; Conlan et al., 1988). Однако ответ на иммунодоминантные эпитопы далеко не всегда коррелирует с протективным иммунитетом. Были получены серовар-специфические моноклональные антитела, которые нейтрализовали инфекционность хламидий при заражении обезьян в глаз и мышей внутривенно, а также предотвращали токсическую гибель мышей при экспериментальном заражении (Zhang et al., 1987; Zhang et al., 1989; Qu et al. 1993). Эти данные предполагают, что эпитопы, к которым направлены данные моноклональные антитела, могут быть потенциальными кандидатами при конструировании вакцин. МOMP *C. trachomatis* также был картирован по отношению к участкам молекулы, распознаваемым Т-лимфоцитами. Основные эпитопы Т-лимфоцитов располагаются в консервативных участках аминокислотной последовательности – CS2 и CS5, а также возле VS3 и VS4 (Su et al., 1990; Alien et al., 1991; Zhong et al., 1993). Данные эпитопы включали хелперную функцию и стимулировали специфический лимфопролиферативный ответ. Knight и соавторы (1995) синтезировали пептид из 12 аминокислот, входящий в состав консервативного региона МOMP *C. trachomatis* возле VS3, и установили, что при внутрикожной иммунизации СЗН мышей этим пептидом возникает Т-клеточный пролиферативный ответ. Гуморальный иммунный ответ при этом не возникает. Последующее заражение мышей в матку показало, что частота сальпингитов в иммунизированной группе уменьшается, что делает данный пептид кандидатом для будущей вакцины.

Ortiz и соавторы (1996) из университета штата Висконсин (Мэдисон, США) провели масштабное и тщательное исследование для определения участков молекулы МOMP, реагирующих с Т-лимфоцитами больных, инфицированных *C. trachomatis*. Было идентифицировано 23 эпитопа. В презентации пептидов МOMP Т-лимфоцитам участвуют различные молекулы HLA класса II главного комплекса гистосовместимости (DR-1,4,7,11,13,14,17,18; DQ-3,6; DRw-52,53). Только 1 из 23 эпитопов был расположен в варибельном сегменте молекулы VS2, тогда как остальные – в константных сегментах CS4 и CS5. Т-лимфоциты периферической крови больных урогенитальным хламидиозом, культивируемые с пептидами МOMP, реагировали на 3-7 эпитопов. Участок МOMP 249-265 содержал 6 эпитопов и стимулировал Т-лимфоциты у 83% больных. Участок 89-105 распознавался лимфоцитами у 55% больных. Приблизительная длина эпитопов МOMP, реагирующих с Т-лимфоцитами человека – 8-9 аминокислот, что типично для пептидов, представляемых молекулами класса II главного комплекса гистосовместимости (МНС) (Rotzschke, Falk, 1994).

Su и соавторы (1990) считали, что если скомбинировать в одной вакцине эпитопы МOMP, распознаваемые Т- и В-лимфоцитами, то удастся создать высокоиммуногенную протективную вакцину. Они взяли эпитоп из сегмента VS4, МOMP *C. trachomatis*, серовар В, и соединили с эпитопом Т-хелперов (Su, Caldwell, 1992; 1993). Была проведена иммунизация мышей интраперитонеально и павианов внутримышечно синтетическими пептидами МOMP 8 различных штаммов хламидий. Однако иммунитет был штаммоспецифическим и не защищал от цервикального заражения сероваром D.

С конца 1980-х годов наблюдается растущий интерес к созданию пероральных вакцин. Иммунизация внутрь удобнее и безопаснее, не требует специально обученного персонала,



стерильного инструмента. Для создания эффективной защиты против инфекций, первично поражающих слизистую оболочку, необходимо создание слизистого иммунитета, что достигается путем иммунизации через слизистую оболочку. Так, активированные лимфоциты из пищеварительного тракта могут мигрировать в слизистую оболочку других органов (гениталии, глаза, дыхательные пути) и проявлять там свои защитные функции (рис. 10.3) (Holmgren et al., 1996; Clements et al., 1996).

Иммунизация пероральным путем вызывает не только появление слизистых и сывороточных IgA-антител, но и индуцирует иммуносупрессию против определенных типов системных T-клеточных иммунных реакций. Этот феномен известен как «оральная толерантность» и был описан в 1911 году Н. G. Wells, который давал морским свинкам яичный белок в пищу, после чего у них развивалась резистентность к анафилаксии на парентеральное введение этого белка. В 1946 году М. Chase наблюдал снижение реакции кожи на динитрохлорбензол у морских свинок после приема внутрь малых концентраций этого сильного аллергена (Weiner, 1996). Оральная толерантность имеет место и у человека, в частности при иммунизации гемоцианином моллюска «морское блюдечко» (*Patellida*) (Husby et al., 1994). Феномен оральной толерантности может быть использован при создании «противовоспалительных» вакцин, направленных на подавление иммунопатологического компонента хронической хламидийной инфекции.

Оральная иммунизация может быть эффективна для индукции S-IgA-ответа на хламидии, если антигены будут представлены T- и В-лимфоцитам в Пейеровых бляшках, где инициируется

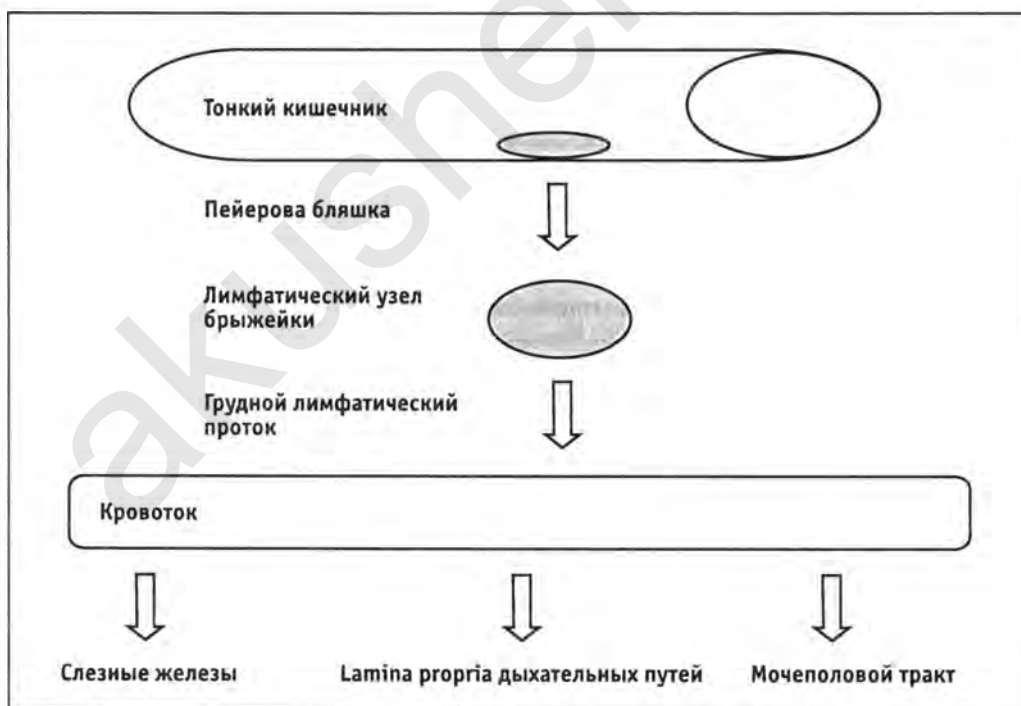


Рисунок 10.3. Общий путь стимуляции дистального слизистого иммунитета при иммунизации пероральной вакциной против *Chlamydia trachomatis*.

дифференцировка плазматических клеток, продуцирующих антихламидийные IgA-антитела. В Пейеровых бляшках содержатся Т-хелперы, которые способны переключать изотип В-клеток, синтезирующих антитела, с IgM прямо на IgA. Они также содержат Т-лимфоциты, которые инициируют окончательную дифференцировку В-клеток (Kellermann, McEvoy, 2001). В-клетки затем мигрируют в лимфатические узлы брыжейки, затем через грудной лимфатический проток попадают в общий кровоток, откуда заселяют подслизистую основу половых органов, дыхательных и пищеварительных путей. К этому времени они заканчивают дифференцировку в плазматические клетки и начинают продуцировать IgA-антитела, которые соединяются с секреторным компонентом и транспортируются на поверхность слизистой оболочки (Butcher, Picker, 1996) (рис. 10.3).

Существование иммунной системы слизистой оболочки обусловлено уникальной способностью производить секреторный IgA. Эта функция осуществляется в результате взаимодействия плазматических клеток и клеток эпителия. Тот факт, что антиген, воздействующий на слизистую кишечника, вызывает продукцию sIgA как *in situ*, так и в отдаленных слизистых оболочках, свидетельствует о наличии функциональной связи между различными видами эпителия посредством слизистого иммунитета против патогенов, поражающих слизистую оболочку (Mestecky, McGhee, 1987; Mestecky, 1987). В ранних исследованиях было показано, что В-лимфоциты слизистой оболочки при попадании в кровоток мигрируют в другие слизистые, а не в периферические лимфатические узлы (McDermott, Bienenstock, 1979). В дальнейшем были установлены рецепторы, регулирующие миграцию слизистых лимфоцитов: MAdCAM – особый рецептор – «адрессин», который экспрессируется эндотелиальными клетками сосудов лимфатических узлов брыжейки и lamina propria, а также соответствующий рецептор лимфоцитов  $\alpha 4\beta 7$  (Streeter et al., 1988; Berlin et al., 1993). Направленная миграция лимфоцитов в периферические лимфоузлы опосредуется L-селектином и PNA-адрессином, а миграция в места воспаления – взаимодействием между  $\alpha 4\beta 7$  и адгезином сосудов VCAM (Springer, 1994; Butcher, Picker, 1996). Тропизм *Chlamydia trachomatis* к слизистому эпителию и определяющее значение TH1-ответа для освобождения от инфекции предполагают слизистый путь иммунизации как наиболее перспективный для профилактики урогенитальной хламидийной инфекции (Morrison et al., 1995; Perry et al., 1997; Williams et al., 1997). Igietseme и соавторы (1998) показали на мышинной модели генитальной хламидийной инфекции значение способа иммунизации и наличия специфических TH1-лимфоцитов в слизистой оболочке мочеполового тракта при создании протективного иммунитета. При урогенитальном хламидиозе в половых органах усиливается экспрессия VCAM и происходит приток  $\alpha 4\beta 7^+$ ,  $\alpha 4\beta 7^+$ , Т-лимфоцитов и  $\alpha 4\beta 7^+$ ,  $\alpha 4\beta 7^-$  В-лимфоцитов. При этом в кишечнике в результате хламидийной инфекции экспрессия MAdCAM не меняется, не индуцируется VCAM, и слизистые Т-лимфоциты относятся к  $\alpha 4\beta 7^-$  фенотипу (Kelly, Rank, 1997; Perry et al., 1998). Igietseme и соавт. (2001) показали, что конъюнктив, слизистая альвеол и генитального тракта у мышей экспрессирует VCAM, но не MAdCAM в ответ на хламидийную инфекцию, а в воспалительном инфильтрате преобладают  $\alpha 4\beta 7^+$  Т-лимфоциты. В результате защитных механизмов данная слизистая оболочка освобождалась от инфекции в пределах 30 дней. В кишечнике инфекция персистировала до 8 месяцев без видимого воспаления, без изменений локальной экспрессии MAdCAM-адгезина и индукции VCAM. Не было гистологических признаков воспаления и повреждения тканей.

Для того чтобы создать протективный иммунитет, необходима более-менее продолжительная экспозиция иммуногена на слизистой оболочке. Это достигается применением живых

Таблица 10.2.

## Подходы к усилению слизистого иммунитета при вакцинации

Цель	Подход
Снижение вирулентности и увеличение антигенной нагрузки	Рекомбинантные протеины Живые векторы ДНК-вакцины Трансгенные растения, употребляемые в пищу
Улучшение доставки в слизистую оболочку	Полимерные микрокапсулы, липосомы Вирусоподобные частицы Иммуностимулирующие комплексы
Улучшение взаимодействия слизистой оболочки с иммуногеном	Адгезивные антигены Адьюванты
Усиление иммунного ответа	Слизистые адьюванты Комбинированная системная и слизистая иммунизация Сочетание путей иммунизации

(аттенуированных) вакцин, способных к размножению. Отсутствие живых вакцин против хламидиоза [исключение – вакцина для животных против *Chlamydophyla psittaci (abortus)*, созданная Rodolakis, Bernard (1984)], объясняется опасностью вызвать инфекцию. Был предложен ряд новых подходов, обеспечивающих достаточно длительный контакт иммуногена со слизистой оболочкой при иммунизации этим путем (Kiyono et al. 1996) (табл. 10.2).

Используется рекомбинантная техника для создания белковых вакцин на основе таких векторных систем, как *Saccharomyces cerevisiae* или бакуловирусы. Увеличения массы антигена можно достичь применением живых векторных вакцин. Наиболее часто используются авирулентные виды (штаммы) *Salmonella*, *Mycobacterium bovis*, *Yersinia*, а также стрептококки и лактобациллы (Sory et al, 1990; Classen, Osterhaus, 1992; Classen et al., 1992; Sminia, Kraal, 1999).

В последние годы существенный прогресс был достигнут в разработке вирусных векторов. Вирус полиомиелита и аденовирус оказались эффективным «средством доставки» и индукции CD4 Т-клеточного ответа и IgA В-клеточного ответа на различные антигены (Ertl, Xiang, 1996; Piedra et al., 1998). Используются также химерные вирусы, содержащие гены возбудителя (к которому необходимо создать протективный иммунитет) и способные воспроизводиться в организме человека и не причинять ему какого-либо вреда (Porter et al. 1993; 1995; Moldoveanu et al. 1995).

Еще одним перспективным направлением создания вакцин против хламидиоза является парентеральное (внутримышечное) введение нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), содержащих необходимые гены (Braciale, 1993; Fyfan et al., 1993). Эта технология апробирована при создании вакцин против ряда инфекционных заболеваний (Krishnan et al., 1995; Kuklin et al., 1997; Okada et al., Wahren, Okuda. 1997). ДНК-вакцины эффективны при внутриклеточных инфекциях, когда индукция цитотоксичного Т-клеточного ответа имеет существенное значение в защитных реакциях. ДНК-вакцины могут быть особенно полезны при наличии противопоказаний к применению живых вакцин – у больных с выраженной иммуносупрессией.

Pal и соавторы (2002) использовали в качестве адъюванта CpG олигонуклеотиды, суспензированные в гидроксиде алюминия, при иммунизации мышей MOMP *C. trachomatis* MoPn (*Chlamydomypha muridarum*). Авторам удалось получить протективный иммунитет против мышинной пневмонии.

Весьма необычным подходом является создание трансгенных растений, дающих съедобные плоды, содержащие иммуногены против инфекционных заболеваний (Thanavala et al., 1995; Ogra et al., 1999). Таким образом, возможно, в будущем вместо болезненной инъекции надо будет съесть картофелину, томат или яблоко, содержащие необходимую вакцину.

Чтобы улучшить доставку антигена в лимфатическую ткань слизистых и увеличить его взаимодействие с иммунокомпетентными клетками, применяются микрокапсулы (полилактид-когликолид). Микросферы размером менее 5 мкм хорошо поглощаются макрофагами, антиген выделяется, улучшается презентация и индуцируется иммунный ответ (Eldridge et al., 1990). Для этой цели также могут быть использованы модифицированные липосомы, нагруженные антигеном (Chaing, Weiner, 1987; Jackson et al., 1990), вирусоподобные частицы (VLP) (Labbe et al., 1991) и иммуностимулирующие комплексы (ISCOM) (Mowat et al., 1991; Classen, Osterhaus, 1992). ISCOM – структуры 30-40 нм, состоящие из гликозидов адъюванта Quil-A, холестерина, иммунизирующего антигена и фосфолипидов (Michalek et al., 1999). Для усиления иммуногенности антигенов применяются различные адъюванты – субстанции, которые сами не вызывают выраженного иммунного ответа, но усиливают ответ на другие антигены. Это холерный токсин (голотоксин, субъединица B), термолabile токсин *E. coli*, лектины и полиэлектролиты, актины, арвидин, масляная эмульсия MF59, липид А, лизофосфатидил глицерол и интерлейкин 5 (Taylor, 1995; Elson, Dertzbaugh, 1999).

Murdin и соавторы (1993) включили нейтрализующий эпитоп из варибельного сегмента VS1 MOMP *C. trachomatis*, серовар А, в вирус полиомиелита и иммунизировали кроликов. Сыворотка кроликов была способна нейтрализовать *in vitro* заразность данного штамма для обезьян при инкубации с ЭТ. В дальнейшем эта группа исследователей сконструировала полиовирусы, содержащие различные эпитопы варибельных участков (от VS1 до VS4), и иммунизировала кроликов. Сыворотка этих кроликов нейтрализовала инфекционность 8 из 12 окулוגенитальных штаммов *C. trachomatis* (Murdin et al., 1995).

Анализ многих публикаций по вакцинам против хламидийной инфекции показывает, что хотя сыворотка животных нейтрализует инфекционные способности возбудителя, у самих животных не создается достаточный протективный иммунитет, способный предотвращать новое заражение. Fan и Stephens (1997) писали по этому поводу, что высокие титры антител к отдельным пептидам хламидий в результате иммунизации могут нейтрализовать инфекционность *in vitro*, но не могут связаться с поверхностью ЭТ, чтобы элиминировать хламидии *in vivo*. Примечательно, что некоторые моноклональные антитела к хламидиям, наоборот, создают протективный иммунитет при адаптивном переносе, но не нейтрализуют способности к заражению. Cotter et al. (1995) и соавторы сообщили о двух моноклональных антителах штамма MoPn (*Chlamydomypha muridarum*), способных при пассивном переносе создавать иммунитет у мышей, но не сумевших нейтрализовать инфекционность данного штамма *in vitro*. Pal et al. (1997) создали гибридную линию, производящую IgA-антитела к конформационному эпитопу MOMP штамма MoPn и обеспечивающую протективный иммунитет при имплантации под кожу мышам.



Для того чтобы вызвать протективный иммунный ответ, эпитоп должен находиться на поверхности хламидий и быть конформационным. Все моноклональные антитела, предотвращающие токсическую гибель мышей при экспериментальном заражении, направлены к поверхностным детерминантам ЭТ, однако не все антитела, реагирующие с поверхностными антигенами хламидий, обладают протективными свойствами, например антитела к липополисахариду (Zhang et al. 1989; Zhong et al. 1993). Batteiger и соавторы (1993) иммунизировали морских свинок двумя препаратами MOMP. В одном случае MOMP частично очищался с помощью додецилсульфата натрия (SDS), а в другом – с помощью октил- $\alpha$ -D-глюкопираноза (OGP). В обоих случаях антиген вызывал высокие титры антител, выявляемые в иммуноблоттинге. Однако только антиген, приготовленный с OGP, реагировал с поверхностными антигенами элементарных телец и вызывал протективный иммунитет при заражении животных. Известно, что SDS разрушает конформацию белковых молекул, тогда как OGP сохраняет ее. Campos и соавторы (1995) иммунизировали обезьян через слизистую и парентерально OGP-очищенным MOMP *C. trachomatis* (серовар C) и добились создания частичного иммунитета. У животных развивался системный IgG- и местный IgA-ответ. Pal и соавторы (1997a) иммунизировали мышей MOMP *Chlamydophyla muridarum* (штамм MoPn) и получили аналогичные результаты при моделировании генитальной инфекции. Tap и соавторы (1990) иммунизировали овец, вводя подкожно MOMP, полученный от *C. abortus* (штамм аборта овец). После экспериментального заражения в группе иммунизированных овец у 1 из 11 обнаружен возбудитель, тогда как в контрольной группе было инфицировано 7 из 12 животных. В основной группе аборт не был, а в контрольной группе 5 овец абортировали. В последующем Herring и соавторы (1998) создали вакцину против возбудителя аборта овец (современное название *Chlamydophyla abortus*), применив генетически модифицированный вирус, поражающий растения, который экспрессировал MOMP *C. abortus*. При иммунизации овец гомогенатом этих растений число абортосов существенно сократилось. Zhang и соавторы (1997) иммунизировали мышей внутримышечно цитомегаловирусом, содержащим ген MOMP *Chlamydophyla muridarum* (штамм MoPn). У мышей развивалась гиперчувствительность замедленного типа на хламидийный антиген и вырабатывались антитела, реагирующие с ЭТ соответствующего вида хламидий. При интраназальном заражении иммунизированных мышей *C. muridarum* число хламидий, выделенных из легких, существенно уменьшилось, хотя все животные заболели легкой формой пневмонии. Аналогичный подход, осуществленный Pal и соавторами (1998), при интравагинальном заражении мышей не выявил существенного протективного иммунитета.

При создании вакцин против *Chlamydia trachomatis* на основе MOMP очень трудно обеспечить защиту против всех серотипов, вызывающих генитальные и/или окулярные инфекции. Аминокислотная последовательность варьируемых участков MOMP изменяется естественным образом в результате мутаций, что может существенно повлиять на эффективность вакцины (Dean, Stephens, 1994; Brunham et al., 1994; 2000). Lampe и соавторы (1997) обнаружили, что моноклональные антитела к определенному серовару *C. trachomatis* не распознавали некоторые штаммы, относящиеся к данному серовару. Были предприняты попытки создания вакцин на основе других компонентов, отличных от MOMP. Имеются иммуногенные поверхностные белки хламидий, в частности, богатый цистеином OmcB-протеин, массой 60 килоДальтон, и ЛПС. И хотя OmcB является сильным иммуногеном, в литературе имеется только одно сообщение о попытке вакцинации от хламидиоза данным белком. Batteiger и соавторы

(1990) иммунизировали морских свинок ОмсВ, выделенным из *Chlamydophyla caviae* (штамм GPIC) с помощью элюции из SDS-гелей после электрофореза. У животных был получен выраженный гуморальный ответ на данный белок, однако протективного иммунитета к генитальному заражению гомологичным штаммом не наблюдалось. Другой хламидийный белок, массой 75 kDa, вызывает образование нейтрализующих антител, но не был испытан на животных в качестве вакцины (Maclean et al., 1988). Единственное сообщение об иммунизации животных ЛПС хламидий с целью создания протективного иммунитета опубликовано Taylor и Prendergast (1987). Авторы иммунизировали обезьян перорально рекомбинантным хламидийным липополисахаридом и не получили достаточного IgG- и IgA-ответа. Основная и контрольная группы животных не отличались по степени восприимчивости к экспериментальному заражению. Возможно, в данном исследовании рекомбинантный ЛПС не имел необходимых эпитопов для создания протективного иммунитета. ЛПС может быть перспективным кандидатом для хламидийной вакцины, поскольку обладает видо- и родоспецифичностью. Peterson et al. (1998) охарактеризовали моноклональные антитела, направленные против эпитопов ЛПС, которые нейтрализовали активность *S. pneumoniae in vitro* и *in vivo*. Еще одной молекулой, несущей родоспецифические эпитопы, является экзогликолипид, впервые описанный Stuart и соавторами в 1987 году. Данный экзогликолипид обладает слабой иммуногенностью, однако Whittum-Hudson и соавторы (1996) получили антиидиотипические антитела, имеющие конформацию первичного эпитопа. При оральной иммунизации мышей растворимой и инкапсулированной формой данного иммуногена был получен выраженный протективный иммунитет (при экспериментальном заражении в глаз) и высокие титры антител к хламидийному гликолипиду. Другим потенциальным кандидатом для вакцины являются белки, составляющие так называемый секреторный аппарат III типа, которые экспрессированы на поверхности хламидийной клетки (Stephens et al., 1998).

Стратегия создания вакцин против хламидийных инфекций не может быть однонаправленной, поскольку различные представители семейства *Chlamydiales* вызывают различные заболевания людей и животных. Естественно, что протоколы вакцинации против трахомы, половых инфекций, пневмонии, ишемической болезни сердца будут отличаться. Подходы к вакцинации животных, требования к свойствам вакцины также существенно отличаются. Основной задачей вакцин против хламидиоза является предотвращение заражения или, по крайней мере, прерывание размножения возбудителя до начала второй фазы жизненного цикла (Rank, 1999). Как показали исследования на животных, достичь этой цели чрезвычайно трудно. Вполне вероятно, что еще труднее будет сделать это у человека. Чтобы развилась полная устойчивость к заражению, необходимо создать и поддерживать уровень местных антител в местах первичного внедрения возбудителя. Так, после перенесенной урогенитальной хламидийной инфекции системные и местные IgG-антитела определяются до 2 лет, тогда как секреторные IgA-антитела исчезают в течение 50-75 дней после заболевания. Именно спустя этот короткий промежуток времени, организм становится восприимчивым к повторному заражению.

Приемлемым условием успешности вакцины может быть также укорочение течения инфекции и предотвращения развития осложнений, связанных с длительным существованием хламидий в организме. Развитие клинических проявлений заболевания может быть остановлено специфическими антителами или клеточно-опосредованным иммунным ответом. В данном случае заражение происходит, но количество возбудителя быстро ограничивается местными

антителами и привлечением эффекторных клеток иммунной системы к месту инфицирования. Возбудитель элиминируется до реализации своих патогенных потенций. Возможность такого исхода событий была продемонстрирована в ряде исследований на мышинной модели группой под руководством de la Maza из Калифорнийского университета (г. Ирвин, Калифорния, США) (Pal et al., 1993; 1994; 1996; 2002).

Скорое создание вакцины, предотвращающей развитие восходящего воспалительного процесса при урогенитальном хламидиозе у человека, представляется вполне достижимым. Надо создать высокие уровни антител в мочеполовом тракте, которые не позволят возбудителю проникнуть во внутренние половые органы. Исходя из цикла развития хламидий и анатомических особенностей половых органов, экспериментов на животных, а также на основании клинических наблюдений установлено, что хламидиям необходимо несколько дней (а возможно и недель), чтобы проникнуть в верхние этажи урогенитального тракта и вызвать там патологические изменения. Повреждения органов обусловлены иммунопатологическими механизмами, связанными с Т-клеточным ответом, поэтому в идеале желательна элиминация возбудителя до подключения Т-клеточного иммунитета. Это можно осуществить специфическими местными антителами в результате иммунизации через слизистую оболочку. Затем вакцинация может быть дополнена парентеральной иммунизацией, способной генерировать специфический  $TH_2$ -ответ, при котором Т-лимфоциты не инфильтрируют слизистую оболочку, а направляются в периферические лимфоузлы.

Вполне возможно, что протоколы иммунизации мужчин и женщин против хламидиоза будут отличаться, поскольку в структурно-функциональном отношении слизистая оболочка их половых органов различна и экспрессирует разные цитокины, что предполагает различия в воспалительных и иммунологических реакциях. По-видимому, женщины более склонны к иммунопатологическому повреждению репродуктивных органов, поскольку в отличие от мужчин, прямая связь между хламидиозом и женским бесплодием доказана в многочисленных исследованиях. В опытах Rank и соавторов (1990) мужские и женские особи морской свинки реагировали по-разному на подкожную иммунизацию ультрафиолет-инактивированными хламидиями. У самок при повторном заражении развивался сальпингит, а у самцов имел место протективный иммунитет.

## **ГЛАВА 11. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

Лабораторные исследования являются важнейшим компонентом диагностики хламидийной инфекции. С их помощью устанавливают этиологический диагноз, определяют тактику и оценивают эффективность этиотропной терапии, осуществляют научно обоснованный эпидемиологический надзор. Для современных методов диагностики характерны разная степень информативности и доступности для лабораторных служб различного уровня. В лабораторной диагностике урогенитальных хламидиозов используют общие принципы дифференциальной диагностики воспалительных заболеваний мочеполовых органов, передающихся половым путем, а также целенаправленные методы выявления возбудителя в пораженных клетках и реакциях макроорганизма, возникающих при инфицировании хламидиями. Ввиду сходства клинических проявлений воспалительных процессов в мочеполовой системе различной этиологии,

а также частоты смешанных инфекций той же локализации, в первую очередь необходимо исключить гонорею и установить характер микрофлоры в очагах поражения. Исследование мочи (клинический анализ, двухстаканная проба) и микроскопия мазков выделений и секретов позволяют одновременно выявить характер лейкоцитарной реакции и дифференцировать ряд патологических и физиологических состояний. По показаниям также применяют и другие общепринятые лабораторные клинические исследования, необходимые для установления сопутствующей патологии и выбора оптимальных методов лечения.

В настоящее время с помощью методов лабораторной диагностики урогенитальной хламидийной инфекции проводят индикацию хламидий непосредственно в пораженных клетках, выделение хламидий, обнаружение хламидийных антигенов и антител, а также нуклеиновых кислот хламидий. В данном разделе уделено внимание как традиционным, но не утратившим своего значения методам лабораторной диагностики хламидийных инфекций, так и новым перспективным методам.

### 11.1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

Хламидии не являются высококонтагиозными патогенными микроорганизмами, представляющими особую опасность. Однако пробы, в которой содержатся хламидии, и все материалы, подвергаемые изучению, нужно рассматривать в качестве источников заразного материала и использовать при тщательном соблюдении режима работы бактериологических и вирусологических лабораторий. Следует категорически исключить возможность загрязнения исследуемым материалом рук лабораторных работников, его попадание в рот, нос или глаза (Шаткин, Мавров, 1983; Salkin, Gershon, 1992).

### 11.2. СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ

Лабораторная диагностика начинается со взятия образцов. Надежность метода диагностики определяется не только качеством используемой тест-системы, но также и качеством забора образцов. Так, отсутствие клеток в соскобах слизистых половых органов сильно снижает чувствительность и специфичность методов обнаружения хламидий (Kellogg et al., 1990, 1991; Howard et al., 1991). Способ взятия клинического материала определяется методом детекции хламидий. Так, для диагностического выделения хламидий в культуре клеток наилучшие результаты дают ватные тампоны с алюминиевым стержнем. Деревянные и пластиковые стержни токсичны для культуры клеток (Mahony, Chernesky, 1985). Температура и длительность хранения клинических образцов также зависит от метода определения (комнатная температура, в холодильнике [при +4°C] или в замороженном состоянии). Необходимо строго следовать инструкции, если определение производится с помощью готового диагностического набора (тест-системы). Для транспортировки образцов в лабораторию они помещаются в транспортную буферную среду, наиболее подходящую для данного метода. Образцы для выявления антигенов и нуклеиновых кислот менее требовательны к транспортировке и хранению, поскольку нет необходимости сохранить жизнеспособность возбудителя.

В ряде исследований показано, что случайная и биологическая вариация результатов при взятии одних и тех же образцов у одного и того же больного может достигать до 20% (Taylor et al., 1991). Поэтому, по возможности, необходимо использовать повторные анализы, брать



анализы из разных мест, использовать различные методы лабораторной диагностики (Возианов, 2002; Мавров, 2002; Lefebvre et al., 1988; Jones et al., 1986; Manuel et al., 1987; Dunlop et al., 1985; Thomas et al., 1985; Singal et al., 1986).

### **11.2.1. Соскобы слизистой оболочки мочеиспускательного канала, шейки матки, конъюнктивы и других органов**

Берут ложкой Фолькмана, малой ушной ложкой или аналогичными инструментами со слегка затупленными краями, соблюдая правила асептики и антисептики. Многоцветные инструменты стерилизуют над пламенем или в 70-градусном этаноле. По возможности следует использовать одноразовые инструменты (цитологические щеточки, ватные тампоны) (Ciotti et al., 1988; Moncada et al., 1989; Weiland et al., 1988; Grossman et al., 1993). Наружные половые органы дезинфицируют, выделения удаляют тампонами или с помощью аспираторов. При повышенной чувствительности слизистую оболочку предварительно анестезируют инстилляцией в мочеиспускательный канал 1-2 мл 0,5% раствора дикаина. Соскобы делают из глубины канала (4-6 см), со всех четырех квадрантов. Соскобы шейки матки берут после удаления слизистой пробки из глубины ее канала, а также из влажной части шейки матки. При необходимости материал получают и с других доступных участков половых органов (влагалищные складки, парауретральные протоки и др.). Соскобы берут осторожно, при легком надавливании. В материале должно быть минимальное количество выделений и примеси крови (Loefelhoelz et al., 2001; Auguenot et al., 2001; Inhorn et al., 2001).

При экстрагенитальных хламидиозах соскобный материал получают аналогичным способом. Соскобы конъюнктивы берут затупленным глазным скальпелем после анестезии 0,5% раствором дикаина. Для диагностики трахомы лучше брать соскоб с конъюнктивы верхнего века, а для диагностики паратрахомы – с нижнего (Ridgway, Taylor-Robinson, 1991). Соскобы прямой кишки содержат значительную бактериальную обсемененность, что может снижать чувствительность при диагностическом выделении хламидий в культуре клеток (Romपालо et al., 1987). Для таких образцов лучше использовать методы выявления антигена и полимеразную цепную реакцию. Соскобы носоглотки и мазки носового отделяемого могут иметь ценность при диагностике хламидиоза у детей (Paisley et al., 1986; Rapoza et al., 1986). Соскобный материал распределяют тонким слоем на 1/4-1/3 поверхности обезжиренного предметного стекла, подсушивают на воздухе и быстро фиксируют соответственно методу окраски. Для окраски по методу Романовского-Гимзы препараты фиксируют 10 мин абсолютным метиловым спиртом или смесью Никифорова (этиловый спирт + эфир, 1:1) и хранят при комнатной температуре. Фиксацию препаратов для окраски флуоресцирующими антителами или иммунопероксидазным методом проводят абсолютным холодным (+4°C) ацетоном (х.ч.) в течение 5-10 мин. Допускается кратковременное (несколько дней, при +4°C) и длительное (месяцы, при -60°C) хранение фиксированных препаратов, без повторного замораживания и оттаивания (Barnes, 1989; Kellogg et al., 1991, 1992).

### **11.2.2. Исследование образцов мочи**

Первой работой, где показана возможность определения антигена хламидий в моче с диагностической целью была публикация G. Ruijs и соавторов (Ruijs et al., 1984). Позднее O. Saul и коллеги показали, что исследование мочи может быть альтернативой генитальным соскобам

при выявлении антигена хламидий у пациентов с помощью иммуноферментного и иммунофлуоресцентного методов (Caul et al., 1988; Paul & Caul, 1990). Чувствительность и специфичность современных методов молекулярной диагностики позволяет шире использовать образцы мочи, как более удобный и неинвазивный способ забора материала для диагностики на хламидиоз (Coutlee et al., 2000). Забор мочи не требует квалифицированного персонала, и можно обойтись без осмотра (что важно при лабораторном скрининге). Необходимость осмотра гениталий для человека, считающего себя здоровым, часто является тягостным. Методы выявления антигенов и нуклеиновых кислот хламидий могут применяться к образцам мочи при соответствующей обработке (Chernesky et al., 1990; Svensson et al., 1991; Sellers et al., 1991; Mahony et al., 1992; Jang et al., 1992; Schachter et al., 1995). Рекомендовано собирать первую порцию мочи после 4-5-часового воздержания (Crowley et al., 1992). У пациентов с гнойными выделениями из уретры при определении антигенов хламидий иммуноферментным методом следует брать не утреннюю мочу, а после второго мочеиспускания (Sellors et al., 1993). Для последующего иммуноферментного анализа 10-20 мл мочи центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин, затем осадок ресуспендируют в соответствующем буферном растворе (в зависимости от тест-системы). У мужчин хламидии в моче находят чаще, чем у женщин (Chernesky et al., 1990; Paul et al., 1990; Schwebke et al., 1991; Leonard et al., 1992; Hay et al., 1991, 1993; Sanders et al., 1994). При получении положительного результата на обнаружение хламидий в моче желательно подтвердить диагноз обнаружением в соскобах слизистой оболочки половых органов (Anderson et al., 1993).

### 11.2.3. Исследование образцов эякулята

Сперма может быть использована для диагностики хламидиоза. Образцы эякулята для исследования берут после разжижения (Thorsen et al., 1991; Chattopadhyay, Honeycombe, 1990; Van den Brule et al., 1993; Witkin et al., 1993). Сперма содержит вещества (спермин, ионы цинка), которые ингибируют рост хламидий в культуре клеток. Кроме того, мазки спермы плохо фиксируются на стекле при приготовлении препаратов для иммунофлуоресценции (Mardh et al., 1980; Greenberg et al., 1985; Sugarman, Erps, 1985). Поэтому образцы спермы лучше исследовать с помощью полимеразной цепной реакции. При необходимости инокуляции в культуру клеток сперму разводят в 100-1000 раз.

### 11.2.4. Исследование синовиальной жидкости и биоптатов

Синовиальная жидкость и биоптаты различных тканей могут служить материалом для этиологической диагностики хламидиоза с помощью ИФА, ПЦР и РНК-гибридизации (Keat et al., 1987; Hughes et al., 1991; Poole et al., 1992; Taylor-Robinson et al., 1992; Rahman et al., 1992; Hammer et al., 1992).

## 11.3. ВЫЯВЛЕНИЕ ХЛАМИДИЙ

Пробы доступной слизистой оболочки (мочеиспускательный канал, шейка матки, конъюнктивы, носовая часть глотки и др.) берут в виде соскобов или тем же способом с помощью уретральных и эндоцервикальных стерильных тампонов, приготовленных по типу носоглоточных тампонов на деревянном или металлическом держателе, хранящихся в стерильных пробирках. Предпочтительно использование нетоксичных тампонов из натуральной хлопковой ваты.

Полученный материал тщательно ресуспендируют над пламенем горелки, обычно в 1 мл (при выделении в культуре клеток) или в 2-3 мл (при выделении в куриных эмбрионах) охлажденной стерильной транспортной среды с антибиотиками (помещенной в небольшие, 5 мл флаконы из нейтрального стекла или нетоксичного полимерного материала с мелкими стеклянными бусами) и пересылают (при температуре +4°C) в лабораторию. Заражение культуры клеток и (или) развивающихся куриных эмбрионов проводят в минимально короткие сроки – после 3-часовой экспозиции (+4°C) материала с антибиотиками, а при отсутствии такой возможности материал замораживается при температуре от -60°C до -70°C или при -180°C (жидкий азот). В качестве транспортных сред используют среду 199 с 5% фетальной сывороткой крупного рогатого скота или сахарозо-фосфатный буферный раствор, pH 7,0-7,1 (среда SP-2-SP) с добавлением 5-10% той же сыворотки. Сахарозо-фосфатный буферный раствор 0,2 М (среда 2 SP) готовят при помощи трех растворов: 68,46 г сахарозы растворяют в 50 мл дистиллированной воды; 2,088 г безводной соли  $K_2HPO_4$  растворяют в 60 мл дистиллированной воды; 1,088 г безводной соли  $K_2HPO_4$  растворяют в 40 мл дистиллированной воды. Три названных раствора сливают, доводят объем дистиллированной водой до 1 л и добавляют HCl до pH 7,0-7,1. Среду 2-SP стерилизуют во флаконах автоклавированием при 115°C не менее 15 мин, хранят при температуре +4°C. В состав транспортной среды вводят антибиотики: стрептомицин (100-200 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл) и канамицин (100 мкг/мл) или гентамицин (2 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл) и ванкомицин (100 мкг/мл) для подавления сопутствующей бактериальной флоры. Материалы, полученные при диагностических пункциях и биопсиях хирургическим путем (при сальпингитах, пельвиоперитонитах, эпидидимитах, орхитах, артритях и др.), пробы патологоанатомического материала (при пневмониях новорожденных и др.), а также секреты половых желез, мочу и смывы собирают в стерильные флаконы и подвергают вышеописанной обработке и хранению. Для заражения культур клеток или куриных эмбрионов используют 10-40% взвеси изучаемых тканей, приготовленные на тех же средах, или при выделении хламидий в куриных эмбрионах – на мясопептонном бульоне (pH 7,2-7,4). Все материалы, используемые в пассажах, могут храниться в течение суток при температуре +4°C (Шаткин, Мавров, 1983; Taylor-Robinson, Thomas, 1991; Ridgway, Taylor-Robinson, 1991). Лиофилизация клинических образцов для выделения в культуре клеток и в куриных эмбрионах не рекомендуется, поскольку только 5% из них сохраняют инфекционность (Theunissen et al., 1993).

### 11.3.1. Материал для определения хламидийных антител

Антитела выявляют в сыворотках и секретах. Кровь берут венепункцией, натошак, сыворотку собирают после ретракции сгустка до наступления гемолиза. Сыворотка транспортируется в охлажденном состоянии (+4°C) или замораживается (после ампулирования) и хранится при температуре -20°C. Материалом для исследования служит также капиллярная кровь, собранная на фильтровальную бумагу, в объеме, заранее определенном зоной насыщения. Секреты половых желез собирают либо в нативном виде, либо с помощью полосок фильтровальной бумаги (5x20 мм). Капли секрета или полоски бумаги после насыщения помещают в отдельные сосуды (5 мл), содержащие 0,2 мл фосфатного буферного раствора с pH 7,2. Материал транспортируют и сохраняют так же, как и сыворотки. Первичное разведение материала учитывают при титровании антител.

### 11.3.2. Индикация хламидий непосредственно в пораженных клетках

Этот метод предусматривает выявление цитоплазматических включений, образуемых хламидиями, при окрашивании морфологических структур микроорганизма. Материалом служат соскобы с доступной слизистой оболочки мочеполювых (мочеиспускательный канал,

шейка матки, канал шейки матки и др.) и других органов (конъюнктивы, прямая кишка и др.) при экстрагенитальных формах хламидийной инфекции. Реже исследуют мазки-отпечатки выделений, секретов и тканей, биопсированных при хирургических вмешательствах. Обнаружение цитоплазматических включений хламидий в эпителиальных клетках препаратов, окрашенных по методу Романовского-Гимзы, является классическим методом диагностики хламидиозов.

#### **Окраска по методу Романовского-Гимзы**

Используют готовый основной раствор красителей «азур-эозин по Романовскому» или приготовленный из сухого порошка на 1/15 М-фосфатном буферном растворе (ФБР), pH 7,2. ФБР готовят при помощи двух растворов: первый – 1/15 М- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – получают растворением 9,5 г безводной соли в 1 л дистиллированной воды; второй – 1/15 М- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – получают растворением 9,2 г соли в 1 л дистиллированной воды. Для приготовления 1/15 М-ФБР (pH 7,2) смешивают 72 мл первого раствора, 28 мл второго раствора и 900 мл дистиллированной воды. Для приготовления основного раствора красителя 0,1 г сухого порошка растворяют в 50 мл глицерина (+60°C, 2 ч), добавляют 50 мл абсолютного метанола (без примесей ацетона), тщательно перемешивают, оставляют на ночь для созревания, фильтруют. Основной раствор красителя хранят в плотно закрытых сосудах из нейтрального стекла при комнатной температуре. Рабочий раствор красителя готовят из расчета: 1 часть основного раствора на 10-20 частей 1/15 М-ФБР (pH 7,2) или дистиллированной воды (обязательно при нейтральном pH). Препараты красят свежеприготовленным рабочим раствором 30-45 мин в вертикальном положении – во избежание адсорбции краски на стекле. Окрашенный препарат промывают водой, дифференцируют под визуальным контролем (5-10 с) подкисленным этанолом (3-5 капель ледяной уксусной кислоты на 15-20 мл спирта) или смесь абсолютного этанола и гвоздичного масла (10:1), вновь промывают, подсушивают на воздухе и изучают в световом микроскопе. Препараты для общей оценки предварительно просматривают при большом увеличении микроскопа (об. 40, ок. 7), а затем исследуют при масляной иммерсии (об. 90 или x100, ок. 7). Учитывая качественные отличия красителей, оптимальную концентрацию свежеприготовленного рабочего раствора следует подбирать опытным путем по окраске ядер (красные зерна хроматина), цитоплазмы и ядрышек (светло-голубые) эпителиальных клеток.

При использовании световой микроскопии в окрашенном препарате по Романовскому-Гимза можно обнаружить тельца хламидий. Элементарные тельца – мелкие образования округлой формы (0,15-0,3 мкм), окрашенные в розовый или красноватый цвет и расположенные преимущественно внеклеточно. Ретикулярные тельца – более крупные образования (0,5-1,5 мкм). Они расположены внутриклеточно, в виде скоплений вокруг ядра эпителиальной клетки, и окрашены в голубой или синий цвет. Метод не утратил своего значения из-за доступности для любой лаборатории, простоты выполнения и невысокой стоимости. Кроме того, одновременно с поиском цитоплазматических клеток-включений, учитывается количество лейкоцитов, как показатель воспаления и наличия сопутствующей флоры.

В материале, собранном путем соскоба со слизистой уретры или цервикального канала, возможны выявление и дифференцировка хламидий на ЭТ и РТ по окраске их цитоплазмы обычным световым иммерсионным микроскопом при общем увеличении от 900 до 1500. Однако диагностическая значимость этого метода невелика. Чувствительность цитологического метода ограничена лишь 10-40% при достаточной квалификации лаборанта и больших временных затратах.

Цитоплазматические включения представляют собой компактные или рыхло расположенные зернистые массы, содержащие морфологические структуры возбудителя на разных



этапах его размножения. Они часто определяются вблизи ядра, нередко смещают его к периферии клетки, имеют разнообразную форму, отличаясь по цвету и внутренней структуре от ядра и цитоплазмы. Мелкие ранние включения, содержащие крупные тельца диаметром 0,5-1,2 мкм, имеют сине-фиолетовую окраску, крупные включения преимущественно мелкими зрелыми структурами возбудителя – розово-красные. Часто в одной клетке выявляются включения хламидий разной зрелости и различной плотности расположения. Нередко при рыхлом расположении морфологических структур микроорганизма обнаруживается содержащая их вакуоль.

Во избежание диагностических ошибок цитоплазматические включения следует четко дифференцировать с другими структурными образованиями, которые могут встречаться в исследуемых препаратах:

- пигментные гранулы черного или темно-зеленого цвета в цитоплазме в виде зернистых масс;
- зернистые структуры травмированного ядра, сходные по цвету, форме и размерам с ядерным материалом неповрежденных клеток;
- зерна муцина, окрашивающиеся в красный или синий цвет, располагающиеся в цитоплазме отдельно друг от друга;
- эозинофильные зерна разрушенных эозинофилов, располагающиеся на поверхности эпителиальных клеток;
- диффузная эозинофильная многомерная зернистость цитоплазмы;
- клеточный детрит, адсорбированный на поверхности или фагоцитированный эпителиальной клеткой;
- сопутствующая микрофлора, включающая часто гонококки, стрептококки, пневмококки, дифтероида и другие микроорганизмы, которые обычно выявляются не только на поверхности эпителиальных клеток, но и на других участках препарата.

Выявление цитоплазматических включений в препаратах из соскобов позволяет в целом диагностировать около 10-15% случаев хламидийной инфекции, протекающей как манифестно, так и бессимптомно (Шаткин, Мавров, 1983; Мавров, 1994; Мавров 2002).

### 11.3.3. Выявление антигенов хламидий

Для диагностики урогенитальной хламидийной инфекции используют метод флуоресцирующих антител, который широко применяется при диагностике многих вирусных и бактериальных инфекций. Сущность его заключается в соединении антител, меченных флюорохромом, со специфическим антигеном и наблюдении продукта реакции под люминесцентным микроскопом. Для выявления антигенов хламидий используются также различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА).

#### *Метод флуоресцирующих антител*

*Для разведения реагентов и промывки препаратов используют фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБР), pH 7,2. ФСБР готовят последовательным растворением 6,8 г NaCl, 0,63 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 1,48 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> в 1 л дистиллированной воды. При монтировании препаратов используют забуференный глицерин (1 часть ФСБР и 9 частей глицерина).*

### **Прямой иммунофлуоресцентный метод**

На фиксированный холодным ацетоном, промытый ФСБР и подсушенный на воздухе препарат наносят 1-2 капли *ex tempore* приготовленной окрашивающей смеси: флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) и бычий альбумин, меченный родамином, взятые в равных объемах и удвоенных рабочих разведениях (например, при рабочем разведении 1:64, используют разведение реагента 1:32). Препарат помещают во влажную камеру при температуре +37°C на 30-40 мин, затем смесь удаляют и препарат тщательно промывают в ФСБР 3 раза по 5-10 мин на магнитной мешалке. На препарат наносят забуференный глицерин, накладывают покровное стекло и сразу же исследуют под люминесцентным микроскопом при комбинации светофильтров и масляной иммерсии (об. x90). Специфичность показателей, получаемых с помощью метода ПИФ, подтверждается следующими контролями, предварительно устанавливаемыми для каждой серии флуоресцирующей хламидийной антисыворотки:

1. тест блокировки – после обработки препарата немеченой ФИТЦ иммунной (хламидийной) антисывороткой, флуоресцирующая (хламидийная) иммунная антисыворотка (или моноклональные антитела) не должна давать заметного окрашивания хламидийного антигена (цитоплазматических включений);
2. тест нейтрализации – после инкубации со специфическим (хламидийным) антигеном флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) не должна давать заметного окрашивания хламидийного антигена (цитоплазматических включений);
3. нормальная, неиммунная меченная ФИТЦ сыворотка того же вида животного-продуцента иммунной хламидийной антисыворотки не окрашивает хламидийный антиген (цитоплазматические включения);
4. в контрольных соскобных препаратах, заведомо не содержащих цитоплазматических включений хламидий, флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела) не окрашивает цитоплазму эпителиальных клеток.

1-й, 2-й и 3-й контроли обычно проводят при использовании монослойных препаратов инфицированной культуры клеток, 4-й контроль – на соскобных препаратах исследуемой ткани.

### **Непрямой иммунофлуоресцентный метод**

На подготовленный препарат наносят 1-2 капли сыворотки (кролика, овцы, человека и др.), содержащей хламидийные антитела или раствор моноклональных антител. Препарат помещают во влажную камеру на 30-40 мин при температуре +37°C. Затем сыворотку (антитела) удаляют, препарат тщательно промывают ФСБР и на него наносят смесь антивидовой флуоресцирующей сыворотки (в зависимости от видовой принадлежности использовавшейся сыворотки или моноклональных антител) и бычьего альбумина, меченного родамином, взятых в равных объемах и удвоенных рабочих разведениях. Препарат вновь помещают во влажную камеру при +37°C на 30-40 мин, после чего его промывают, монтируют и исследуют аналогично указанному для прямого метода. Специфичность показателей, получаемых методом НИФ, подтверждается следующими контролями:

- при замене сыворотки, содержащей хламидийные антитела, нормальной сывороткой, полученной от того же вида донора, хламидийный антиген (цитоплазматические включения) не окрашивается;
- в контрольных соскобных препаратах, заведомо не содержащих цитоплазматических включений хламидий, цитоплазма эпителиальных клеток не окрашивается.

Обнаружение цитоплазматических включений хламидий в эпителиальных клетках препаратов из соскобов с помощью флуоресцирующих антител – высокочувствительный и специфический метод диагностики урогенитальной хламидийной инфекции. Метод флуоресцирующих

антител для выявления антигенов хламидий в цитоплазматических включениях можно использовать в прямой и непрямой модификации. При люминесцентной микроскопии антигены хламидий выявляются на темном или оранжевом (при контрастировании родамином) фоне цитоплазмы эпителиальных клеток в виде цитоплазматических включений, флуоресцирующих ярко-зеленым или желтовато-зеленым цветом. Флуоресцирующие включения могут иметь гомогенную, зернистую или смешанную структуру. Специфическая флуоресценция может соответствовать или не соответствовать топографии цитоплазматических включений, а также выявляться в клетках, в которых не удастся обнаружить морфологические структуры хламидий при окраске по Романовскому-Гимзе. Большая диагностическая информативность метода флуоресцирующих антител заключается в том, что с его помощью выявляются не только корпускулярные, но и растворимые антигены хламидий, его показатели меньше зависят от изменения тинкториальных свойств хламидий в процессе инфекции, особенно при этиотропной терапии и, наконец, в том, что светящиеся антигены хламидий выявляются легко и быстро. Метод флуоресцирующих антител позволяет обнаружить элементарные тельца хламидий с чувствительностью от 49 до 91%. Однако клинический опыт показал его недостатки: низкую чувствительность при выявлении хламидий у мужчин; ложноотрицательные результаты, которые могут быть связаны с малым количеством эпителиоцитов в пробе, большим числом лейкоцитов и слизи. Ложноположительные результаты могут быть связаны с наличием антигенов, перекрестно реагирующих с другими бактериями.

Получение моноклональных антител, меченных флуоресцеином, позволило повысить порог чувствительности обнаружения хламидий в люминесцентном микроскопе. Первые оптимистичные результаты, полученные в идеальных лабораторных условиях больших клиник и на популяции больных с достаточным количеством антигена хламидий в отделяемом, давали свыше 95% чувствительности и специфичности в сравнении с культурой клеток (Tam et al., 1984; Uyeda et al., 1984; Машкиллейсон и Гомберг, 1986; Гомберг и соавт. 1986). Однако впоследствии, когда этот метод был применен для выявления хламидиоза в популяциях с низким распространением хламидиоза и у бессимптомных лиц с персистентной инфекцией, показатели чувствительности не превышали 75%, а специфичности – 65%. (Белозоров, 1999; Возианов и соавт., 2002).

Обычно в диагностических системах применяются видоспецифические моноклональные антитела к МOMP и «родоспецифические» (точнее, специфические к семейству *Chlamydiaceae*) антитела к ЛПС клеточной стенки хламидий. Моноклональные антитела к различным иммунодетерминантам отличаются по характеру флуоресценции, поскольку локализуются на разных структурных компонентах хламидий (Cles et al., 1988). В клинических исследованиях как родоспецифические, так и видоспецифические антитела показывают хорошие результаты при диагностике урогенитальной хламидийной инфекции (Phillips et al., 1988; Tilton et al., 1988; Roblin et al., 1989; Ramirez et al., 1990). Несмотря на высокую специфичность моноклональных антител, могут наблюдаться перекрестные реакции в случае значительного сходства иммунных детерминантов с другими микроорганизмами – *Covsdria ruminantium*, *Salmonella minnesota*, *Acinetobacter spp.* вирус *Parainfluenza 2* (Nurminen et al., 1983; Fox et al., 1989; Jongejan et al., 1991). Может также наблюдаться неспецифическое связывание через Fc-фрагменты.

Метод флуоресцирующих антител неприменим для диагностики персистентной хламидийной инфекции, поскольку базируется на обнаружении антигенных детерминантов МOMP и ЛПС на поверхности хламидий. При персистенции продукция МOMP и ЛПС блокирована,

в то время как ЭТ выявляются только в 8,2% случаев. В данном случае могут работать тест-системы, основанные на выявлении белка теплового шока (Hsp60) и антиидиотипических моноклональных антител (Laferriere et al., 1993).

Метод флуоресцирующих антител субъективен, и учет результатов требует высокой квалификации лаборанта. Присутствие большого числа лейкоцитов, слизи, эритроцитов значительно затрудняет постановку правильного диагноза. Диагностическая ценность метода ниже при исследовании популяции с низкой распространенностью хламидиоза и у бессимптомных пациентов. Чувствительность может колебаться от 50% до 100% у женщин и от 56% до 99% у мужчин (Kellogg, 1989). Считается, что при наличии в образце менее 10 ЭТ хламидий результат может быть ложноотрицательным (Hannover-Larsen et al., 1986; Mabeu, Booth-Mason 1986). Могут быть также и ложноположительные результаты. По данным ряда исследований, у 36% пациентов положительный результат, полученный иммунофлуоресцентным методом, не был подтвержден при повторных исследованиях. Упомянутая выше высокая чувствительность и специфичность метода может быть достигнута лишь в тех случаях, когда результаты флуоресценции интерпретируются действительно опытным лаборантом (Gann et al., 1990; Ващенко, 2002; Мавров, 2002).

#### 11.3.4. Иммуноферментный анализ антигена хламидий

Первым вариантом иммуноферментного анализа для определения антигена хламидий непосредственно в пораженных клетках был иммунопероксидазный метод *in situ* (Шаткин и соавт., 1976, 1976; Попов, и соавт. 1976; Панкратова и соавт. 1979, 1982; Панкратова, 1881). Однако данный метод не получил широкого распространения в диагностике хламидийных инфекций, поскольку уступал по чувствительности методу флуоресцирующих антител и был относительно трудоемок.

В начале восьмидесятых годов появились тест-системы для выявления антигена хламидий на основе твердофазного ИФА с применением поликлональных антисывороток – Chlamydiazyme® (Abbott), Microtrak EIA (Syva), Pathfinder® EIA (Sanofi/Kallestad). Первые клинические испытания показали чувствительность 60-80%, в зависимости от характера исследуемого материала (Jones et al., 1984; Howard et al., 1986; Taylor-Robinson et al., 1987). Taylor-Robinson и соавторы (1987) сравнивали твердофазный ИФА с иммунофлуоресценцией для выявления антигена *Chlamydia trachomatis* в соскобах мочеполовых органов (в популяции пациентов, обратившихся за помощью в клинику инфекций, передающихся половым путем). Прогностическая ценность положительного результата была 63%, а отрицательного результата – 90%. Специфичность – 89%.

Одна из последних тест-систем для выявления антигена хламидий с помощью ИФА – IDEIA® PCE (Dako). В системе используются моноклональные антитела к высокоспецифичному эпитопу ЛПС хламидий и полимер-конъюгированная система усиления сигнала. К молекуле декстрана ковалентно присоединены моноклональные антитела и фермент щелочная фосфатаза. В отличие от ИФА-систем раннего поколения, каждый иммунный комплекс (хламидийный антиген + антитело) связывает не одну, а множество молекул фермента, что усиливает чувствительность и позволяет регистрировать буквально единичные молекулы антигена. Этот метод, положивший начало новому этапу в развитии иммуноферментного анализа, был разработан Stanley, Johannsson и Self в 1985 году (Stanley et al., 1985). Чувствительность и специфичность теста IDEIA® PCE для диагностики



урогенитального хламидиоза у мужчин и женщин приближается к системе AMPLICOR на основе ПЦР и LCx Chlamydia на основе ЛЦР (Tanaka et al., 1998; 2000; Okadome et al., 1999; Chernesky et al., 2001).

При применении моноклональных антител к хламидийным ЛПС тест-системы позволяли выявлять все серовары *C. trachomatis*, а также *C. pneumoniae* и *C. psittaci* (Wagenvoort et al., 1989; Sillis, White, 1990; Sillis et al., 1992). В дальнейшем метод был усовершенствован, что позволило добиться высокой чувствительности и специфичности, в частности, на основе визуализации реакции антиген-антитело с помощью хемилюминесценции (Neman-Simha et al., 1991; Clark et al., 1992, Clark et al., 1993). При постановке ИФА для выявления антигена хламидий могут иметь место биологически ложноположительные результаты, связанные с перекрестной иммунологической реакцией с ЛПС грамотрицательных бактерий и дрожжеподобных грибов (Saikku et al., 1986; Goudswaard et al., 1989; Kellogg et al., 1992). Снижение специфичности ИФА связано с выявлением *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, стрептококков группы В (Taylor-Robinson et al., 1987; Demaio et al., 1991). Чувствительность может быть существенно повышена применением подтверждающих тестов с использованием блокирующих антител. (Moncada et al., 1990; Newhall et al., 1999). В настоящее время при применении методов амплификации в качестве референс-стандарта чувствительность иммунологических методов выявления антигена хламидий у больных с урогенитальной патологией колеблется около 60% (Van Dyck et al., 2001).

В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины был разработан вариант твердофазного ИФА, позволяющий определять антиген *C. trachomatis* в клинических образцах (Мавров, 1990).

#### **Методика проведения твердофазного ИФА для выявления антигена *C. trachomatis* в клинических образцах**

Антигены хламидий готовят из желточных мешков куриных эмбрионов, зараженных *C. trachomatis*, штамм BU-434, серотип L2. Желточные мешки гомогенизируют, центрифугируют, удаляют жир, грубый детрит и обрабатывают на ультразвуковом диспергаторе. Элементарные тельца хламидий выделяют центрифугированием в 30% верографине по стандартной методике (см. выше). Подсчет телец хламидий в приготовленной взвеси производят прямым методом микроиммунофлуоресценции и под электронным микроскопом. В 1 мкг белка взвеси должно находиться не менее 10<sup>6</sup> телец хламидий. Поликлональные антисыворотки против хламидий получают при иммунизации кроликов и свиней в полном адьюванте Фрейнда. Антисыворотки адсорбируют взвесью гомогенизированных желточных мешков незараженных куриных эмбрионов. Полимеризацию осуществляют с помощью глутарового альдегида (Терник, Аврамеас 1979). Антисыворотки проверяют в микрореакции непрямой иммунофлуоресценции. Сыворотки против антител кролика и свиньи РАМН производства НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи конъюгируют по стандартной методике с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). Конъюгаты антител с пероксидазой готовят из антисывороток против иммуноглобулинов кролика и свиньи. Высокоочищенную пероксидазу хрена (RZ=3,4) присоединяют периодатным методом с некоторыми изменениями (Белозоров и соавт., 1985).

Материал со слизистой оболочки уретры, канала шейки матки, прямой кишки берут по стандартной методике и вносят в пробирку с транспортной средой. Не позже чем через 1 ч материал помещают в холодильник при температуре -25°C. В качестве твердой фазы используют полистироловые 96-ячеечные планшеты с плоским дном. В ячейки вносят γ-глобулины свиной сыворотки против хламидий. Неспецифическую сорбцию проводят 16 ч при +4°C. Концентрация суммарного белка должна составлять 15 мкг/мл

в 0,2% (0,05 M) растворе карбонатно-бикарбонатного буфера (рН 9,6). На этом и последующих этапах ИФА все реагенты вносят в объеме 0,1 мл. После инкубации растворы удаляют отсосом. Планшеты после каждого этапа ИФА промывают фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБР), содержащим 0,05% твин-80. После неспецифической сорбции оставшиеся свободные места связывания 2 ч блокируют бычьим сывороточным альбумином (БСА) в ФСБР при 37°C во влажной камере. Затем в лунки вносят исследуемые пробы. Транспортную среду с клиническим материалом разводят в 5 раз, причем при проведении реакций антиген-антитело все реагенты разводят в ФСБР с 0,1% БСА. Эту и последующие реакции антиген-антитело осуществляют в течение 1 ч при 37°C во влажной камере. Хламидии определяют непрямой методом: вначале инкубируют с разведенной в 100 раз кроличьей антисывороткой против хламидий, а затем с конъюгатом – против иммуноглобулинов кролика. Оптимальные разведения конъюгата подбирают опытным путем. Субстратно-буферную смесь готовят непосредственно перед проведением пероксидазной реакции. Ее разливают в лунки многоканальной аутопипеткой. Через 15-90 мин, в зависимости от скорости появления окраски, учитывается пероксидазная реакция.

Контроль во время постановки ИФА осуществляется на всех этапах. Для каждого исследуемого образца используют 2 контрольные лунки, покрытые вместо антихламидийных антител бычьим сывороточным альбумином. Одновременно ставят положительный и отрицательный контроли. В качестве положительного контроля используют очищенный хламидийный антиген, который добавляют в транспортную среду до 20 мкг/мл, а отрицательного – транспортную среду. Для контроля субстратно-буферной смеси на ферментативное окисление в 1-2 лунки конъюгаты не добавляют. Оптическую плотность определяют на фотометре. Результаты выражают в виде разности средней оптической плотности между опытными и контрольными лунками, в которые вносили данный образец. Положительным считают результат, на 0,150 единицы оптической плотности (или более) превышающий средний результат отрицательного контроля. Результаты ИФА учитывают только в том случае, если средний результат положительного контроля превышает средний результат отрицательного контроля более чем на 0,250 единиц оптической плотности. Воспроизводимость ИФА определяют, вычисляя среднее квадратичное отклонение и отклонение от средней арифметической результатов ИФА при многократном повторном анализе образцов.

С помощью твердофазного ИФА хламидиоз диагностируется значительно чаще, чем при изучении соскобных препаратов, окрашенных по методу Романовского–Гимзы. Данная методика выявления антигена хламидий при постановке ИФА у больных с воспалительными заболеваниями мочеполовых органов обладает достаточной информативностью. Быстрое получение результата, возможность одновременно анализировать большое количество проб и относительная простота выполнения позволяют рекомендовать эту методику для диагностики урогенитального хламидиоза. Несмотря на все более широкое распространение тестов, основанных на амплификации нуклеиновых последовательностей хламидий, ИФА антигена *C. trachomatis* не утратили своего значения и будут еще какое-то время применяться для диагностических целей. Для лучших тест-систем сочетание стоимости и диагностических качеств является вполне приемлемым (Newhall et al., 1999).

Наряду с классическими «планшетными» методами ИФА, стали широко применяться методы экспресс-анализа – иммунофльтрация и иммунохроматография. При иммунофльтрации специфическая иммунологическая реакция реализуется на фильтре сложной структуры, одновременно выполняющем функции иммуносорбента. Непосредственный контакт фильтрующихся веществ с фиксированными на фильтре реагентами сокращает время реакции и всего исследования до 15-20 минут, при достаточно высокой чувствительности и специфичности.

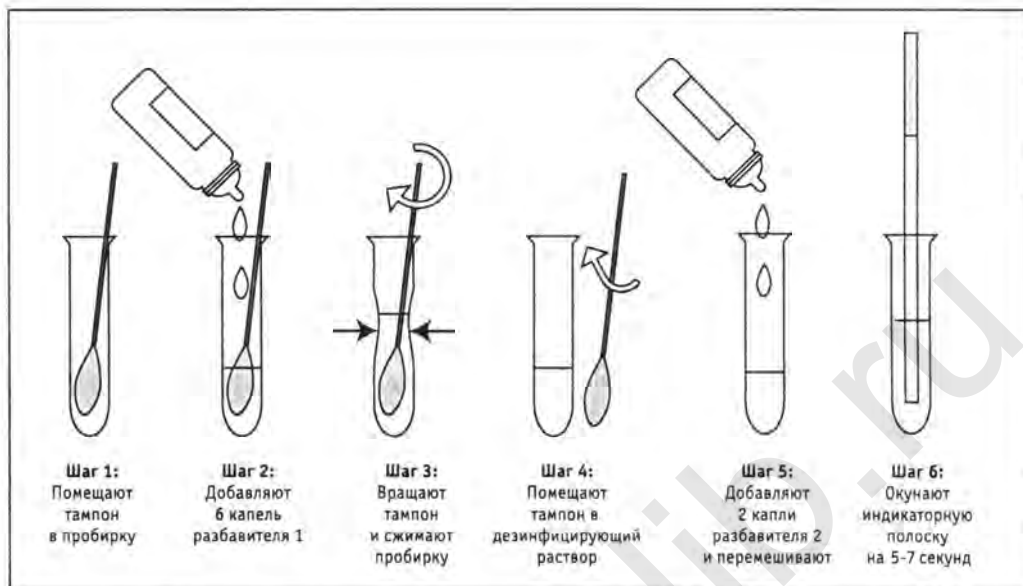
Примером диагностикумов, основанных на принципах иммунофльтрации, могут служить тест-системы Chlamydia Antigen kit, фирмы Ulti Med Products, Clearview, SureCell, системы TestPack фирмы Abbott laboratories или Membranebased screening фирмы Nubenco Enterprises. Следует отметить их надежность и удобство в работе. В большинстве случаев данные тест-системы позволяют в короткие сроки, без привлечения дополнительного оборудования и персонала определить инфекцию. Они предназначены только для предварительного обследования и должны применяться перед назначением подтверждающего исследования – в случае получения положительного результата (Arumainayagam et al., 1990; Hammerschlag et al., 1990, 1991; Young et al., 1991; Stratton et al., 1991; Skulnick et al., 1991). Их несомненным преимуществом является дешевизна, быстрота и возможность провести исследование непосредственно в кабинете врача или у постели больного. Среди таких тестов наиболее распространенными являются Unipath Clearview®, Kodak Surecell® и Quidel QuickVue®. Чувствительность их относительно низка и не превышает 65%. Rani и соавторы (2002) провели предварительное исследование с целью оценить чувствительность и специфичность Quidel QuickVue для диагностики хламидиоза в популяциях с высокой и низкой распространенностью инфекции. Метод сравнивали с полимеразной цепной реакцией. Чувствительность была 25-65%, а специфичность – близкая к 100%. Таким образом, в популяциях с относительно высоким распространением хламидиоза (пациенты венерологических клиник) иммуноферментный метод может иметь диагностическое значение, хотя и существенно уступает ПЦР. Экспресс-тесты на основе ИФА не подходят для массовых обследований населения. При скрининге может быть пропущен каждый четвертый случай хламидийной инфекции (Мавров и соавт. 2002; Мавров и соавт. 2003).

Метод иммунохроматографии реализуется чаще всего в виде диагностических полосок, а также кассет, мембран. В процессе исследования происходит перемещение исследуемого вещества и маркерного реагента. При положительном результате анализа в определенном месте тест-полоски появляется окрашенная зона. Исследование характеризуется достаточно высокой чувствительностью и простотой выполнения, однако в большинстве случаев дает качественный, а не количественный ответ. Чаще всего иммунохроматографические системы относятся к тестам экспресс-анализа, которые могут ставиться и учитываться в небольших лабораториях и диагностических кабинетах или использоваться перед ИФА-диагностикой на хламидиоз. Образцами указанных диагностикумов могут служить системы Chlamydia Antigen kit, фирмы Ulti Med Products, а также системы Hexagon фирмы (Human, Immunochromatography) EasiLine (Nubenco), системы фирмы Syntron (Мавров и соавт. 2002; Мавров и соавт. 2003).

#### **Выявление антигенов хламидий с помощью иммунохроматографии (Ulti Med Products)**

*В процедуре тестирования клинический образец, взятый с помощью специального ватного тампона (обычно прилагается к диагностическому набору), помещают в пробирку для вытяжек, содержащую экстрактивный раствор А. Через 2 минуты в пробирку добавляют экстрактивный раствор В. В лунку для образца добавляют 3 капли (около 200 мкл) экстрагированного образца. Мембрану предварительно покрывают моноклональными антителами против липополисахаридного антигена хламидий в зоне тестирования (Т) и козьими антителами против иммуноглобулинов мыши в зоне контроля (С) (рис. 11.1).*

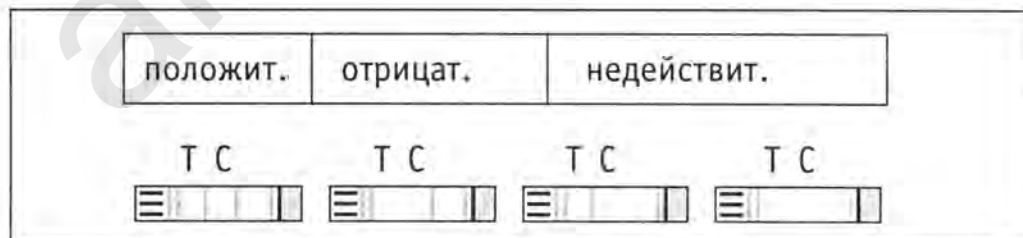
*Во время тестирования образец вступает в реакцию с моноклональными антихламидийными антителами, конъюгированными с частицами коллоидного золота, затем латерально мигрирует по поверхности*



**Рисунок 11.1.** Последовательность исследования при определении антигена хламидий в клинических образцах с помощью иммунохроматографии.

мембраны капиллярным способом. Если образец содержит антиген хламидий, то на мембране в области тестовой полосы зоны тестирования (Т) появляется цветная полоска со специфическим комплексом «антитело-хламидия-конъюгат». Если антиген хламидий отсутствует, то розовая полоска образуется только в области полосы контрольной зоны (С). В качестве контроля над правильностью процедуры тестирования цветная полоска в зоне контроля (С) будет появляться всякий раз, независимо от наличия антигена хламидий (рис. 11.2).

**Отрицательно:** в области контроля (С) появляется одна цветная линия. В области тестирования (Т) явной линии не наблюдается. **Положительно:** в дополнение к розовой линии в области контроля (С), в области тестирования (Т) также появляется четкая розовая линия. **Недействительно:** полное отсутствие какого-либо окрашивания в обеих областях указывает на то, что в процедуре тестирования была допущена ошибка и/или используемый реактив пришел в негодность.



**Рисунок 11.2.** Трактовка результатов определения антигена хламидий в клинических образцах с помощью иммунохроматографии.



Качество отобранных образцов имеет особое значение. Для обнаружения хламидий требуется особая и тщательная техника сбора образцов, при которой получают клеточный материал, а не жидкости организма.

Для забора эндоцервикальных образцов:

- Перед проведением забора образцов следует удалить лишнюю слизь из эндоцервикальной области при помощи отдельного тампона или ватного шарика.
- Лучше применять тампон, входящий в комплект теста. Альтернативно можно использовать любые другие палочки-тампоны с синтетическим или вискозным наконечником. Тампон следует вводить в эндоцервикальный канал, за пределы чешуйчато-столбчатого соединения, пока наконечник тампона не исчезнет из вида. Это даст возможность захватить цилиндрические и кубовидные клетки эпителия, являющиеся основным местом скопления хламидий. Тампон энергично вращают в течение 15-20 секунд и извлекают его таким образом, чтобы избежать попадания на его поверхность вагинальных клеток.
- Можно использовать и другой способ, при котором образцы могут быть отобраны с помощью цитологической щетки (в комплект не входит). Цитологическую щетку вводят в эндоцервикальный канал, за пределы чешуйчато-столбчатого соединения, оставляют его в таком положении на 2-3 секунды, затем дважды проворачивают и извлекают ее, не касаясь поверхности влагалища. Нельзя применять цитологические щетки для забора образцов у беременных пациенток!
- Помещают тампон или щетку в пробирку для вытяжек, если тест будет проводиться незамедлительно (рис. 11.1).

Для забора мужских уретральных образцов:

- Для забора уретральных образцов используют стандартные тампоны с волокнистым наконечником.
- Пациент не мочится, по крайней мере, в течение часа до сбора образцов.
- Тампон вводится в уретру на 2-4 см, вращается в течение 3-5 секунд и затем извлекается.
- Помещают тампон или щетку в пробирку для вытяжек, если тест будет проводиться незамедлительно (рис. 11.1).

Тампон нельзя помещать в контейнер для перевозки, содержащий транспортную среду для хламидий, поскольку такая среда может повлиять на результаты теста. Если тестирование невозможно провести сразу же, образцы следует поместить в сухой контейнер, специально предназначенный для транспортировки и хранения в условиях перевозки. Тампоны можно хранить при комнатной температуре (15-30°C) в течение 4 часов или в холодильнике (+2-8°C) в течение 24 часов. Замораживание образцов недопустимо. Перед тестированием все образцы следует довести до комнатной температуры (15-30°C).

В аннотациях фирм-производителей чувствительность экспресс-тестов ИФА более 90% (дает ся по отношению к культуре клеток). Реальная их чувствительность меньше и составляет максимум 60%, поскольку чувствительность самого метода культуральной диагностики – 60-70%. Что касается специфичности, то она гораздо ближе к истине, поскольку специфичность культуры несомненно, 100%. При скрининге в популяции с низким распространением инфекции диагностическая ценность даже самых современных ИФА может быть ограниченной (Thomas et al., 1994).

Лабораторная практика включает применение дополнительного контроля правильности тестирования. Периодически для контроля теста следует применять растворы, содержащие

хламидийный антиген в заданном количестве. Для достижения этой цели рекомендуется использовать прилагаемые к тесту растворы для проверки положительных и отрицательных результатов. Большинство иммунохроматографических тестов для определения антигена хламидий основано на выявлении липополисахаридного компонента клеточной стенки, который имеется у всех хламидий. Такие тесты являются специфичными для всего семейства *Chlamydiaceae* и не проводят разграничения между *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydoxyla pneumoniae* и *Chlamydoxyla psittacci*. Для разграничения видов хламидий необходимо использовать соответствующие тест-системы. На качество определения могут повлиять методы сбора образцов и такие факторы, как возраст пациента, анамнез заболевания, наличие симптомов и т.д. Минимальный уровень обнаружения инфекции при помощи данного теста может варьировать в зависимости от вида серовара (серологического варианта).

### 11.3.5. Диагностическое выделение хламидий

Диагноз заболевания доказывает выделение возбудителя. Используемые методы требуют специального оснащения и соответствующей квалификации персонала. Диагностическое выделение хламидий при урогенитальной хламидийной инфекции проводят в эпителиальных клетках оболочек желточных мешков развивающихся куриных эмбрионов и в культуре клеток. Важнейшие условия получения правильных результатов – надежное освобождение исследуемого материала от сопутствующей бактериальной флоры и предупреждение инактивации хламидий при транспортировке и хранении материала. Это достигается обработкой исследуемых образцов антибиотиками (не влияющими на жизнедеятельность хламидий и одновременно оказывающими бактерицидное действие на сопутствующую микрофлору), а также использованием транспортных сред, низких температур и максимальным сокращением сроков между сбором материала и его введением в куриные эмбрионы или в культуру клеток. Хламидии лучше выявляются (особенно при заражении куриных эмбрионов) из интенсивно инфицированного первичного материала, взятого у больного, не получавшего антихламидийной терапии. Тем не менее и при хронических формах хламидийной инфекции, а также при ее бессимптомном течении, эти методы дают ценную диагностическую информацию.

Метод диагностического выделения хламидий традиционно считался самым специфичным методом, «золотым стандартом», с которым сравнивают другие методы лабораторной диагностики хламидиоза. Термин «золотой стандарт» в отношении лабораторной диагностики хламидиоза является спорным, поскольку сам метод не может быть стандартизирован и его чувствительность, даже при соблюдении всех требований, не превышает 70-80% (Schachter et al., 1992). С появлением современных модификаций молекулярно-биологических методов, прежде всего ПЦР и ЛЦР, первенство культурального метода стало дискуссионным (особенно в аспекте чувствительности). Так, культуральный метод хуже, чем ПЦР, выявляет *C. trachomatis* при латентных формах хламидиоза, а также в таких образцах, как сперма у бессимптомных мужчин (из-за токсичности семенной жидкости для клеточных линий). Ему присуща высокая требовательность клеточных культур и куриных эмбрионов к выполнению условий температурного режима транспортировки образцов, дороговизна и трудоемкость методики (Белозоров, 1999; Чочиа и соавт. 2001; Возианов и соавт., 2002; Ващенко, 2002). С появлением молекулярно-биологических методов диагностики хламидиоза

диагностическое выделение хламидий все реже применяется для рутинной диагностики. Он используется в научных исследованиях. Выделение в культуре клеток имеет решающее значение при разрешении спорных вопросов в случае противоречивых результатов разных диагностических методов и при проведении судебно-медицинской экспертизы (Stary, 2000).

### 11.3.6. Выделение хламидий в куриных эмбрионах

*Яйца с живыми подвижными эмбрионами, полученные от кур без применения антибиотиков, заражаются на 6-8-й день инкубации при +38, +39°C. Скорлупу над воздушным мешком протирают спиртовым раствором йода, прокалывают острым зондом, и 0,2-0,5 мл материала вводят шприцом с иглой диаметром 0,6-0,8 мм и длиной 4 мм в желточный мешок. Отверстие в скорлупе заплавляется смесью парафина и воска. Зараженные яйца инкубируют при +35°C и высокой относительной влажности, контролируя жизнеспособность эмбрионов в овоскопе. Яйца, погибшие в первые 2-3 дня, уничтожают. Желточные мешки эмбрионов, павших в последующие сроки, а также доживших до 12-го дня, извлекают, делают мазки-отпечатки для выявления морфологических структур и антигенов хламидий и контролируют материал на бактериальную стерильность (посевом на различные среды, в том числе на кровяной агар и тиогликолятный бульон). Стерильный материал используют в пассажах, применяя в качестве инокулята 20-40% взвеси оболочек желточных мешков, приготовленные на мясopетонном бульоне, pH 7,2. Взвеси готовят в ступках или в банках с бусами. При отрицательных результатах выделения хламидий при первичном заражении проводят два слепых пассажа. В случаях адаптации выделяемых хламидий к куриным эмбрионам (сопровождающейся накоплением микроорганизма, специфической летальностью эмбрионов и отсутствием бактериальной контаминации) проводят идентификацию пассируемого микроорганизма для его определения в качестве лабораторного штамма хламидий (Кутювая, 1984; Кутювая, Пустовойтова, 1986).*

Окраска мазков-отпечатков желточного мешка куриных эмбрионов. Метод окраски Романовского-Гимзы не пригоден для мазков-отпечатков оболочки желточного мешка, так как не обеспечивает дифференциацию ЭТ и РТ микроорганизма от желточного материала и детрита. Морфологические структуры хламидий в мазках-отпечатках выявляют при окраске по Маккиавелло, а родоспецифический хламидийный антиген – при окраске флуоресцирующими антителами.

Окраска препаратов по методу Маккиавелло. Необходимые реагенты:

- 0,25% раствор основного фуксина – 0,25 г красителя растворяют в 100 мл ФБР или бидистиллированной воды;
- 0,5% раствор лимонной кислоты – 0,5 г лимонной кислоты растворяют в 200 мл бидистиллированной воды (применяется свежеприготовленный раствор);
- 1% раствор метиленового синего – 1 г красителя растворяют в 100 мл бидистиллированной воды.

Подсушенные на воздухе предметные стекла с мазками-отпечатками фиксируют над пламенем горелки. На мазки-отпечатки наносят отфильтрованный через бумажный фильтр раствор фуксина на 5 мин. Препарат слегка и равномерно подогревают над пламенем горелки. Краситель смывают проточной водопроводной водой. Препарат быстро дифференцируют раствором лимонной кислоты (несколько секунд), вновь промывают проточной водой, докрашивают раствором метиленового синего (10-15 с), промывают, подсушивают фильтровальной бумагой и просматривают в световом микроскопе при масляной иммерсии (об. 90, ок. 7). Морфологические структуры хламидий в виде мелких красных точек четко выявляются на голубом фоне препарата.

Окраска препаратов флуоресцирующими антителами. Содержание в морфологических структурах выделенного агента родоспецифического хламидийного антигена устанавливают при окраске мазков-отпечатков

флуоресцирующей хламидийной антисывороткой или моноклональными антителами методом ПИФ. Препараты, обрабатываемые этим методом, предварительно фиксируют в охлажденном ацетоне (+4°C) или 96° этаноле 10 мин. ЭТ и РТ хламидий выявляются в виде ярко-зеленых точек и их конгломератов на оранжевом фоне препарата (Машкиллейсон, Гомберг, 1986; Гомберг и соавт., 1986).

Выделение хламидий в развивающихся куриных эмбрионах, зараженных в желточный мешок, долго было единственным методом надежной этиологической диагностики хламидийных инфекций и сейчас остается высокоспецифическим методом диагностики урогенитальной хламидийной инфекции, ее экстрагенитальных проявлений, а также пахового лимфогранулематоза. Этот метод по чувствительности близок методу диагностического выделения хламидий в культуре клеток и несколько уступает методу флуоресцирующих антител, используемому для выявления антигенов микроорганизма в инфицированных клетках (Шаткин, 1979; Мартынова и др., 1979; Schachter et al., 1970, 1978).

Критериями диагностического выделения хламидий являются наличие морфологических структур микроорганизма и наличие хламидийных антигенов. Специфическая летальность эмбриона обычно проявляется в последующих пассажах. Рассматриваемый метод технически прост, но трудоемок и длителен (от 7-12 дней до 3-4 нед. с учетом проведения 2-3 слепых пассажей), что ограничивает его практическое применение при наличии ускоренных методов этиологической диагностики инфекции. В настоящее время его используют для получения лабораторных культур хламидий и препаративного накопления антигена для научных исследований.

### 11.3.7. Выделение хламидий в культурах клеток

Со времени первых сообщений о выделении хламидий в культуре клеток предложено много модификаций данного метода (Gordon et al., 1963, Gordon, Quan 1965; Gordon et al., 1969). Наиболее широко используются клетки HeLa-229 (Helen Lane) – клетки цервикальной аденокарциномы человека, McCoу – фибробласты синовиальной ткани человека и мышечные фибробласты L-929. Клетки линии BGM (Buffalo Green Monkey) – клетки почки зеленой мартышки используются для культивирования *C. psittaci* и *C. pecorum*. А культуры клеток HL или Her2 – для выделения *C. pneumoniae* (Шаткин, Мавров, 1983; Thewessen et al., 1989; Krech et al., 1989; Johnston, Siegel, 1992). Большинство представителей вида *C. trachomatis*, за исключением возбудителя пахового лимфогранулематоза, не способны в стандартных условиях метода инфицировать клетки и размножаться в различных культурах клеток. Это обстоятельство долго ограничивало использование метода культур клеток для диагностики урогенитальных хламидиозов и хламидиозов другой локализации. Избежать этого помогло использование дополнительных методических приемов, способствующих повышению адсорбции микроорганизма на поверхности клеток, активизации его поглощения клеткой и подавлению ее нормального метаболизма. С этой целью широко применяют:

- центрифугирование инфекционного материала на монослой клеток с обработкой трипсином (Yong, Paul, 1986);
- облучение клеток рентгеновскими лучами (Gordon et al., 1972);
- обработку монослоя клеток ДЕАЕ-декстраном (диэтиламиноэтил декстран) – олигосахаридом, активирующим поглощение макромолекул (Rota, Nichols, 1971, 1973; Kuo et al., 1972);
- обработку клеток 5-йод-2-дезоксисуридином (Wentworth, Alexander, 1974) или циклогексимидом – антиметаболитами, обладающими цитостатическим действием (Ripa, Mardh, 1977, 1977a).



**Метод диагностического выделения хламидий в культурах клеток****L-929, обработанных ДЕАЕ-декстраном**

Критерием диагностического выделения служит выявление в зараженных клетках типичных цитоплазматических включений хламидий при окраске Мая-Грюнвальда-Гимзы или Романовского-Гимзы, флуоресцирующими антителами, а для некоторых штаммов и йодом, при первичном заражении или в серии 1-2 пассажей, при отсутствии бактериальной контаминации.

**Необходимые среды, реагенты, культуральные сосуды:**

- среда 199 без антибиотиков, хранение при температуре +4°C;
- раствор Хенкса, хранение при температуре +4°C;
- сыворотка крупного рогатого скота без антибиотиков: инактивация на водяной бане 30 мин при +56°C, хранение при температуре -20°C;
- фетальная сыворотка крупного рогатого скота: инактивация 30 мин при +56°C, хранение при температуре -20°C;
- 0,02% раствор версена, хранение в ампулах при температуре -20°C;
- 5% раствор 0,5 М глюкозы: 10,66 г глюкозы растворяют в 100 мл среды 199, стерилизуют через фильтры Millipore (размер пор 0,45 мкм), разливают по ампулам, хранение при температуре -20°C;
- ДЕАЕ-декстран (М. м. 2 000 000 дальтон): основной 1% раствор готовят на дистиллированной воде, стерилизуют через фильтры Millipore (0,45 мкм) или автоклавируют (+115°C, 30 мин), разливают по ампулам, хранение при температуре -20°C. Рабочий раствор (90 мкг/мл) готовят ex tempore на растворе Хенкса;
- антибиотики: стрептомицин, нистатин, канамицин;
- плоскодонные пробирки из нейтрального стекла (высота 45 мм, диаметр 13 мм), содержащие покровное стекло диаметром 12 мм и плотно закрывающиеся резиновой пробкой.

Культивирование клеток L-929. Используют клетки, адаптированные к среде 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота. Клетки выращивают в матрасах из нейтрального стекла емкостью 100 или 250 мл при использовании соответственно 15 мл или 25 мл 199 среды с добавлением 10% сыворотки. При пересевах культуральную среду сливают, клетки снимают со стекла обработкой 0,02% раствором Версена (10 мин, +35°C), Версен удаляют, клетки суспензируют в среде 199. Взвесь клеток, содержащую 1,2-2,0 x 10<sup>5</sup> клеток в 1 мл культуральной среды с 10% сыворотки, разливают по 1 мл в стеклянные плоскодонные пробирки с покровными стеклами. Монослой клеток на покровных стеклах выращивают при вертикальном положении пробирок в течение 24-48 ч.

Заражение клеток L-929 клиническими материалами. Культуральную среду из плоскодонных пробирок удаляют. Монослой клеток, выросший на покровном стекле, покрывают 1 мл рабочего раствора ДЕАЕ-декстрана (90 мкг/мл), удаляемого после 30 мин контакта с клетками при комнатной температуре. Материал, исследуемый на наличие хламидий, тщательно встряхивают или подвергают озвучиванию перед инокуляцией. Гомогенизация образца имеет значение для чувствительности метода (Jones et al., 1989). Материал вносят по 0,2 мл в четыре (или более) плоскодонные пробирки, наклонив на монослой клеток. Пробирки с материалом центрифугируют на горизонтальном роторе (2400g, 1ч, +30, +34°C). После центрифугирования инокулят удаляют, осторожно вносят 1 мл питательной среды (среда 199 с добавлением 9% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 5% 0,5 М раствора глюкозы) и инкубируют культуру клеток при температуре +35, +36°C до 72 ч. В случае кратковременного первичного

контакта клинического материала с антибиотиками в транспортной среде или при указаниях на наличие обильной сопутствующей бактериальной флоры в используемом материале, в среду добавляют также антибиотики: стрептомицин (200 мкг/мл), нистатин (25 мкг/мл) и канамицин (100 мкг/мл).

Выявление цитоплазматических включений хламидий в монослое клеток. Оценку результатов первичного заражения клеток проводят обычно через 66-72 ч, при посеве материала не на четыре, а на шесть пробирок – через 48 и 72 ч. Покровные стекла из двух пробирок извлекают, споласкивают ФСБР, подсушивают на воздухе и материал фиксируют соответственно последующему методу окраски: в 96° этаноле 10 мин для окраски Мая-Грюнвальда-Гимзы (или Романовского-Гимзы), в 96° этаноле 10 мин или в холодном ацетоне 15-20 мин для окраски флуоресцирующими антителами. Препараты, предназначенные для окраски раствором Люголя (обычно используют материал последующих пассажей), фиксируют в двух сменах абсолютного этанола или абсолютного метанола 15-20 мин или в фиксаторе Карнуа 10 мин. Необходимы следующие растворы:

- Раствор красителя Мая-Грюнвальда. Основной раствор: 100 мг сухого порошка краски растворяют в 60 мл абсолютного метанола (х. ч.), нагретого до +60°С. Раствор охлаждают и выдерживают 1-2 дня при +4°С, фильтруют через бумажный фильтр;
- раствор красителя Романовского-Гимзы;
- флуоресцирующая хламидийная антисыворотка (или моноклональные антитела);
- бычий альбумин, меченный родамином;
- концентрированный раствор Люголя (для выявления штаммов хламидий, образующих во включениях гликоген) – 3 г калия йодид и 1,5 г кристаллического йода растворяют в 30,0 мл дистиллированной воды. Все растворы красителей хранят в плотно закрытых сосудах в темном месте.

Окраска препаратов производится с помощью методов:

- Мая-Грюнвальда-Гимзы. На препарат наносят 5 капель красителя Мая-Грюнвальда на 2-3 мин. Избыток краски тщательно отмывают проточной водой 1-2 мин, после чего наносят свежеприготовленный рабочий раствор красителя Романовского-Гимзы – основной раствор красителя, разведенный в ФБР или дистиллированной воде (1:20) на 15-20 мин. Препарат промывают проточной водой и промокают фильтровальной бумагой. Дифференциацию проводят в абсолютном этаноле 5-10 с, промывают, подсушивают фильтровальной бумагой, просветляют в ксилоле и монтируют в канадском бальзаме на предметном стекле.
- Романовского-Гимзы.
- Флуоресцирующими антителами методом ПИФ. Окрашенные и тщательно промытые препараты монтируют на предметном стекле в забуференном глицерине.
- Раствором Люголя. На препарат наносят раствор Люголя на 5 мин, избыток сливают, промокают фильтровальной бумагой, просветляют в ксилоле и монтируют в канадском бальзаме на предметном стекле.

Просмотр препаратов проводят соответственно их окраске, в световом или люминесцентном микроскопе при малых увеличениях. Выявление цитоплазматических включений проводят при большом увеличении (ок. 7, об. 40) и масляной иммерсии (ок. 7, об. 90 или 100).

Пассирование материала. При отсутствии цитоплазматических включений в монослое первично зараженных клеток можно провести 1-2 слепых пассажа. Монослой клеток в оставшихся плоскостонных пробирках после обработки 0,02% раствором Версена снимают пастеровской пипеткой, ресуспендируют в среде

199 с добавлением 5% фетальной сыворотки и 5% 0,5 М глюкозы, высаживают на поверхность покровных стекол в плоскодонные пробирки и культивируют при температуре +35, +36°C до 72 ч (обычно без обработки ДЕАЕ-декстраном и без центрифугирования). При отсутствии цитоплазматических включений в материалах от двух пассажей опыт заканчивают. Наличие включений определяет положительный результат диагностического теста, а также позволяет при дальнейших пассажах в культуре клеток или в куриных эмбрионах адаптировать пассируемый микроорганизм к используемым клеточным системам и получить соответствующий лабораторный штамм хламидий.

#### **Варианты метода диагностического выделения хламидий в культурах клеток**

С аналогичными результатами, вместо клеток L-929, используют клетки McCoу в тех же условиях культивирования. С целью повышения эффективности выделения хламидий монослой клеток вместо ДЕАЕ-декстрана обрабатывают циклогексимидом, 5-йод-2-дезоксисуридином (ИДУ).

Циклогексимид. Готовят раствор из расчета 2 мкг/мл на среде 199, фильтруют через фильтры Millipore (размер пор 0,45 мкм). Препарат вводят в питательную среду в количестве 1-2 мкг на 1 мл среды после заражения клеток (без последующего удаления).

ИДУ. Готовят раствор из расчета 25 мкг/мл на среде 199, фильтруют через фильтры Millipore (0,45 мкм). Введением 12,5 мкг препарата на 1 мл культуральной среды обрабатывают однодневный монослой клеток за 3 дня до заражения. Непосредственно перед заражением среду с ИДУ удаляют.

В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины разработан упрощенный способ выделения хламидий в культуре клеток L-929 с добавлением в питательную среду L-цистеина в концентрации 2,5-3,0 мкг/мл (Кутовая, 2001; Білосоров та співавт. 2001).

### **11.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХЛАМИДИЙ К АНТИБИОТИКАМ**

В отличие от многих бактериальных инфекций, определение чувствительности штаммов хламидий, вызвавших заболевание, не является необходимым при рутинной клинической диагностике. С одной стороны, эта процедура сложная, требующая наличия лаборатории, где поддерживаются культуры клеток, а с другой – представители семейства *Chlamydiaceae* имеют незначительный диапазон различий в чувствительности к антибиотикам. Штаммы *Chlamydia trachomatis*, вызывающие оculoгенитальные инфекции, могут различаться чувствительностью к тетрациклинам, макролидам и фторхинолонам, однако эти различия несущественны с клинической точки зрения.

Потребность исследовать чувствительность хламидий возникает при испытаниях новых антибактериальных субстанций, при разработке новых схем лечения (Handsfield et al., 1992). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) определяются при росте хламидий в куриных эмбрионах или на культуре клеток, где в культуральную среду добавляются заданные концентрации антибиотиков (Бескина и соавт., 1979; Ehret, Judson, 1988; Steele-Monimer, Meier-Ewert, 1988; Гудкова, Щеголева, 1994). Определение МБК более сложно, чем МИК, поскольку при пассажах необходимо учитывать не только концентрацию в культуральной среде, но и накопление антибиотиков клетками культуры. Данные системы позволяют оценивать действие синергичных комбинаций антибиотиков (Mumtaz et al. 1988; Pearlman et al., 1990). Точность определения

МИК и МБК зависит от метода выявления включений в клетках культуры. Наиболее предпочтительным является метод прямой иммунофлуоресценции. Применение поляризованных клеточных культур и липосом для доставки антибиотика внутрь клетки позволяет точнее изучить действие лекарств на хламидии (Wyrick et al., 1993; Al-Awadhi et al., 1992).

## 11.5. ОБНАРУЖЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ АНТИТЕЛ

Первым методом, выявляющим антитела к хламидиям в сыворотке крови, была реакция связывания комплемента (РСК), которую разработал Bedson (1935) для диагностики пситтакоза. Позднее McKee, Rake и Shaffer (1940) применили РСК для серологической диагностики венерической лимфогранулемы. Была также разработана реакция пассивной гемагглютинации (РПГА) для диагностики пситтакоза (орнитоза) (Benedict, O'Brien, 1958; Горовиц и Тимашева, 1976). Низкая чувствительность и специфичность этих тестов позволяла диагностировать лишь системные хламидиозы. В настоящее время для диагностики и эпидемиологического надзора, а также для идентификации новых штаммов хламидий используют реакцию непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

### 11.5.1. Реакция непрямой иммунофлуоресценции

Наиболее распространенный вариант РНИФ ставится с антигенами (элементарными тельцами хламидий) всех известных штаммов (сероваров) *Chlamydia trachomatis* на одном предметном стекле с определением титров антител ко всем антигенам одновременно (Wang et al., 1977; Wang, Grayston, 1986). Специфичность метода существенно повышается при обработке антигена (ЭТ) моноклональными антителами, блокирующими родоспецифические эпитопы ЛПС (Mannion ET AL., 1991). Если использовать в качестве антигена ретикулярные тельца вместо элементарных телец, то РНИФ из штаммоспецифичной становится видоспецифичной, поскольку РТ любого серовара *C. trachomatis* перекрестно реагируют с антителами к большинству других штаммов (Yong et al., 1979). В исследованиях с помощью иммуноблоттинга было установлено, что антигенный состав ЭТ и РТ существенно отличается. Так, в РТ отсутствует несколько белков, имеющих в ЭТ, в частности группа протеинов массой 60-62 килodalton (Sevenini et al., 1986). Использование блокирующих антител и РТ в качестве антигена не нашло применения в рутинной диагностике из-за сложности методик. Существует вариант РНИФ, где в качестве антигена используются целые включения из клеток культуры, как правило, содержащие хламидии на разных стадиях развития. Поскольку включения флуоресцируют ярче отдельных телец хламидий, учитывать результат легче, чувствительность метода возрастает. Но при этом теряется его штаммоспецифичность – т.е. для типирования выделенных хламидий он не пригоден. При этом могут выявляться антитела к *Chlamydoxyla pneumonia*, которые довольно часто встречаются у клинически здоровых субъектов (Richmond, Caul, 1975; 1977; Thomas et al., 1982; Forsey et al., 1986).

РНИФ позволяет определять антитела к *C. trachomatis*, принадлежащие к разным классам иммуноглобулинов (IgG, IgM, IgA). При определении IgM наличие в сыворотке ревматоидного фактора может давать ложноположительные результаты (Mahony et al., 1986; Verkooyen et al., 1992). А присутствие высоких титров IgG может давать ложноотрицательные результаты теста на IgM из-за феномена ингибиции (Juchau et al., 1972).



### **Методика постановки РНИФ**

РНИФ (микрометод) применяется для выявления хламидийных антител, в том числе хламидийных иммуноглобулинов различного класса, в сыворотках и секретах больных урогенитальными и экстрагенитальными хламидиозами. В специализированных лабораториях, имеющих «музейные» штаммы хламидий, этот метод используют также для установления иммунотипов циркулирующих и лабораторных штаммов хламидий.

Реагенты, используемые в РНИФ, для обнаружения антител у больных: ФСБР, рН 7,4; ацетон (х. ч.); забуференный глицерин; люминесцирующая сыворотка против глобулинов человека; моноспецифические люминесцирующие сыворотки против глобулинов человека: IgG, IgM, IgA; бычий альбумин, меченный родамином. Приготовление антигена. В качестве специфического антигена используют 3-5% взвесь оболочек желточных мешков инфицированных куриных эмбрионов. В ступке готовят взвесь из желточных оболочек с максимальным накоплением морфологических структур микроорганизма на охлажденном (+4°C) стерильном ФСБР (рН 7,2). Взвесь центрифугируют при 500 г 10 мин, средний слой, содержащий ЭТ и РТ микроорганизма, разливают по 0,5 мл и используют в качестве материала, содержащего хламидийный антиген. Антиген можно длительно хранить при температуре от -60 до -70°C. Контрольный антиген готовят аналогично из оболочек желточных мешков 10-12-дневных незараженных куриных эмбрионов. Для исследования сывороток людей с целью выявления хламидийных антител и их типирования по отношению к иммунотипу циркулирующих штаммов микроорганизма готовят хламидийные антигены из оболочек желточных мешков куриных эмбрионов, инфицированных хламидиями, относящимися ко всем известным 17 иммунотипам (серотипам) *S. trachomatis*. Для клинической серодиагностики достаточно использовать отдельные антигены, перекрестно реагирующие с хламидийными антителами к разным иммунотипам хламидий. При диагностике урогенитальной хламидийной инфекции обычно используют хламидийный антиген, приготовленный из материала, инфицированного иммунотипом L2 возбудителя венерической лимфогранулемы, обеспечивающим широкие перекрестные реакции с антителами ко всем иммунотипам *S. trachomatis*. С той же целью используют и иммунотипы микроорганизма E или D, наиболее распространенные среди возбудителя урогенитальной инфекции, а также применяют один «смешанный» антиген, представляющий смесь всех имеющихся в лаборатории иммунотипов *S. trachomatis*.

Приготовление слайдов-антигенов. Для приготовления слайдов используют чистые обезжиренные предметные стекла, предварительно обработанные хромпиком (3-4 ч), тщательно промытые проточной и дистиллированной водой и хранящиеся в закрытой посуде в смеси Никифорова (спирт и эфир, 1:1). Предметное стекло помещают на трафарет, на котором отмечены точки – зоны нанесения на предметное стекло групп используемых антигенов. На трафарете отмечено 18 точек, по 9 в каждом условном квадрате, размером 18 x 18 мм, что соответствует размеру покровных стекол, в последующем накладываемых на предметное стекло при монтировании препарата. Пером авторучки наносят точку антигена на зоны, отмеченные на трафарете, на нескольких стеклах. Для каждого антигена используют отдельное перо. Нанесение всегда начинают с контрольного антигена. Закончив нанесение первого антигена на всех подготовленных стеклах, приступают к нанесению второго и т. д. Слайды высушивают на воздухе 15-20 мин, фиксируют в охлажденном ацетоне (-4°C) 15-20 мин и используют. Приготовленные заранее слайды длительно сохраняются при температуре от -60 до -70°C и не более 2 нед. – при -20°C.

Изучение сывороток и секретов. Изучение сывороток и секретов в реакции НИФ проводят в три этапа. Для клинических целей можно ограничиться двумя этапами, которые обязательно обозначить как «предварительное титрование» сывороток (секретов).

Первый этап – выявление сывороток и секретов, содержащих хламидийные антитела. С этой целью используют слайды-антигены, в каждой зоне которых содержится контрольный и специфический антиген. В качестве специфического используют смесь хламидийных антигенов. Испытывается одно разведение сыворотки – 1:16 (разведение готовят на ФСБР, рН 7,0 или исходное разведение секрета, собранного на полосу фильтровальной бумаги (2.3), примерно равное 1:10). На каждом предметном стекле одновременно исследуют 15 образцов сывороток или секретов. Три оставшиеся зоны антигенов используют как контрольные, на которые наносят соответственно по одному образцу заведомо положительной и заведомо отрицательной сыворотки (секрета) и ФСБР. Второй этап – определение титра хламидийных антител по отношению к одному перекрестно реагирующему или к смеси антигенов *S. trachomatis*. С этой целью используют слайды-антигены типа Б. Готовят двукратные разведения положительных сывороток от 1:16 до 1:512, и на каждом предметном стекле проводят титрование трех сывороток, занимая для каждой сыворотки пять из шести зон антигенов по горизонтали. На оставшиеся три зоны по вертикали наносят ФСБР. При титре сывороток более 1:512 тем же способом продолжают их титрование на других слайдах. Секреты изучают при двукратных разведениях, обычно не более чем 1:64. Третий этап – определение типа хламидийных антител по отношению к определенным иммунотипам *S. trachomatis*. Выявляемые показатели по наивысшему титру указывают на иммунотип (или иммунотипы) инфицирующего микроорганизма. С этой целью проводят второй этап с использованием слайдов-антигенов, на каждой зоне которого нанесены антигены всех известных иммунотипов *S. trachomatis* и контрольный антиген.

Постановка РНИФ (микрометод). На отдельные зоны (группы) антигенов, расположенных на слайдах, наносят бактериологической петлей соответствующие разведения сыворотки (секрета), начиная с наибольшего разведения, а также контроля сыворотки (положительной и отрицательной) и ФСБР. Рекомендуется постоянно придерживаться порядка нанесения разведения сыворотки (секрета), например справа налево. После нанесения на антигены использовавшегося разведения сыворотки петля промокается фильтровальной бумагой, а после каждой сыворотки – промывается в ФСБР. Слайды с нанесенными сыворотками (секретами) инкубируют 40 мин при температуре +37°C во влажной камере. Дальнейшую обработку смесью люминесцирующей сыворотки против глобулинов человека и бычьего альбумина, меченого родамином, проводят аналогично описанному методу НИФ, который используют для выявления цитоплазматических включений хламидий в соскобных препаратах. Рабочее разведение люминесцирующей сыворотки желательно установить опытным путем для своей тест-системы (предварительное титрование с заведомо положительной сывороткой), а не руководствоваться указанной на ампуле с реагентом. После окончательной промывки в ФСБР слайды слегка подсушивают на воздухе, тщательно вытирают тыльную сторону предметного стекла и на ней карандашом по стеклу отмечают места расположения зон (групп) антигенов. На слайды наносят забуференный глицерин и заключают под покровные стекла. Избыток глицерина удаляют фильтровальной бумагой, покровные стекла тщательно притирают к предметному стеклу. Слайды изучают в люминесцентном микроскопе. При проведении массовых исследований слайды рассматривают без покровных стекол. В этом случае перед нанесением глицерина слайды тщательно подсушивают. Степень специфической флуоресценции хламидийных антигенов, связанных с морфологическими структурами микроорганизма (ЭТ, РТ), устанавливают по системе «4+». За титр хламидийных антител в исследуемых сыворотках (секретах) принимают то наибольшее их разведение, при котором отмечается четкая зеленая флуоресценция (2+), связанная с хорошо различимыми ЭТ и РТ.

Использование в реакции РНИФ (микрометод) моноспецифических люминесцирующих сывороток (антител) против иммуноглобулинов человека. Моноспецифические люминесцирующие сыворотки (антитела) применяют для выявления в исследуемых сыворотках и секретах антител против хламидий, принадлежащих

к различным классам иммуноглобулинов – IgG, IgM и IgA. Для постановки реакции, при сохранении всех процедур и последовательностей, вместо люминесцирующей сыворотки против суммарных глобулинов человека используют ту или иную моноспецифическую люминесцентную сыворотку, определяя титр хламидийных иммуноглобулинов соответствующего класса в исследуемых сыворотках.

**Специфичность РНИФ.** В классическом варианте РНИФ в качестве антигена используют тельца хламидий. Липополисахариды и белки теплового шока хламидий могут давать перекрестные реакции с антителами к другим бактериям, что может быть причиной ложноположительных реакций (Haralambieva et al., 2001). Кроме того, хламидийный антиген, полученный из зараженной культуры, может быть контаминирован микоплазмами, к которым у большинства людей имеются антитела. Ряд авторов объясняют микоплазменной контаминацией антигена случаи, когда у лиц с антителами к *S. pneumoniae* инфекция не подтверждается другими методами, такими как ПЦР, выявление антигена или выделение возбудителя (Black et al., 1994; Emre et al., 1994; Persson, Boman 2000). С другой стороны, у части больных с острой хламидийной пневмонией (доказанной выделением *S. pneumoniae* в культуре клеток) титры антител в динамике не повышаются (Chirgwin et al., 1991). Антитела к представителям *Chlamydia* и *Chlamydophila* могут перекрестно реагировать между собой. Недавно с помощью генной инженерии получен бактериофаг, несущий на себе видоспецифический пептид *Chlamydophila pneumoniae* (Marston et al., 2002).

### 11.5.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

В настоящее время в клинической практике для определения антител к хламидиям в сыворотке крови применяется гетерогенный иммуноферментный анализ (ИФА), основанный на использовании конъюгата антитело-фермент и твердофазного носителя (Engval, Perelman, 1971). Впервые определение антител к хламидиям в сыворотке крови с помощью твердофазного ИФА осуществили Lewis и соавторы (1977). Позже твердофазный ИФА стал применяться в научных исследованиях и лабораторной диагностике хламидийной инфекции (Skaug et al., 1982; Ориел, Риджуэй 1984; Домейка и соавт. 1985).

Иммуноферментные методы определения антител к хламидиям позволяют одновременно обследовать большое количество образцов и предполагают объективный способ учета результатов (Ben-Ahmeda et al., 1990). В качестве антигена, сорбированного на твердую фазу, обычно используется взвесь ЭТ *C. trachomatis*, серовар L2, дающий перекрестные иммунологические реакции с большинством урогенитальных штаммов. Исключение составляют серовары С и J. При инфицировании данными штаммами соответствующие антитела в ИФА могут не выявляться (Mahony et al., 1983). При использовании в качестве антигена экстрагированного ЛПС хламидий чувствительность ИФА для выявления антител возрастает и превышает чувствительность РНИФ. (Evans, Taylor-Robinson, 1982; Schmeer et al., 1983). При выявлении IgM-антител к *C. trachomatis* в сыворотке крови в качестве антигена предпочтительнее использовать ЛПС хламидий (Finn et al., 1983).

Твердофазный ИФА для выявления хламидий подвергался различным модификациям с целью увеличить чувствительность и специфичность. Это применение флуоресцирующей субстратной смеси (Numazaki et al., 1985; Theunissen et al., 1993) и удаление из антигена липополисахаридной фракции с помощью периодата натрия и различных детергентов

(Ossewaarde et al., 1989; Ladany et al., 1989). Использование в качестве антигена мембранного комплекса ЭТ, экстрагированного с помощью саркозила и синтетического пептида, повторяющего аминокислотную последовательность переменного домена 1 (V1) МOMP, позволило разработать вариант твердофазного ИФА для обнаружения антител к отдельным серотипам *Chlamydia trachomatis* (Matsumoto et al., 1992; Jones et al., 1992). В последние годы появились тест-системы для серологической диагностики хламидиоза с применением рекомбинантных антигенов (пептиды МOMP, ацилированный липополисахарид). Vas и соавторы (2001), сравнив различные методы выявления антител к хламидиям у больных с инфекцией *C. trachomatis* и доноров, показали отсутствие перекрестных реакций теста «Labsystems EIA» между *C. trachomatis* и *C. pneumoniae*. При высоких титрах антител возможны перекрестные реакции между *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* и *C. psittaci* даже при использовании высокоспецифичных тест-систем (Gnarpe et al., 2000; Stralin et al., 2001).

В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины была разработана модификация твердофазного ИФА IgG-, IgM-, IgA-антител к *Chlamydia trachomatis* и проведена оценка ее диагностических возможностей (Мавров, 1987).

Антиген для ИФА готовится по следующей методике. *C. trachomatis*, штамм ВU-434 выращивается в куриных эмбрионах. Желточные мешки, богатые включениями, отделяют, гомогенизируют, добавляя забуференный физиологический раствор (ЗФР) до 10% взвеси, которую дважды центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин. Осадок (грубый детрит) и всплывший жир убирают. Средний слой дважды обрабатывают на ультразвуковом диспергаторе при частоте 22 кГц в режиме мощности 0,2 Вт/см<sup>2</sup> в течение 30 с, затем вновь центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин. Средний слой наслаивают на равный объем 30% раствора верографина и центрифугируют при 18000 об/мин в течение 1 ч при 4°C. Наличие телец хламидий в осадке контролируют в электронном микроскопе. Осадок разводят ЗФР, добавляют формалин до 0,25% и хранят при -25°C. По аналогичной методике готовят контрольный антиген из незараженных эмбрионов. В лунки 96-ячеечных полистироловых планшетов (производство ВНИИИМТ) вносят разведения антигена 20 мкг/мл в 0,2% растворе натрия бикарбоната. В контрольные лунки вносят бычий сывороточный альбумин (БСА) и оставляют на ночь при 10°C. Утром промывают 3 раза ЗФР (рН 7,4) и оставшиеся места связывания блокируют 0,5% БСА в течение 2 ч при 37°C. Покрытые антигеном планшеты хранятся при -25°C до 1 мес. Кровь берут натощак из локтевой вены выдерживают в течение 1 ч при 37°C и центрифугируют при 3000 об/мин. Сыворотку хранят при -25°C, перед исследованием размораживают в водяной бане при 37°C, разводят в 50 раз ЗФР с 0,5% БСА и добавляют контрольный антиген, чтобы исключить выявление антител к антигенам куриного эмбриона. По 0,1 мл разведенной сыворотки пациентов вносят в опытную и контрольную лунки и инкубируют в течение 1,5 ч при 37°C. Затем 2 раза промывают ЗФР, содержащим 0,05% твина-80, и вносят конъюгат антител против иммуноглобулинов человека определенного класса (G, M или A), меченных пероксидазой хрена. После инкубации с конъюгатом в течение 1,5 ч при 37°C промывают 6 раз ЗФР с 0,05% твина-80 и вносят субстратно-буферную смесь, приготовленную перед употреблением (п-фенилендиамина 0,5 мг/мл, перекиси водорода 0,05 мг/мл, натрия фосфата однозамещенного до рН 6,2). Интенсивность пероксидазной реакции определяют через 15-20 мин по оптической плотности раствора в лунках при длине волны 492 нм. Об уровне IgG, IgM, IgA к хламидиям судят по разности поглощения в опытной и контрольной лунках, в которые была налита сыворотка. Результат выражают в виде  $\Delta E$ , умноженного на 100, где  $E = E(\text{опыт}) - E(\text{контроль})$ . Величина  $\Delta E$  пропорциональна логарифму концентрации антител. В ИФА положительными для каждого класса антител считали значения  $\Delta E$ , умноженные на 100, превышающие в 1,5 раза средние показатели у отрицательных контрольных сывороток.



Предложенный вариант ИФА-антител к хламидиям, принадлежащим к классам иммуноглобулинов G, M и A, может служить дополнительным методом диагностики, в особенности при массовых исследованиях, где выявляются его преимущества перед РНИФ: высокая чувствительность, малое количество анализируемой сыворотки в сочетании с большим числом проб в одной постановке, быстрое получение результата и возможность оценки его как визуально, так и на фотометре. При диагностике хламидийной инфекции методы идентификации возбудителя должны сочетаться с определением антител к хламидиям, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов. Это повысит надежность диагностики и позволит в некоторой степени судить о характере гуморального иммунного ответа на антигены хламидий при исследовании в динамике.

Серологические методы диагностики урогенитальной инфекции, вызванной *C. trachomatis*, продолжают играть важную роль в клинике. Нередко антитела обнаруживаются у больных, у которых хламидии не выявляются другими методами (окраска по Романовскому-Гимзе, ПИФ). Иммуноферментный анализ (ИФА) повысил частоту выявления хламидий при негонококковых уретритах у мужчин и при урогенитальной патологии у женщин. В результате многочисленных исследований установлено, что чувствительность метода ИФА колеблется от 45 до 95%, что связано не только с качеством тест-систем, но и с клинической формой хламидиоза. Выявляемость хламидиоза выше при острых формах инфекционного процесса и высокой активности иммунной системы. Так, у мужчин при острых уретритах чувствительность достигает 96%, а при бессимптомных формах – не превышает 45-50%. В среднем, удается обнаружить антитела против *C. trachomatis* у 55-65% больных хламидиозом (Мавров, 1987; Мавров, Навольнев, 1986). При хронических, стертых, формах инфекции эффективность применения серологической диагностики относительно низка (Горвиц и соавт., 1984).

Наличие антител к хламидиям в сыворотке крови не только свидетельствует о наличии инфекции в организме, но и отражает особенности гуморального иммунного ответа на хламидии (Попович, 1981; Васильченко и соавт, 1984; Мавров, 1987, 1989; Горпинченко, Гибнер, 2000; Возианов, 2002). С целью изучения характера гуморального иммунного ответа на хламидии нами проанализированы взаимоотношения между отдельными классами антител, а также особенности их обнаружения у больных с разными клиническими формами урогенитального хламидиоза. Установлено, что выявление двух или трех классов антител к хламидиям является лучшим маркером активного хламидиоза, чем выявление антител только одного класса. Так, у 60% больных хламидиозом находили антитела двух или трех классов одновременно. Чаще встречались сочетания IgM с IgA (17%) и IgG с IgA (16%), чем IgG с IgM (10%). У 90% больных с осложненными формами хламидиоза выявлялись антитела двух или трех классов. Преобладание того или иного класса антител зависело от давности заболевания хламидиозом. Так, у 78% больных свежим хламидиозом преобладали IgM-антитела, а у 33% этих больных обнаруживались только IgM-антитела и не выявлялись антитела других классов. Уровень антител к хламидиям у отдельных больных сильно различался. Установлена его связь с клинической формой хламидиоза. Низкий уровень антител в ИФА обнаружен у 16-22% больных. Высокий уровень IgG- и IgM-антител выявлен у 28% больных, а высокий уровень IgA-антител – у 36%. Для выяснения динамики уровня антител к хламидиям разных классов определяли IgG-, IgM-, IgA-антитела в парных сыворотках. У 5 больных свежей

хламидийной инфекцией интервал составлял 5-13 суток. У 12 человек с хронической формой заболевания сыворотки исследовались с перерывом в 24-332 суток – во время контроля излеченности или при рецидиве хламидиоза. Таким образом, у больных с рецидивами (реинфекциями) хламидиоза выявлялись высокие уровни антител к хламидиям двух или более классов (Мавров, Навольнев, 1986; Мавров 1987, 1989).

Несмотря на ряд недостатков, метод ИФА оказывается ценным при постановке этиологического диагноза хламидиоза. Так, при хроническом хламидиозе воспалительный процесс может быть обусловлен персистенцией *C. trachomatis* в соединительной ткани подслизистой оболочки половых путей. Это затрудняет диагностику персистентных форм хламидиоза. В случае локализации инфекции в «верхних этажах» урогенитального тракта возбудитель может отсутствовать в доступном для исследования материале. При осложненном хламидиозе средний уровень IgG-, IgM-, IgA-антител к хламидиям выше, чем у больных неосложненным хламидиозом. Для бессимптомной формы хламидиоза характерен более низкий средний уровень IgG-, IgM-, IgA-антител. При этом наиболее низок уровень IgM- и относительно высок уровень IgA-антител (Мавров 1987, 1989).

Лабораторная диагностика хламидиоза может быть проведена на основании выявления антител к хламидиям в секретах половых органов и слезной жидкости. Обнаружение хламидийных антител в цервикальной жидкости может свидетельствовать о хламидийной инфекции, однако не все авторы подтверждают это (McComb et al., 1979; Schachter et al., 1979). При трахоме содержание антител в слезах четко коррелирует с клиническими и микробиологическими показателями активности инфекции (McComb, Nichols, 1969; Treharne et al., 1978). Прием антибиотиков накануне исследования не влияет на выявление антител (Darougar et al., 1978). Вuisman и соавторы (1992) показали, что обнаружение IgA-антител в слезной жидкости является более чувствительным методом диагностики офтальмохламидиоза, по сравнению с обнаружением антигена методом прямой иммунофлуоресценции и выделением хламидий в культуре клеток.

Оценка сероэпидемического статуса популяции с целью определения распространенности урогенитальной хламидийной инфекции чрезвычайно затруднена из-за перекрестных реакций между *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophyla psittaci* и *Chlamydophyla pneumonia* в большинстве тестов для определения антител (Asche et al., 1993). Установление серологического диагноза генитального хламидиоза у лиц с симптомами инфекций верхних дыхательных путей может быть обусловлено перекрестными реакциями с антителами к *C. pneumonia* (Komaroff et al., 1983; 1989; Gray et al., 1986). В случаях, когда диагноз ставится на основании серологического исследования, необходимо использовать видоспецифичные тесты (Moss et al., 1993).

Интерпретация результатов серологического исследования на хламидиоз зависит от формы предполагаемого заболевания, клинических проявлений у данного больного, чувствительности и специфичности самого теста. Антитела к хламидиям могут персистировать длительное время после излечения хламидиоза. Даже с помощью нечувствительной РСК родоспецифические антитела выявляются в течение первого года после перенесенного орнитоза (Hedberg et al., 1993; Гранитов, 2000). После перенесенного воспаления органов малого таза хламидийной этиологии IgG- и IgA-антитела сохраняются в сыворотке крови и в секретах длительное время (Puolakkainen et al., 1986; Piura et al., 1993). Определение IgG-

и IgM-антител к хламидиям в сыворотке крови и секретах половых органов не может быть надежным методом диагностики при неосложненном половом хламидиозе у мужчин и женщин (Meyer, Amortegui, 1987; Nagay et al., 1989). Это было подтверждено тем, что у бессимптомных субъектов наличие антител плохо коррелирует с выявлением антигена и ДНК хламидий (Rabenau et al., 2000).

При осложненных системных хламидиозах, а также восходящей генитальной инфекции выявление антител к хламидиям является важным компонентом лабораторной диагностики (Kosseim, Brunham, 1986; Frost et al., 1987; Akande, 2002). Наибольшее диагностическое значение имеет выявление IgA-антител к хламидиям. Количество антител не является показателем тяжести или активности заболевания (Csango et al., 1988; Scheel, Anestad, 1989; Miettinen et al., 1990; Samra, Softer, 1992; Mattila et al., 1993). Определение IgM-антител является очень важным для диагностики врожденной хламидийной инфекции. В установлении пневмонии новорожденных индикация именно хламидийных IgM-антител в сыворотке крови является решающей при дифференциальной диагностике антител, пассивно переданных плоду от инфицированной матери (Schachter et al., 1982; Puolakkainen et al., 1984; Mahony et al., 1986). У преждевременно родившихся детей наличие IgM-антител в сыворотке крови служит маркером внутриутробной хламидийной инфекции (Numazaki et al., 1986). Следует помнить, что у детей до 10 лет могут быть ложноположительные результаты на IgM-антитела против хламидий в результате неспецифической активации В-системы иммунитета, вызванной вирусом Эпштейн-Барр (Persson, Broms, 1986).

### 11.5.3. Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг позволяет выявить гуморальный иммунный ответ макроорганизма на индивидуальные белки хламидий. Методика иммуноблоттинга хламидий была разработана Batteiger, Newhall и Jones в 1982 году. В последующих исследованиях было показано, что основными перекрестно-реагирующими антигенами *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila psittaci* являются ЛПС, белки массой 57-62 кДа, и MOMP (Mondesire et al., 1989). Сыворотка многих людей, без каких-либо указаний на наличие у них сейчас или в прошлом хламидийной инфекции, реагирует (хотя и слабо) с MOMP *C. trachomatis* в иммуноблоттинге. Сыворотка пациентов с хламидийной инфекцией больше всего реагирует с белками массой 60-62 кДа. Причем степень выраженности этой реакции у реконвалесцентов больше, чем у лиц с острой инфекцией (Newhall et al., 1982; Cevenini et al., 1986). Женщины, у которых после аборта развился сальпингит, реже имели IgA-антитела к белкам 60-62 кДа и IgG-антитела к белкам 75 кДа, по сравнению с женщинами, у которых после аборта сальпингит не развился. Титры этих антител у больных были значительно ниже, чем у здоровых женщин. Так, с помощью иммуноблоттинга было показано, какие антигены вызывают защитный гуморальный иммунный ответ у больных хламидиозом (Brunham et al., 1987). Два наиболее примечательных белка из семейства 60-62 кДа протеинов хламидий – белок наружной мембраны 2 (Omp2) и белок теплового шока Hsp60. Сыворотка почти 100% больных с эктопической беременностью и воспалением органов малого таза реагирует с Omp2 и с Hsp60, соответственно 81% и 31% (Wagar et al., 1990).

## 11.6. ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ХЛАМИДИЙ

Обнаружение специфической нуклеотидной последовательности, присущей только ДНК (или РНК) хламидий, производится методами молекулярной биологии (Peterson et al., 1989). Существует две основные группы методов молекулярно-биологической диагностики хламидийной инфекции: методы прямой зондовой гибридизации и методы с предварительной амплификацией. В данных методах воплощены два важнейших химических и биологических свойства нуклеиновых кислот – способность двух комплементарных нуклеотидных последовательностей взаимно связываться (гибридизироваться) и способность к копированию на основе комплементарности. Методы прямой гибридизации используют первый принцип, а методы амплификации – оба принципа. В последние годы наибольшее развитие получили методы диагностики хламидиоза с амплификацией нуклеиновых кислот – полимеразная цепная реакция (ПЦР), лигазная цепная реакция (ЛЦР), транскрипционная амплификация (ТА) амплификация, основанная на нуклеотидной последовательности (АНП) и метод амплификации со смещением нитей ДНК (АСН).

### 11.6.1. Методы диагностики хламидиоза с прямой гибридизацией нуклеиновых кислот

По сути, любой метод выявления хламидийной ДНК (РНК) с целью диагностики включает этап гибридизации. При прямой гибридизации сигнал генерируется без предварительной амплификации мишени (выявляемой нуклеиновой кислоты), как это происходит в ПЦР, ЛЦР и других методах амплификации (Mapak, 1993). Предложено несколько методик обнаружения *Chlamydia trachomatis* в клинических образцах на основе прямой гибридизации. По показателям чувствительности первые варианты метода уступали культуре клеток (Palva et al., 1984; Nyuria et al., 1985; Dutilh et al., 1988; Meddens et al., 1988; Naher et al., 1988; Puolakainen et al., 1988; Dean et al., 1989; Tuokko et al., 1989; Cano et al., 1991).

Тест-система второго поколения PACE фирмы Gen-Probe для диагностики хламидиоза на основе ДНК-гибридизации появилась в 1988 году. Тест позволял выявить до 10 000 ЭТ хламидий в образце. Эта чувствительность была сравнима с культуральной диагностикой, с МФА и с ИФА (Iwen et al., 1991; Lees et al., 1991; Yang et al., 1991). Высокая чувствительность Gen-Probe PACE-2 обусловлена тем, что мишенью для гибридизации является рибосомальная РНК хламидий, тысячи копий которой содержатся в каждой клетке. Для функционирования хламидийной клетки необходимо многократное копирование рибосомальной РНК (rРНК), что с точки зрения анализа нуклеиновых кислот можно рассматривать как природную «пре-амплификацию». Поскольку rРНК одиночная, а не двойная нить, нет необходимости в термальной денатурации перед гибридизацией (обычно это занимает 60 минут при 60°C). Поэтому весь анализ занимает около двух часов (рис. 11.3).

Этот тест получил распространение в развитых странах в 90-х годах. Для его проведения не требуется сложного оборудования, кроме люменометра LEADER®. Зонд, меченный эстером акридина, при добавлении перекиси водорода генерирует световой сигнал, который регистрируется люменометром. Тест постоянно совершенствуется. Было уменьшено количество транспортной среды, чтобы увеличить чувствительность, и введен конкурентный зонд для подтверждения положительных результатов, чтобы исключить ложноположительные реакции (Woods, Garza 1996).



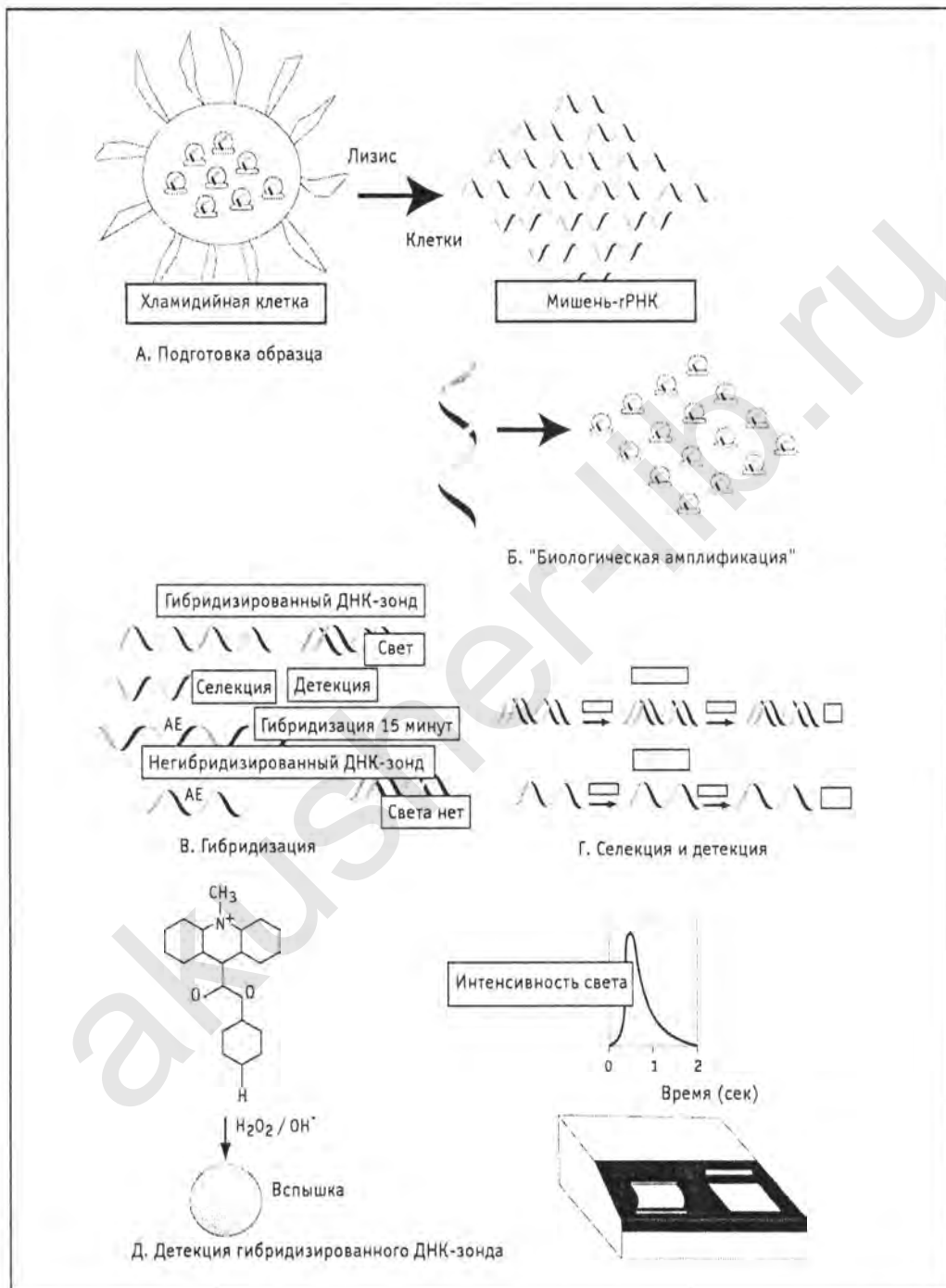


Рисунок 11.3. РНК-ДНК-гибридизация при выявлении *Chlamydia trachomatis* с помощью теста Gen-Probe PACE-2.

Хотя Doing и соавторы (1999) при исследовании 493 женщин не нашли достоверной разницы в чувствительности и специфичности Abbot LCx и PACE-2, все же очевидно, что чувствительность методов прямой гибридизации не такая высокая, как методов с предварительной амплификацией. Поэтому лучше исследовать соскобы, чтобы в образце было достаточно клеток, инфицированных хламидиями. Так, между количеством эндоцервикальных клеток в образце и чувствительностью тестов гибридизации имеется прямая функциональная зависимость (Beebe et al., 1999). Для улучшения аналитических показателей тестов, основанных на выявлении нуклеиновых кислот, можно применить дополнительные методы очистки ДНК при обработке образцов (Gossack, Beeb, 1998).

Wylie и соавторы (1998) сравнили Chlamydiazyme® (Abbott Laboratories) – иммуноферментный метод определения антигена *C. trachomatis*, и PACE-2 при выявлении хламидиоза у 787 женщин. Метод AMP CT (Gen-Probe), основанный на амплификации, служил в качестве референс-метода. Чувствительность PACE-2 была 79,3%, а Chlamydiazyme – 63,4%. Специфичность обоих тестов приближалась к 100%. Хламидиоз был выявлен у 10,4% женщин. Lauderdale и соавторы (1999) собрали по одному образцу мочи и по четыре эндоцервикальных соскоба 787 женщин – пациенток акушерско-гинекологических клиник. Сравнивали Clearview® (Wampole Laboratories) – быстрый ИФА-тест, PACE-2, AMP CT (Gen-Probe) и LCx® (Abbott). Положительным стандартом считали положительный результат трех тестов. Чувствительность составила, соответственно, 50%, 81%, 97% и 100%. Распространенность хламидиоза была 8,4%. Таким образом, амплификационные тесты показали наибольшую чувствительность. Преимуществом прямой гибридизации было то, что при относительно высокой чувствительности она проста и недорога. Что касается экспресс-ИФА, то несмотря на простоту (результат можно получить прямо в кабинете врача), она оказалась неприменимой из-за низкой чувствительности.

В конце 90-х годов появился новый тест на основе гибридизации для выявления *C. trachomatis* Digene HybridCapture® II (Digene Corporation of Gaithersburg, Maryland, USA.). В набор входят специальные конические щеточки для взятия образцов у беременных и небеременных женщин. Тест производится в микротитровальном планшете. Образцы лизируются щелочью – для высвобождения и денатурации ДНК, а также разрушения РНК. Добавляется РНК-зонд для специфической ДНК-мишени, осуществляется гибридизация, гибрид захватывается на твердую фазу при помощи антител. Затем другие антитела, меченные щелочной фосфатазой, связываются с гибридом, фиксированным на твердой фазе. После промывания добавляется диоксетан в качестве субстрата. При ферментативной реакции генерируется хемилюминесцентный сигнал. Иммуноферментный способ детекции гибридизации является удобным, поскольку все лаборатории имеют оборудование и опыт работы с ИФА. Имеются данные об обследовании 1746 пациентов из двух центров. Чувствительность превысила PACE-2 и приблизилась к ПЦР (Modarress et al., 1998; Girdner et al., 1999). Другое многоцентровое Digene тест-исследование 1370 женщин показало, что чувствительность и специфичность, по сравнению с культурой клеток, была 97,7% и 98,2% соответственно. При применении дискретивного анализа, по сравнению с ПЦР, культурой и микроиммунофлуоресценцией, чувствительность и специфичность Digene Hybrid Capture II (HC II) CT/GC была 94,8% и 99,8% при анализе цервикальных образцов, тогда как, чувствительность культуры клеток – 83,6% (Schachter et al., 1999).

Для определения ДНК хламидий часто используют весьма информативный метод точечной гибридизации (дот-гибридизации) нуклеиновых кислот на твердой фазе с использованием ДНК-зонда, меченного биотином.

**Проведение анализа:**

Из исследуемых образцов выделяют суммарную ДНК. Образцы исследуемой ДНК и контрольные образцы денатурируют кипячением, фиксируют на нитроцеллюлозном фильтре и гибридизуют с предварительно денатурированным и «биотинированным» ДНК-зондом. Несвязавшийся зонд удаляют путем отмывки фильтра. На следующем этапе фильтр обрабатывают конъюгатом стрептавидина со щелочной фосфатазой. На заключительном этапе вносят субстратный раствор. Окрашивание соответствующих точек свидетельствует о наличии тестируемой ДНК в исследуемом материале. Рабочие растворы готовят согласно инструкции предприятия-изготовителя тест-системы. Клинические образцы (соскобы слизистой оболочки, взвеси тканей и др.) суспензируют в физиологическом растворе и центрифугируют при 3000 об/мин 10 мин., надосадочную жидкость сливают, а оставшуюся суспензию клеток хранят в замороженном виде до проведения анализа.

В чашку Петри с 10-15 мл дистиллированной воды помещают нитроцеллюлозный фильтр на 5-10 мин до полного смачивания. Мокрый фильтр переносят в другую чашку с 4 мл раствора SSC (Saline Sodium-Calcium) (10 x SSC), разведенного в 10 раз. Выдерживают 10 минут и подсушивают на воздухе на фильтровальной бумаге. 100 мкл суспензии клеток анализируемого материала смешивают с равным объемом лизирующего раствора, тщательно перемешивают и выдерживают 3 часа при 37-40°C и 5 мин при 60°C. Затем добавляют 0,05 мл ацетата калия, перемешивают и выдерживают 30 мин при температуре от 0 до +4°C, после чего центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок перемешивают на воздухе и растворяют в 10 мкл раствора 10 x SSC. Подготовительные пробы, положительный и отрицательный контроли денатурируют на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем быстро переносят пробирки в баню «лед-вода» на 5 мин и наносят на подготовленный фильтр по 2 мкл в пятно. Фильтр высушивают на воздухе и запекают при 80°C в течение 2 часов. Далее фильтр с пробами смачивают в дистиллированной воде, переносят в чашку Петри и заливают сверху 10 мл блокирующего раствора. Фильтр инкубируют 1 час при комнатной температуре на качалке, затем блокирующий раствор сливают, а фильтр заливают 5 мл гибридизационного раствора. При этом необходимо тщательно закрыть чашку Петри для избежания испарения гибридизационного раствора. Гибридизацию проводят при 42°C в течение 12-15 ч в термостате. Фильтр ополаскивают от несвязавшегося зонда путем трехкратной инкубации по 10 мин в промывочном растворе при комнатной температуре. Далее фильтр инкубируют 15 мин в водяной бане при температуре 60°C в промывочном растворе и один раз в течение 5 мин при комнатной температуре в растворе TST. Для блокирования неспецифического связывания конъюгата фильтр заливают 10 мл раствора для блокирования и выдерживают 0,5 ч при комнатной температуре на шейкере. Далее фильтр ополаскивают раствором TST и выдерживают в 6 мл рабочего раствора конъюгата в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем фильтр 3 раза по 10 мин промывают в растворе TST и один раз в растворе для приготовления проявляющей смеси. Фильтр заливают 5 мл проявляющей смеси с субстратом и хромогеном и выдерживают в темноте при 20°C в течение нескольких часов до появления окраски. Фильтр промывают дистиллированной водой для остановки проявления и высушивают.

**Учет результатов:**

Результаты гибридизации оценивают визуально путем сравнения с интенсивностью окраски пятен контрольных проб. Положительными считаются образцы, имеющие окраску пятна, отчетливо отличающуюся вследствие большей интенсивности от фоновой окраски.

На 10-м международном симпозиуме по хламидийным инфекциям (июнь, 2002, Сан-Франциско, США) две группы исследователей из Германии под руководством Porper и Horn сообщили о разработке иерархического набора флуоресцентных ДНК-зондов, которые могут выявлять как всех представителей *Chlamydiales*, так и дифференцированно, отдельные

виды хламидий в соответствии с новой классификацией – роды *Chlamydia*, *Chlamydophila* и новые роды *Neochlamydia* и *Parachlamydia* (табл. 11.1). Метод получил название FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), или метод флуоресцентных ДНК-зондов (МФЗ). Он предназначен для использования в научных исследованиях, а не для рутинной диагностики (Poppert et al., 2002b). Была показана высокая чувствительность и специфичность метода МФЗ при изучении смешанной инфекции клеток HeLa 229 двумя видами хламидий – *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae*, а также экспериментальной инфекции амёб представителем *Parachlamydia* (штамм UWE25).

Поскольку МФЗ направлен на выявление рибосомальной РНК, он выявляет только живые, функционирующие хламидии, в которых осуществляется синтез белка. Этот метод может быть чрезвычайно полезен для исследования инфекций, вызываемых вновь открытыми представителями порядка *Chlamydiales* (Horn et al., 2000; Horn, Wagner, 2001; Poppert et al., 2002).

Таблица 11.1.

**Олигонуклеотидные зонды, специфические для рибосомальной РНК представителей *Chlamydiales* (Poppert et al., 2002)**

Зонд	Мишень	Последовательность (5' – 3')
S-O-Chls-0523-a-A-18*	<i>Chlamydiales</i>	CCTCCGTATTACCGCAGC
S-F-Chlae-0574-a-A-18	<i>Chlamydiaceae</i>	CTTCCGCCTACACGCCC
S-G-Chla-0232-A-18	<i>Chlamydia</i>	TAGCTGATATCACATAGA
S-G-Chlph-0583-a-A-18	<i>Chlamydophila</i>	CTAACTTTCCTTCCGCC
S-S-Ct-0623-a-A-18	<i>C. trachomatis</i>	ATTAGATGCCGACTCGGG
S-S-Cpn-0214-a-A-18°	<i>C. pneumoniae</i>	CTCTCCCTCAACCGAAAG
S-S-Cpn-0974-a-A-18§	<i>C. pneumoniae</i>	AAGTCCAGGTAAGGTCTT
S-S-Cps-1414-a-A-18	<i>C. psittaci</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. abortus</i> , <i>C. suis</i>	AAGGCAAAACCAACTCCC
S-S-Cps-1353-a-A-18	<i>C. psittaci</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. abortus</i> , <i>C. suis</i>	GGCGTTATAGCTGACACG
Bn9658	<i>Parachlamydiaceae</i>	TCCGTTTTCTCCGCCCTAC
S-+-ParaC-0658-a-A-18	<i>Parachlamydiaceae</i>	TCCATTTTCTCCGTCTAC

\* Используется в комбинации с конкурентным зондом 5'-CCTCCGTATTACCGCGGC-3'

° Используется в комбинации с конкурентными зондами 5'-CTCTCCCTCAACCGAAAG-3' и 5'-CTCTCCCTCAACCGAAAG-3'

§ Используется в комбинации с конкурентным зондом 5'-AAACCCAGGTAAGGTCTT-3'

### 11.6.2. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот

Методы амплификации ДНК и РНК постепенно становятся в развитых странах основными методами диагностики хламидийных инфекций. Количество коммерчески доступных, относительно недорогих тестов стремительно растет. Эти тесты более чувствительны, чем жидкостная или твердофазная гибридизация (Walker, Little, 1993; Lisby et al., 1999; Chernesky, 1999; 2002; Ostergaard, 1999). Обычно мишенями амплификации являются последовательности, которые имеются в хламидийной клетке во многих копиях – плазмиды или рибосомальная РНК. Матричная РНК более лабильная, чем ДНК, и не используется в диагностике. Выявление матричной РНК применяют в научных исследованиях, поскольку ее обнаружение указывает на



синтез белка в хламидийной клетке, а это означает, что обнаруженные хламидии живы и активно функционируют (Birch et al., 2001). Рибосомальная РНК более стабильна, и каждая клетка содержит несколько тысяч копий этой РНК. Поэтому она чаще всего используется для диагностических целей. Roche AmpliCor® PCR была первой коммерчески доступной системой для диагностики хламидийной инфекции методом ПЦР. Лигазная цепная реакция (первая система – Abbott LCx®) выявляет хламидийную ДНК на основе лигации (сшивания) *Chlamydia*-специфичных олигонуклеотидных зондов, которые служат в качестве первичной мишени для амплификации. Впервые изотермальная и одноэтапная амплификация, основанная на транскрипции, была описана Guatelli и соавторами в 1990 году. Процесс был смоделирован на ферментах, необходимых для репликации ретровирусов – рибонуклеазе H, обратной транскриптазе, ДНК-зависимой РНК полимеразе. Эти продукты затем послужили в качестве матрицы для транскрипции и обратной транскрипции, что позволило увеличить количество РНК-копий в десять миллионов раз (Walker et al., 1992; Chan, Fox, 1999). На основе этой технологии, которая получила название транскрипционная амплификация, были созданы две коммерческие тест-системы Transcription Mediated Amplification – TMA (Gen-Probe AMP-CT) и Nucleic Acid Sequence Based Amplification – NASBA (Organon Teknica Nuclisens). В отличие от обычной ПЦР (с помощью обратной транскриптазы), эти системы изотермальные – т.е. не требуют термальных циклов. В NASBA продуктом является антисмысловая одиночная нить РНК, поэтому денатурация в данном случае не нужна (Walker et al., 1992). NASBA отличается от TMA тем, что используется рибонуклеаза H, наряду с обратной транскриптазой и T7 РНК полимеразой. Амплификация в тестах NASBA и TMA более сильная, поскольку имеет место не удвоение числа копий, а их экспоненциальный рост (Chan, Fox, 1999). Недавно был разработан изотермальный метод амплификации ДНК со смещением нитей ДНК-зонда (strand displacement amplification – SDA) (Walker et al., 1992; 1992a; Walker, 1993; Spears et al., 1997). На основе этой технологии была разработана диагностическая система для инфекций, вызванных *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*, – BDProbeTec®ET (Becton Dickinson, USA) (Little et al., 1999; Stary 2000; Cheng et al., 2001; van der Pol et al., 2001).

### Полимеразная цепная реакция

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) придумал в 1983 году биохимик Kary Mullis, разработавший метод амплификации необходимого участка нуклеиновой кислоты. За эти исследования он вместе с коллегами получил Нобелевскую премию по химии в 1993 году. Метод был сразу же запатентован компанией Hoffman-La Roche. Первая публикация, посвященная выявлению дефектного участка гена гемоглобина для диагностики серповидноклеточной анемии, появилась в 1985 году в журнале Science (Saiki et al., 1985). AMPLICOR® PCR *C. trachomatis* была первой коммерческой тест-системой на основе ПЦР для диагностики хламидиоза. Метод ПЦР основан на том, что в исследуемый образец, предположительно содержащий хламидии, вносятся синтезированные в лаборатории нуклеотидные последовательности (праймеры), комплементарные генетическому материалу хламидий (Saiki et al., 1988; Birkenmeyer, Mushahwar, 1991). Такие праймеры способны комплементарно взаимодействовать с геномной ДНК (или РНК) хламидий. Если исследуемую пробу подвергнуть температурной обработке, то двуспиральная хламидийная ДНК денатурирует и станет доступной взаимодействию двух праймеров, комплементарных определенной зоне геномной ДНК. Если подвергать такой образец повторным циклам денатурации ДНК и ренатурации

(при которой происходит специфическое связывание двух олигонуклеотидных праймеров с соответствующей зоной ДНК, при наличии дезокси-трифосфатов и термофильной ДНК-полимеразы), то происходит избирательное размножение (амплификация) определенного, характерного только для хламидий участка ДНК, который задается используемыми праймерами. Полученная ДНК выявляется электрофоретическим методом. В последние годы этот метод лабораторной диагностики хламидий стал широко использоваться в клинической практике (Белозоров, и соавт., 2001; Білозоров, та спіавт., 2002).

**Методика проведения полимеразной цепной реакции имеет 3 стадии:** (Walker, Little, 1993)

- 1) выделение ДНК из биологического материала (подготовка пробы);
- 2) проведение полимеразной цепной реакции (амплификация);
- 3) детекция продуктов амплификации.

### **1). Выделение нуклеиновых кислот из биологического материала**

Для выделения ДНК существуют разнообразные методы, и выбор их зависит от поставленных задач, от характера биологического материала, степени его загрязнения ингибиторами полимеразной цепной реакции. К ДНК, выделенной для использования в полимеразной цепной реакции, предъявляют определенные требования. Метод, выбираемый для выделения ДНК, должен обеспечивать высокую степень очистки образца от веществ, способных помешать проведению ПЦР. Вместе с тем процесс выделения ДНК должен содержать минимально возможное число этапов, что уменьшает потенциальную опасность контаминации (загрязнения), как биологического материала, так и ДНК в процессе его обработки (Kwok, Higuchi, 1989). Классическим методом очистки ДНК является лизис клеток с помощью SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецил-сульфата натрия и протеиназы К с последующей экстракцией фенол-хлороформом и осаждением в этаноле (Claas et al., 1990; Wu et al., 1992). Однако этот метод трудоемкий, и при нем теряется значительная часть ДНК. Более простой способ – кипячение образцов с предварительным центрифугированием (Naher et al., 1991; Talley et al., 1992). Этот метод не удаляет ингибиторы, что снижает чувствительность ПЦР.

### **2). Проведение полимеразной цепной реакции**

Механизм ПЦР основан на естественной репликации (удвоении) ДНК, включающей: расхождение нитей ДНК и комплементарное достраивание обеих нитей. В реакции участвуют: пара искусственно синтезированных олигонуклеотидов, повторяющих строение специфического участка гена хламидий, четыре дезокси-нуклеотидтрифосфата (дНТФ) в буферной смеси, анализируемый образец, который может содержать ДНК хламидий и фермент Таг-полимеразу. Полимеразная цепная реакция состоит из повторяющихся циклов, каждый из которых включает: 1) денатурацию матрицы, 2) отжиг (присоединение к матрице) праймеров и 3) полимеризацию в виде достройки второй цепи фрагмента с помощью ДНК-полимеразы. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат матрицей для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации – это и есть цепная реакция. В конечном итоге количество амплифицируемых фрагментов ДНК возрастает в геометрической прогрессии. Иными словами, в результате 35-45 циклов амплификации из 1-10 копий ДНК нарабатывается до  $10^8$  копий фрагмента, достаточного для визуального учета реакции методом электрофореза в агарозном геле. Для постановки ПЦР используют реакционную смесь, в состав которой входят следующие компоненты. Праймеры – это короткие (не более 20-30 оснований) синтезированные участки последовательности ДНК, комплементарные специфическим фрагментам копируемой ДНК.

матрицы. Праймеры синтезируют соответственно консервативным участкам ДНК хламидий, что обеспечивает их максимальную специфичность. Праймеры содержат повторяющиеся последовательности. Подбор праймеров производят на основании анализа олигонуклеотидной последовательности амплифицированного участка.

Правильный выбор праймеров является ключевым. Обычно мишенями амплификации являются участки трех генов – гена *MOMP*, *16S-rРНК*-гена и гена плазмиды хламидий. Системы, выявляющие *16S-rРНК* хламидий, менее чувствительны, а системы, обнаруживающие плазмиду, наиболее чувствительны (Mahony et al., 1993; Roosendaal et al., 1993). Тесты, основанные на обнаружении плазмиды, могут давать отрицательный результат, если инфекция вызвана штаммом хламидий, лишенным плазмиды. Такие штаммы *S. trachomatis*, вызывающие урогенитальную патологию, обнаружены (Peterson et al., 1990; An et al., 1992).

Для обнаружения, идентификации и таксономической характеристики хламидий используется ПЦР с несколькими системами праймеров (Everett et al., 1997, 1999; Белозоров, 2001). Пара праймеров, которая выявляет все семейства порядка *Chlamydiales*:

**U23F 5'GATGCCCTTGGCATTGATAGCGGATGAAGGA 3'**  
**23SIGR 5'TGGCTCATCATGCCAAAAGGCA 3'**

**U23F** соответствует последовательности сразу же после старта *23S-rRNA*-гена, а **23SIGR** комплементарен последовательности приблизительно 600 оснований. Три пары праймеров специфичны только для семейства *Chlamydiaceae*:

**IGF 5'GACTAGGTTGGGCAAG 3'**  
**IGR 5'AGCTCTTA(T/G/A/)(C/T)AACTTGGTCTGTA 3'**

**IGF** – соответствует началу межгенного спейсера между генами *16S-rRNA* и *23S-rRNA* всех известных *Chlamydiaceae*, **IGR** – перекрывает стартовый сайт *23S-rRNA*-гена всех известных *Chlamydiaceae*:

**1260 5'CGCTTAATC(A/GOA(T/C)GAAAGAGCTGCTCA 3'**  
**TGLY 5'GGCTACAGCTCTACCATTGA 3'**

**1260** распознает стартовый участок за 48 оснований перед стоп-кодоном, **TGLY** комплементарен *tRNA*, локализованному за 270 пар оснований от стоп-кодона *otrA* у всех известных *Chlamydiaceae*. Праймеры, специфичные для участка гена *23S-rRNA* всех известных *Chlamydiaceae*:

**TQF 5'GAAAAGAACCCCTGTTAAGGGAG 3'**  
**TQR 5'CTTAACCCCTGGCTCATCATG 3'**

Термостабильная *Taq*-полимераза, присоединяясь к 3'-концам праймеров, достраивает их по принципу комплементарности до заданной длины в несколько сотен или тысяч пар оснований.

Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозин-трифосфат (дАТФ), дезоксигуанозин-трифосфат (дГТФ), дезоксицитозин-трифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – «строительный материал», используемый *Taq*-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК.

Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих стабильное значение pH и оптимальные условия для работы фермента.

Минеральное масло – вспомогательный компонент, который предотвращает испарение реакционной смеси в процессе проведения реакции.

Состав и концентрация основных компонентов реакционной смеси значительно влияют на специфичность и чувствительность реакции. Существует комплекс формул (или компьютерные программы) для

расчета состава реакционной смеси. Однако взаимоотношение компонентов реакционной смеси настолько сложно, что многое при создании тест-системы определяется экспериментальным путем, эмпирически. В связи с этим, детальная информация о компонентах тест-системы обычно является коммерческой тайной производителя тест-системы.

**Постановка амплификации.** Сам процесс полимеразной цепной реакции протекает в амплификаторе – регулируемом термостате, и состоит из трех этапов: денатурации матрицы, отжига (присоединения) праймеров, и полимеризации в виде достройки второй цепи фрагмента ДНК.

**Денатурация.** На первом этапе две цепочки ДНК разъединяются путем нагревания ДНК до 92-95°C. Нагревание реакционной смеси позволяет разрушить относительно слабые связи, соединяющие две нити ДНК. В результате нагревания двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул. В результате расплетения двойной спирали на первом этапе образуются две нити ДНК, к которым в последующем присоединяются праймеры.

**Отжиг (присоединение) праймеров.** Название «отжиг» происходит от английского термина, используемого в металлургии – «annealing», означающий отжиг-охлаждение сплавов в определенном режиме. В ходе второй стадии происходит охлаждение реакционной смеси до температуры, оптимальной для присоединения праймеров к участку ДНК. Праймеры присоединяются по одному на каждую цепь в направлении с 3'-конца амплифицируемого участка ДНК. Присоединение праймеров происходит в соответствии с принципом комплементарности (правило Чаргаффа), который заключается в том, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. При несоблюдении этого условия отжига праймеров не происходит. Специфичность и чувствительность полимеразной цепной реакции зависит от температуры отжига праймеров. Значение этой температуры располагается в интервале от 45 до 65°C – оптимальной для присоединения праймеров к участку ДНК. Для каждой пары праймеров температура отжига индивидуальна, что обеспечивает дополнительную специфичность. При падении температуры отжига праймеров ниже оптимальной повышается амплификация неспецифических ДНК-фрагментов, что приводит к ложноположительным результатам. При поднятии температуры отжига выше оптимальной, когда праймеры не в состоянии взаимодействовать с ДНК-матрицей, снижается выход специфической амплифицируемой ДНК вплоть до ее полного исчезновения, что приводит к ложноотрицательным результатам. Второй этап заканчивается образованием стартовых блоков для дальнейшего синтеза ДНК.

**Полимеризация** – непосредственно синтез фрагмента ДНК, который протекает с участием термостабильного фермента – Taq-полимеразы путем комплементарного достраивания цепей ДНК. Специфические фрагменты ДНК, ограниченные на концах праймерами, являются стартовыми блоками для синтеза фрагмента ДНК. Комплементарное достраивание нитей ДНК начинается от 5'-конца к 3'-концу нити ДНК и происходит в противоположных друг другу направлениях на разных цепях. Синтез ДНК начинается при температуре от 60 до 72°C, но оптимальной температурой для достройки праймеров считают 72°C, при которой Taq-полимераза проявляет свою максимальную активность и значительно снижается риск неспецифической амплификации. Образовавшиеся в первом цикле амплификации продукты синтеза полностью идентичны базовой последовательности и служат матрицами для второго цикла амплификации. Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). При каждом цикле происходит двукратное увеличение числа синтезированных копий участка ДНК, и содержание количества специфического фрагмента ДНК нарастает в геометрической прогрессии.



### 3). Детекция продуктов амплификации

Заключительной стадией ПЦР является обнаружение продуктов ПЦР. Для детекции продуктов амплификации используют ряд способов: а) вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле (для продуктов амплификации размером не более 200 пар нуклеотидов); б) горизонтальный электрофорез в агарозном геле (для продуктов амплификации размером более 200 п.н.); в) твердофазная гибридизация со специфическим олигонуклеотидным зондом. Наиболее распространенным является метод электрофореза с использованием геля, основанный на разделении молекул ДНК по размеру. Присутствие специфического ПЦР-продукта в подавляющем большинстве случаев детектируют электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенном бромистым этидием агарозном геле. Для этого готовят пластину агарозного геля, представляющего собой застывшую после расплавления в электрофорезном буфере агарозу в концентрации 1,5-2,5% с добавлением специального красителя ДНК, например бромистого этидия. Застывшая агароза образует пространственную решетку. При заливке с помощью гребенки в геле формируют специальные лунки, в которые в дальнейшем вносят продукты амплификации. Пластину геля помещают в аппарат для горизонтального гель-электрофореза и подключают источник постоянного напряжения. Отрицательно заряженная ДНК начинает двигаться в геле от «минуса» к «плюсу». При этом более короткие молекулы ДНК движутся быстрее, чем длинные. На скорость движения ДНК в геле влияет концентрация агарозы, напряженность электрофоретического поля, температура, состав электрофорезного буфера и количество гуанина и цитозина в составе ДНК. Все молекулы одного размера движутся с одинаковой скоростью. Краситель встраивается (интеркалирует) плоскостными группами в молекулы ДНК. После окончания электрофореза, продолжающегося от 10 минут до 20 минут, гель помещают на фильтр трансиллюминатора, излучающего свет в ультрафиолетовом диапазоне (254-310 нм). Энергия ультрафиолета, поглощаемая ДНК в области 260 нм, передается на краситель, заставляя его флуоресцировать в оранжево-красной области видимого света (590 нм). По появлению в исследуемом образце светящейся полосы, характерной по форме и расположению для полосы положительного контроля, говорят о наличии искомой ДНК. Чаще для обнаружения продуктов ПЦР посредством электрофоретического разделения используют агарозу определенных марок.

Твердофазная (мембранная) гибридизация со специфическим олигонуклеотидным зондом является более чувствительной, но трудоемкой по сравнению с электрофорезом, однако она позволяет не только выявить ампликон, но и оценить специфичность реакции. Использование в качестве твердой фазы микротитровальных планшетов или иммуномагнитных шариков для выявления ДНК с помощью иммуноферментного анализа позволяет несколько ускорить и упростить процедуру (Wahlberg et al., 1990; Bobo et al., 1990; 1991; Loeffelholz et al., 1992; Manak, 1993).

Факторы, влияющие на качество полимеразной цепной реакции:

#### 1. Ложноположительные результаты:

- контаминация;
- образование неспецифических продуктов амплификации.

#### 2. Ложноотрицательные результаты:

- наличие ингибиторов ПЦР в биологическом образце;
- несоблюдение правил получения биологического материала;
- несоблюдение правил хранения и транспортировки биологических образцов;
- нарушение инструкций по использованию тест-систем и применение некачественных реактивов.

Контаминация – это попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических молекул ДНК, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные результаты. Источником специфических продуктов ДНК могут служить: положительная ДНК клинических образцов; ДНК-стандарт, используемый в качестве положительного контроля; специфические продукты амплификации ДНК – ампликоны, накапливающиеся в огромных количествах в процессе амплификации. Существуют 3 вида контаминации: а) перекрестная контаминация от пробы к пробе, приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов; б) контаминация рекомбинантными плазмидами, содержащими клонированные последовательности хламидийных генов; в) контаминация продуктами амплификации (ампликонами). Ампликоны являются наиболее частой причиной ложноположительных результатов, поскольку в процессе ПЦР-диагностики они накапливаются в больших количествах и очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы. Оседая на лабораторном оборудовании, инструментах (посуда, автоматические пипетки, пробирки и др.) и даже на коже и одежде сотрудников, они служат источником загрязнения реакционной смеси, являясь мишенями для амплификации.

Существуют несколько способов инактивации ампликонов. Ферментативный способ. В основе этого способа лежит способность фермента N-урацил-гликозилазы (УГ) расщеплять молекулы ДНК со встроенным урацилом. Реакцию амплификации проводят с использованием смеси дНТФ, в которой дТТФ заменен на урацил, и после термоциклирования все образующиеся в пробирке ампликоны будут содержать урацил. Если до амплификации в реакционную смесь добавить УГ, то попавшие в реакционную смесь ранее амплифицированные фрагменты ДНК будут разрушены, тогда как нативная ДНК останется целой и будет в дальнейшем служить мишенью для амплификации. Фотохимический способ – для инактивации ампликонов используют фотохимическое воздействие на молекулы ДНК жестким ультрафиолетовым излучением. Оба эти метода лишь в некоторой степени позволяют устранить одну из причин контаминации и не гарантируют от ложноположительных результатов. Остается риск кросс-контаминации от образца к образцу в процессе подготовки пробы. В связи с этим наиболее радикальным средством борьбы с контаминацией является заранее продуманная организация лаборатории. Это понятие включает в себя: а) планирование и оборудование помещений; б) соблюдение правил работы с микроорганизмами I-IV групп патогенности; в) требования к проведению ПЦР-анализа (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995).

Для контроля на ложноположительные реакции используют внутренний контроль, который состоит из ДНК неинфекционной природы, имеющей одинаковый участок связывания праймера с выявляемой хламидийной ДНК, но различный участок связывания зонда. Этот контроль позволяет выявить ампликоны (Rosenstraus et al., 1998). Для выявления циклов амплификации, где могут присутствовать ампликоны, предложен математический метод, основанный на элементарной теории вероятности. С помощью биномиального распределения и распределения Пуассона (Poisson), а также кластерного анализа вычисляется вероятность определенных результатов для каждой лаборатории. В случае отклонения образцы подвергаются дополнительному анализу (Shapiro, 1999).

Неспецифические продукты амплификации. В обычной ПЦР, когда смешение компонентов реакционной смеси происходит при температуре меньшей, чем температура денатурации, может происходить неспецифический отжиг праймеров и в результате – образование

неспецифического продукта и праймер-димеров. Неспецифические продукты, образовавшиеся либо на этапе смешивания, либо в ходе первых циклов, амплифицируются на протяжении всех оставшихся циклов ПЦР. Такой образец при учете реакции принимается за положительный. Чтобы уменьшить риск образования неспецифических продуктов амплификации и повысить специфичность ПЦР применяют технику «горячий старт» (Hot-start). Суть его состоит в предотвращении возможности начала реакции до момента достижения в пробирке условий, обеспечивающих специфический отжиг праймеров.

Биологические ткани и жидкости могут содержать компоненты, ингибирующие проведение полимеразной цепной реакции, что может вызвать ложноотрицательные результаты. Применяемые методы выделения и очистки ДНК из биологических образцов не всегда позволяют удалить ингибиторы, в результате чего эффективность реакции может снижаться. В некоторых случаях образование специфических ампликонов не происходит даже при наличии в образце хламидий – т.е. наблюдается ложноотрицательный результат. Ингибирующими свойствами обладают лекарственные препараты, попавшие в пробу – например, антибиотики, противовирусные sodium lauryl sulfate (SLS) и dextran sulfate (DS), антикоагулянты – ЭДТЛ и гепарин, мыльные растворы (сапонаты), используемые для гигиенических процедур. Часто ингибиторами ПЦР являются низкомолекулярные вещества. Ингибитором может быть цервикальная слизь, иммуноглобулин G, большое количество лейкоцитов (в частности, за счет содержания в них лактоферрина и лейкоцитарной ДНК). В моче веществами, блокирующими термостабильную полимеразу, могут быть хорионический гонадотропин, нитриты, кристаллы солей, мочевины. Частота ингибирования зависит от характера материала, используемого для исследования. Ингибирование редко наблюдается в пробах мочи, относительно редко – в пробах цервикального материала, но достаточно часто – в пробах из уретры. Активность ингибиторов можно снизить на стадии подготовки биологических образцов посредством использования определенных приемов при подготовке проб:

- Взятие материала в фосфатный буфер (pH > 7,5).
- Температурная обработка.
- 10-кратное разведение.
- Отсроченная обработка проб – после хранения в течение 2-5 дней при +4°C.
- Замораживание-оттаивание проб перед анализом.

Совершенствование диагностических тест-систем сводит ингибирование до вполне приемлемого уровня (потери от него оказываются более низкими, чем таковые от неправильной подготовки пациента, неудачного взятия материала и т.п.). Без использования мер, предотвращающих ингибирование, частота ингибирования может достигать, по разным данным, от 7 до 12% (сопоставление с культуральным методом) (Скрипкин, и соавт. 1996; Чочия и соавт., 2001; Возианов и соавт., 2002; Ващенко, 2002). Для контроля ингибирования параллельно при постановке теста используют праймеры, консервативные участки генов человека, например ген гемоглобина или ген HLA класса II (Ratti et al., 1992; Tabrizi et al., 1993). Mahoney и соавторы (1998) исследовали мочу 101 беременной женщины и 287 небеременных женщин на *Chlamydia trachomatis* с помощью тестов амплификации AMPLICOR CT/NG, *Chlamydia* LCX и *Chlamydia* TMA. Предварительно в образцы мочи было добавлено по одному элементарному тельцу хламидий, чтобы сделать все пробы заведомо положительными,

но содержащими минимальное количество возбудителя. Полное ингибирование амплификации наблюдалось в 4,9% для ПЦР; 2,6% – для ЛЦР и 7,5% – для транскрипционной амплификации. Только для ПЦР у беременных ингибиторы в моче встречались чаще, чем у небеременных (соответственно, 9,9% и 3,1%;  $P=0.011$ ). С помощью регрессивного анализа было показано, что ингибирующие свойства мочи женщин были связаны с хориальным гонадотропином бета, кристаллами мочево́й кислоты, гемоглобином, нитритами. При разведении образцов 1:10 или хранении их при температуре от +4 до -70°C ингибирующие свойства мочи теряются в 84%. Образцы мочи, взятые в конце менструального цикла, наиболее оптимальны для скрининга бессимптомных женщин методом ПЦР (Moller et al., 1999).

Для обеспечения качества диагностики важно соблюдать правила забора и транспортировки биологического материала на основе принципов GLP (Good Laboratory Practice), опирающихся на требования Европейского сообщества по GLP для биомедицинских исследований. Применение их основывается на соблюдении общих принципов правильного забора и транспортировки клинического материала, а также мерах безопасности. При сборе материала для исследования методом ПЦР следует принимать во внимание биологические свойства возбудителя: хламидии относятся к внутриклеточным микроорганизмам и проявляют тропизм к клеткам призматического эпителия, который выстилает уrogenитальный тракт, заднюю стенку глотки, прямую кишку и конъюнктиву глаз. В связи с этим материал для исследования на хламидии получают путем соскоба со слизистой передней уретры на глубине 4-6 см у мужчин и 1,5 см – из цервикального канала шейки матки и уретры у женщин. Перед получением материала обследуемый должен воздержаться от мочеиспускания в течение 2-3 часов. Непосредственно перед взятием пробы необходимо очистить участки слизистой предполагаемого очага воспаления от присутствия гноя и слизи. Забор производится в пластиковые одноразовые пробирки с 300 мкл стерильного физиологического раствора уретральными или цервикальными зондами. Использование для взятия материала специальных щеточек возможно, но не обязательно, поскольку при их применении выявляемость *S. trachomatis* методом ПЦР не превышает таковую при использовании тампонов.

Правильное хранение и транспортировка биологических образцов – одно из условий получения достоверного результата исследования. Длительное нахождение пробирки с незакрытой крышкой может привести к контаминации образца и получению ложноположительного результата. Хранение при комнатной температуре более 5 дней может стать причиной ложноотрицательного результата, поскольку под действием ферментов ДНКаз возможно разрушение ДНК хламидий в образце. В отличие от культурального метода, ПЦР-диагностика не требует строгого контроля над поддержанием оптимальной для сохранения жизнеспособности патогена температуры специальной транспортной среды (более того, гибель возбудителя делает пробу биологически безопасной). Практика показывает, что ДНК хламидий достаточно долго сохраняет способность к специфической амплификации, даже будучи помещенной в изотонический раствор хлористого натрия при комнатной температуре. Хранение биопроб до доставки в лабораторию при комнатной температуре в течение 1-2 суток не ухудшает пригодность материала для исследования методом ПЦР. Тем не менее длительное хранение образцов желательно осуществлять в замороженном виде, что гарантирует их биологическую сохранность. В таком виде пробы могут храниться весьма долго. Забор материала для исследования на ПЦР желательно проводить в учреждении, где проводится ПЦР-анализ. При этом проще соблюсти все правила забора, хранения и транспортировки биологического образца.



При необходимости транспортировки в другие учреждения следует соблюдать нормы работы с потенциально патогенными микроорганизмами и не допускать многократного замораживания-оттаивания образцов.

Во многих странах наибольшее распространение получили тест-системы ПЦР-диагностики хламидиоза компании Roche. Последние разработки – AMPLICOR CT/NG MWP (multi well plate) PCR, позволяющий анализировать 96 образцов (включая контроли), и полностью автоматизированный комплекс COBAS® AMPLICOR PCR. Мишенью является плазмидная ДНК хламидий. Ускоренные термальные циклы проходят в специально запрограммированном термальном цилиндре. Стандартный набор CT/NG MWP состоит из комплекта реактивов для приготовления образцов, комплекта амплификации, контролей, включая внутренние контроли на метод и на ампликоны, и 96-ячеечного планшета. Специфические праймеры – помеченные биотином олигонуклеотиды (20-30 оснований). Образцы (моча, отделяемое, соскобы слизистой) обрабатываются детергентом для освобождения исследуемой хламидийной ДНК. Смесь для ПЦР состоит из дезоксирибонуклеотидов трифосфатов, кофакторов, амплификационного фермента таq-полимеразы (ДНК-зависимой ДНК полимеразы). Дезокситимидин трифосфат (дТТФ) в смеси заменен на дезоксиуридин трифосфат (дУТФ), чтобы можно было отличить загрязняющие ампликоны от нативной ДНК. В данной системе протокол включает фермент урацил-N-гликозилазу (AmpErase®), который в начале теста, до амплификации, пока температура еще не достигла 55°C, разрушает ампликоны, но сохраняет нативную ДНК, поскольку она не содержит уридин. В программу управления амплификацией заложен специальный статистический алгоритм, позволяющий выявить циклы амплификации, где имеется контаминация (Shapiro, 1999). Каждый цикл ПЦР включает тепловую денатурацию двойной нити ДНК до одиночной нити, с последующим отжигом специфических праймеров и синтезом новой ДНК с помощью таq-полимеразы. Эти этапы проходят при разной температуре. При данных условиях урацил-N-гликозилаза неактивна и не предотвращает образования ампликонов, содержащих дезоксиуридин. В дальнейшем фермент химически денатурируется добавлением детергента. После амплификации и щелочной денатурации до однонитчатой структуры биотинированные ампликоны связываются зондами захвата, которые ковалентно соединены с бычьим сывороточным альбумином, покрывающим лунки 96-ячеечного планшета. Количество захваченного биотина пропорционально количеству специфических ампликонов, получаемых в результате ПЦР. Несвязавшиеся ДНК удаляются отмыванием. Количество связавшихся, меченных биотином ампликонов определяется с помощью конъюгата авидин-пероксидазы хрена. Авидин – яичный белок – имеет чрезвычайно высокую аффинность к биотину. Связавшуюся пероксидазу выявляют с помощью субстратной смеси – перекись водорода + тетраметилбензидин. При расщеплении перекиси водорода бесцветная субстратная смесь окрашивается в желтый цвет и анализируется на фотометре.

Автоматизированная система COBAS AMPLICOR состоит из полностью автоматизированного оборудования. ДНК химически денатурируется добавлением щелочи. Каждый образец подается в зону детекции, где содержится олигонуклеотидный зонд на магнитных микрочастицах, к которому происходит гибридизация свободных ампликонов. Эта гибридизация является ключевой для специфичности теста. Частицы с продуктами гибридизации многократно отмываются и иммобилизируются с помощью магнита. Процесс детекции фотометрический. Результаты распечатываются и вносятся в компьютер (рис. 11.4).

Диагностическая характеристика тестов Roche AMPLICOR показана в табл. 11.2.

Таблица 11.2.

Тест-система ПЦР-диагностики Roche AMPLICOR при выявлении генитальной инфекции, вызванной *Chlamydia trachomatis* (по данным производителя)

Распространенность в популяции (%)	Чувствительность (%)	Специфичность (%)	Прогностическая ценность положительного результата (%)	Прогностическая ценность отрицательного результата (%)
1	93,4	96,7	22,5	99,9
5	93,4	96,7	60,2	99,6
10	93,4	96,7	76,1	99,2
20	93,4	96,7	87,8	98,3

Первое большое испытание AMPLICOR PCR было проведено Европейской группой по изучению эпидемиологии хламидий. Были обследованы образцы мочи 3340 бессимптомных женщин, обратившихся за контрацепцией или прерыванием беременности в различных городах Европы (Basiri et al., 1997). Система оказалась приспособленной для массового скрининга на хламидиоз. Затем было проведено многоцентровое исследование автоматизированной системы COBAS AMPLICOR на 2014 эндоцервикальных соскобах и 1278 образцах мочи у женщин и 373 уретральных соскобах и 254 образцах мочи у мужчин. Сравнивали с культурами клеток McCoу и HeLa-229. В качестве референс-теста при дискордантности результатов использовали альтернативную ПЦР на выявление участка гена MOMP. Чувствительность COBAS AMPLICOR® PCR при исследовании соскобов и мочи была 83-90%. Чувствительность культур клеток составила 56,5% для эндоцервикса и 63% – для мужской уретры (Vincelette et al., 1999). В 2000 году были опубликованы результаты многоцентрового исследования тест-систем COBAS AMPLICOR и AMPLICOR CT/NG. Цервикальные соскобы и моча 2236 женщин и уретральные соскобы и моча 1940 мужчин подверглись культуральному исследованию и исследованию методом ПЦР на *Chlamydia trachomatis*. Образцы, которые были отрицательными в культуре и положительными в ПЦР, считались истинно положительными, если они были также положительны в ПИФ с моноклональными антителами и в другой ПЦР-системе (van der Pol et al., 2000). Распространенность хламидийной инфекции в данной выборке составила 2,4% у женщин и 7,2% – у мужчин. Результаты двух тестов AMPLICOR совпали у 98,1%. Чувствительность COBAS AMPLICOR со-

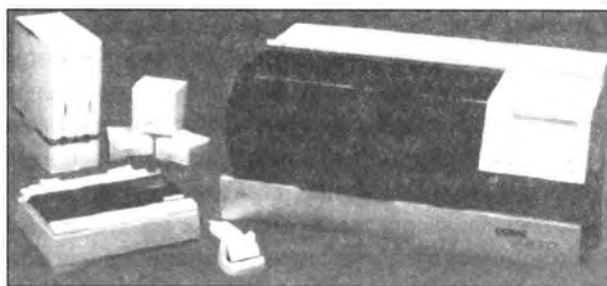


Рисунок 11.4. Автоматизированная система ПЦР-диагностики COBAS® AMPLICOR PCR.

ставила 89,7% для эндоцервикальных соскобов, 89,2% – для мочи женщин, 88,6% – для мужских уретральных соскобов и 90,3% – для мочи мужчин. Внутренний контроль выявил ингибицию в общей сложности для 2,4% образцов.

### Количественная ПЦР

В последние годы разработаны варианты количественной ПЦР для выявления различных представителей *Chlamydiales*. Количественная ПЦР имеет значительные преимущества. Она осуществляется быстро, может быть полностью автоматизирована, исключает риск контаминации и ингибиции и, самое главное, определяет количество возбудителя в образце, что очень важно в клинических и экспериментальных исследованиях. Основные методы количественного ПЦР для выявления хламидий показаны в табл. 11.3.

Таблица 11.3.

Варианты количественной цепной полимеразной реакции для выявления хламидий

Организм	Ген(ы)	Технология	Комментарий	Ссылки
<i>C. pneumoniae</i>	omp4	LightCycler®	Чувствительность — 1 генетическая копия на 1 мл. Можно исследовать образцы, фиксированные в формалине и запаянные в парафин. Хорошо коррелирует с иммуногистохимией.	Mygind et. al., 2001
<i>C. pneumoniae</i>	16S-рРНК	TaqMan®	Ампликон 185 пар и Sybr Green. Также описана ПЦР генов <i>dna</i> , <i>poIA</i> , <i>mutS</i> и <i>mind</i> . Показано, что у IFN-γ опосредованная персистенция обусловлена продукцией транскриптов, связанных с репликацией ДНК, но не делением клетки.	Byrne et. al., 2001
<i>C. pneumoniae</i>	groB	TaqMan®	Ампликон 100 пар и экзонуклеазный зонд. У больных с острым коронарным синдромом реакция отрицательная.	Kiss et. al., 2001
<i>C. pneumoniae</i>	клонированный фрагмент <i>pst1</i>	LightCycler®	Ампликон 437 пар. 17% положительных результатов у больных с болезнью коронарных артерий и 1% — в контрольной группе.	Leowattana et. al. 2001
<i>C. pneumoniae</i>	omp4	LightCycler®	Ампликон 437 пар. Количественная и качественная ПЦР дали одинаковые результаты.	Mygind et. al., 2001
<i>C. pneumoniae</i>	omp1	TaqMan	Метод эффективен при диагностике инфекции дыхательных путей (выявляет 1–5 генетических копий). Если обработать мокроту ацетил-цистеином, то чувствительность повышается.	Kuoppa et. al., 2002
<i>C. pneumoniae</i>	16S-рРНК	TaqMan®	Количество возбудителя не коррелирует с тяжестью болезни.	Berger et. al., 2000
<i>C. pneumoniae</i>	16S-рРНК, <i>omp1</i> , клонированный фрагмент	TaqMan®	Сравнение количественного ПЦР, выявляющего ген <i>omp1</i> , с обычным ПЦР. Результаты не всегда совпадают.	Apfalter et. al., 2000

Продолжение таблицы 11.3.

Организм	Ген(ы)	Технология	Комментарий	Ссылки
<i>C. pneumoniae</i>	16S-рРНК, Спейсер 16S — 23S-рРНК	LightCycler®	Чувствительность, сходная с ПЦР-системой Tong & Sillis (0,5 инфекционной единицы на 1 мл). Замораживание снижает чувствительность. Реагенты дорогие.	Hardic et al., 2002
<i>C. pneumoniae</i>	13 мембранных белков	Rotorgene 2000	Показаны различия в экспрессии мембранных белков при острой и хронической инфекции. Интересные данные о патогенезе хламидиоза.	Hogan et al., 2002
<i>C. pneumoniae</i>	omp1	TaqMan®	Предлагаются две методики ПЦР в режиме реального времени с применением двух различных праймеров — 108 и 125 пар. Проводится сравнение с обычной ПЦР при анализе клинических образцов. Очень высокая чувствительность.	Tondella et al., 2002
<i>C. abortus</i>	omp1, рРНК	LightCycler®	Количество копий коррелирует с количеством единиц, образующих включения (ЭТ) в образце.	Huang et al., 2001
<i>C. abortus</i> , <i>C. pecorum</i>	23S-рРНК, omp1, omp1-RT, 16S-23S-рРНК интергенный участок РТ	LightCycler®	Тщательное исследование различных методов. Замораживание и оттаивание повреждает хламидийную ДНК. ДНК собирается и стабилизируется в гуанид-тиосульфате. Мишень 23S-рРНК оптимальна для достижения высокой чувствительности. В особенности при количественном ПЦР, выявляющем ЭТ хламидий.	deGraves et al., 2002
<i>C. felis</i>	omp1	iCycler®	Способен выявить менее 10 ЭТ хламидий.	Helps et al., 2001
<i>C. trachomatis</i>	Сигма факторы: groD, groN, gpsD	LightCycler®	Сигма-факторы требуют различной термальной экспрессии.	Mathews et al., 1999
<i>C. trachomatis</i>	8% открытых рамок считывания (ORF) генома		Метод выявления транскриптов, связанных с различными стадиями жизненного цикла хламидий.	Shaw et al., 2000
<i>C. trachomatis</i>	рРНК	TaqMan	Применен количественный зонд пептид -РНК.	Fiandaca et al., 2001
<i>C. trachomatis</i>	omp1A	LightCycler®	Метод применялся для полевых исследований трахомы. В большинстве случаев количества возбудителя в конъюнктиве мало.	Soloman et al., 2002
<i>C. trachomatis</i>	omp1	ABI Genscan 672	Первая работа по количественному ПЦР хламидий.	Pecharatana et al., 1993

### Лигазная цепная реакция

Тест Abbott LCx® – первая коммерческая система для диагностики генитального хламидиоза на основе лигазной цепной реакции (ЛЦР). Она основана на выявлении участка гена «криптической» хламидийной плазмиды. Обычно каждая хламидийная клетка содержит



от 6 до 10 копий этого гена. Тест является видоспецифичным для *Chlamydia trachomatis*. Соскобы помещаются в специальную транспортную среду. Для образцов мочи используется ресуспендирующий буфер. При нагревании транспортной среды ДНК высвобождается из клеток и двойная нить расплетается на отдельные нити. Для амплификации образец помещается в реакционную смесь, состоящую из четырех олигонуклеотидных зондов, термостабильной лигазы и полимеразы, а также трифосфат-нуклеотидов и буфера. Четыре олигонуклеотидных зонда попарно гибридизируются к комплементарным участкам нити ДНК. Когда пробел заполнен, лигаза присоединяется к паре зондов таким образом, что создается продукт амплификации, комплементарный изначальной последовательности. Этот продукт в дальнейшем служит мишенью для последующих циклов амплификации. Когда температура поднимается выше «точки плавления», продукт амплификации распадается на отдельные нити. Снижение температуры позволяет новым зондам гибридизироваться со вновь доступными «мишенями». Повторение термальных циклов генерирует экспонентную амплификацию зондов вместо амплификации мишени, как это происходит при ПЦР. Для последующего обнаружения две пары нуклеотидных зондов помечаются гаптенем – химической группой, обладающей антигенными свойствами. Каждый зонд имеет гаптен захвата (позволяющий антителам, фиксированным на магнитных микрочастицах, захватывать зонд) и гаптен обнаружения (позволяющий обнаружить комплекс). Метка производится таким образом, что каждый ампликон имеет гаптен захвата на одном конце и гаптен обнаружения на другом. При инкубации в автоматизированном анализаторе LCx<sup>®</sup> кроличьи антитела, которыми покрыты микрочастицы, захватывают ампликон через гаптен захвата. Затем частицы переносятся на стекловолоконный матрикс, а этап отмывания удаляет несвязавшиеся зонды. Микрочастицы с ампликонами, связавшиеся со стекловолоконным матриксом, реагируют с кроличьими антителами, мечеными щелочной фосфатазой. После промывания связавшиеся антитела выявляются с помощью флуоресцирующей субстратной смеси, содержащей умбеллиферил фосфат. Результат фиксируется автоматически с помощью флуориметра. Интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству захваченных ампликонов. После анализа, с целью предотвратить загрязнение рабочей зоны анализатора, ампликоны разрушаются химически перекисью водорода и металлохелатным комплексом. Тест производится только в специальном анализаторе Abbott. Набор включает отрицательные контроли (на контаминацию) и положительные контроли (для калибровки). Внутренние контроли амплификации в данном тесте не предусмотрены. Производитель приводит показатель чувствительности 93%, а специфичности – 97%. Обширные клинические испытания подтвердили эти цифры. Существует проблема референс-метода. При сравнении с культурой клеток в случае отрицательных результатов культуры и положительных результатов ЛЦР ставится ПЦР и ПИФ. В большинстве исследований чувствительность культуры составила 60-65%, а ЛЦР – 90-97%. Cheng и соавторы (2001) исследовали уретральные соскобы и мочу 1138 бессимптомных мужчин и показали высокую диагностическую ценность ЛЦР.

Hjelm и соавторы (2001) в г. Упсала (Швеция) обследовали более 1000 женщин с помощью ЛЦР, взяв вагинальные, цервикальные соскобы и мочу. Чувствительность при анализе образца мочи была 80%, вагинального секрета – 96%, цервикального отделяемого – 92%. Эти различия не были статистически достоверны. Специфичность теста приближалась к 100%. В другом исследовании система Abbott LCx<sup>®</sup> LCR испытывалась в Великобритании. Чувствительность диагностики хламидиоза у 417 женщин при обследовании эндоцервикального соскоба – 100%,

вагинального соскоба – 91%, мочи – 95%. При обследовании 317 мужчин уретральные соскобы дали 100% чувствительности, а моча – 91%. Рефренс-методом служило обнаружение антигена с помощью иммунофлуоресценции. У многих мужчин после лечения ЛЦР оставалась положительной, тогда как антиген из уретры исчезал. При замораживании образцов ингибирующие факторы практически не оказывали влияния на результат (Thomas et al., 2001).

Высокая чувствительность ЛЦР, неинвазивный метод взятия образцов (моча) и возможность автоматизации делают этот метод оптимальным для скрининга на хламидиоз больших популяционных групп. Примером может служить обследование 13204 женщин-рекрутов армии США. Генитальный хламидиоз в этой популяции был выявлен у 9,2%. Среди пяти южных штатов распространенность хламидийной инфекции достигала 15% (Gaydos et al., 1998). Полная ингибция ЛЦР в образцах мочи мужчин наблюдается редко. У женщин также относительно редко (беременные – 1%, небеременные – 3,1%) (Cherneskey et al., 1998). Для ЛЦР основными ингибиторами в моче являются нитриты. Замораживание образцов или хранение их в холодильнике значительно снижает возможную ингибцию. Имеются неоднозначные мнения о необходимости внешнего положительного контроля мочи при правильной обработке и хранении образцов (Cherneskey et al., 1998). Тест-система ЛЦР LCx® была применена в большом популяционном исследовании в Великобритании, где обследовали 11161 мужчину и женщину детородного возраста от 16 до 44 лет. *C. trachomatis* была обнаружена у 2,2% мужчин и у 1,5% женщин. В возрастных группах мужчин 25-34 года и женщин 16-24 года распространенность составила 3%. С хламидиозом связан каждый из таких факторов, как внебрачный статус, возраст, наличие нескольких партнеров либо два и более партнеров за последний год (Fenton et al., 2001). Аналогичные данные были получены в Балтиморе, США Turner и соавторами (2002). С помощью ЛЦР была осуществлена диагностика реактивных артритов хламидийной этиологии, обнаружена ДНК хламидий в синовиальной жидкости (Nikkari et al., 1997). ЛЦР, как и ПЦР, может быть использована для скрининга на хламидиоз образцов, взятых при рутинном цитологическом исследовании шейки матки при медосмотрах для исключения новообразований (Augenot et al., 2001; Zhang et al., 2002).

### Транскрипционная амплификация

Принцип транскрипционной амплификации показан на рис. 11.5.

Проводится анализ специфического участка рибосомальной РНК хламидий. Праймер 1 (промотор) связывается с рибосомальной РНК хламидий (мишень). С помощью фермента обратная транскриптаза синтезируется ДНК-копия РНК-мишени и образуется двойная нить (дуплекс) РНК:ДНК. Благодаря РНКазной Н-активности обратной транскриптазы рРНК разрушается. Праймер 2 связывается с ДНК, а обратная транскриптаза создает новую копию ДНК. При этом последовательность промотора служит матрицей для сборки двойной нити ДНК. Затем РНК полимеразы инициирует транскрипцию РНК с матрицы ДНК. При этом создается от 100 до 1000 копий РНК-ампликона. Праймер-промотор связывается с каждым РНК-ампликоном, а обратная транскриптаза (RT) создает его ДНК-копию с образованием дуплекса РНК:ДНК. Благодаря РНКазной Н-активности обратной транскриптазы рРНК разрушается. Праймер 1 (промотор) связывается со вновь синтезированной ДНК, а обратная транскриптаза создает двойную нить ДНК. Таким образом, цикл завершается. Отличие этого метода от других методов амплификации показано в табл. 11.4.

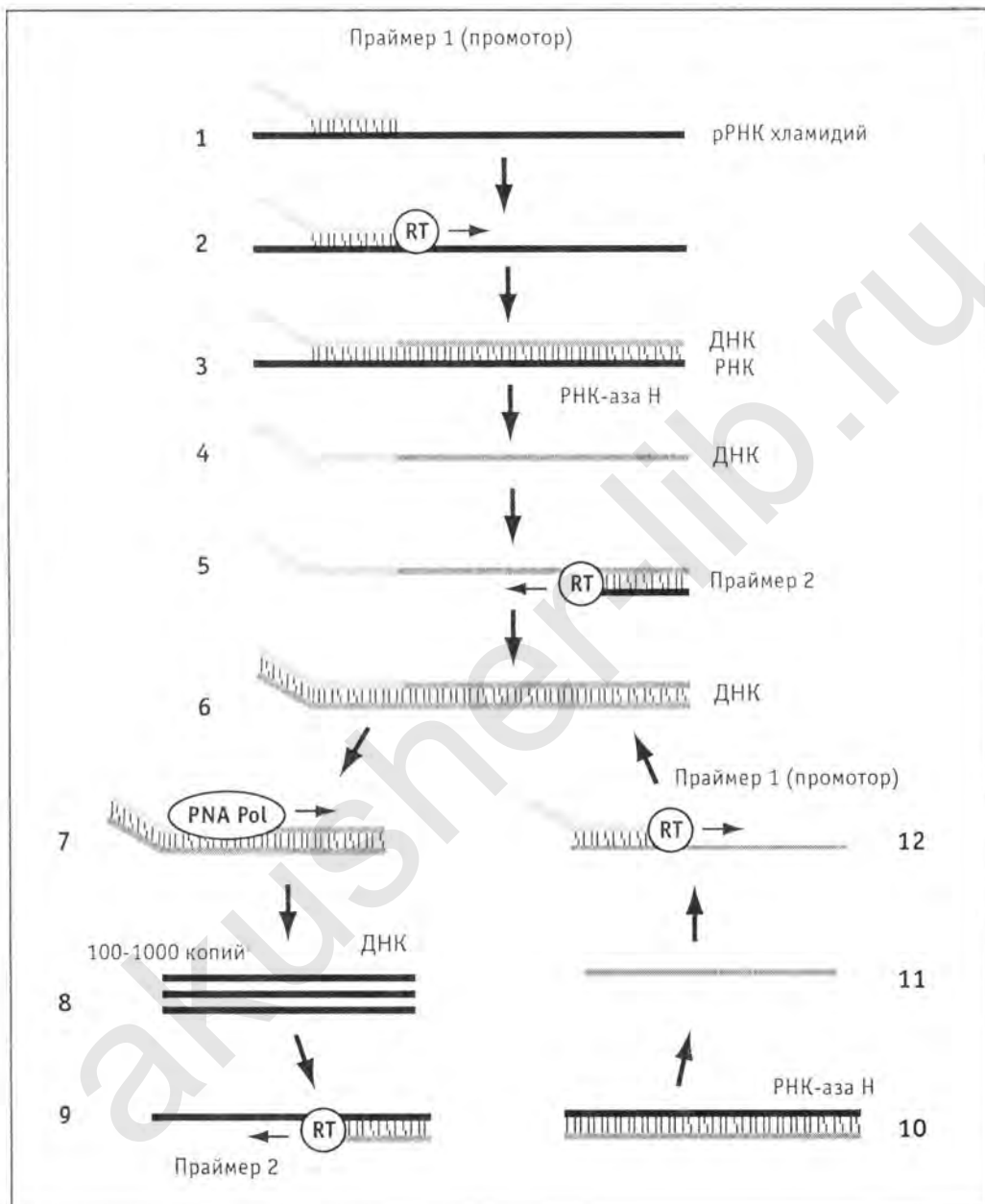


Рисунок 11.5. Цикл транскрипционной амплификации при выявлении рибосомальной РНК хламидий (Gen-Probe AMP-CT®):

- 1 – праймер 1 (промотор) связывается с рибосомальной РНК хламидий (мишень);
- 2 – благодаря активности обратной транскриптазы (RT- reverse transcriptase) создается ДНК-копия РНК-мишени;
- 3 - образуется двойная нить (дуплекс) РНК:ДНК;
- 4 - благодаря РНКазной Н-активности обратной транскриптазы рРНК разрушается.

Таблица 11.4.

**Характеристика некоторых методов выявления нуклеиновых кислот хламидий,  
основанных на амплификации**

	<b>Полимеразная цепная реакция (Roche AMPLICOR)</b>	<b>Лигазная цепная реакция (Abbott LCx)</b>	<b>Транскрипционная амплификация (Gen-Probe AMP)</b>
Ферменты	ДНК полимераза	Лигаза, ДНК полимераза	РНК полимераза, обратная транскриптаза
Температурные условия	Термальные циклы	Термальные циклы	Изотермальная реакция
Продукт амплификации	ДНК	ДНК	РНК
Этап отмывания	Требуется	Требуется	Не требуется (гомогенный анализ)
Принцип обнаружения продуктов реакции	Фотометрия	Флуоресценция	Хемилюминесценция
Специальное оборудование	Амплификатор (прибор для проведения термальных циклов), промыватель микротироваальных планшетов, фотометр	Амплификатор (прибор для проведения термальных циклов), промыватель микротироваальных планшетов, люминометр	Люменометр

Тест-система Gen-Probe AMP-СТ® – надежный и быстрый метод диагностики генитальной инфекции *C. trachomatis*. В 1997 году Goessens и соавторы исследовали с помощью теста транскрипционной амплификации AMP-СТ мочу, уретральные и цервикальные образцы, взятые у 544 мужчин и 456 женщин – пациентов клиники по лечению болезней, передающихся половым путем. Чувствительность была 78% по отношению к культуре клеток, специфичность – 99%. При дискрептивном анализе с применением количественной ПЦР чувствительность была 85%. В аналогичном исследовании Mouton и соавторы (1997) исследовали мочу 1000 мужчин и женщин, обратившихся в венерологическую клинику в Роттердаме. С целью определения диагностических характеристик AMP-СТ был применен дискрептивный анализ. Чувствительность и специфичность, а также прогностическая ценность положительного и отрицательного результата для мужчин – 100%, 99,2%, 93,1% и 100%, соответственно. Для женщин эти показатели составили, соответственно, 84,3%, 98,8%, 89,6% и 98%. При исследовании соскобов гениталий чувствительность и специфичность – около 99% AMP-СТ. При исследовании мочи женщин и мужчин – 95-99% (Crotchfelt et al., 1998). Несколько меньшие показатели чувствительности и специфичности были получены в венерологической клинике Вены. Stary и соавторы (1998) обследовали 240 мужчин и 308 женщин. Чувствительность при анализе уретральных соскобов – 93%, мочи мужчин – 86%, эндоцервикальных соскобов – 88%, отделяемого из влагалища – 92%, мочи женщин – 76%. Pasternack и соавторы (1999) сравнили системы AMP-СТ TMA и COBAS AMPLICOR CT/NG для выявления *C. trachomatis* в моче. Было обследовано 320 мужчин и 338 женщин. Результаты обоих тестов совпали в 98,8%. У 39 мужчин и у 33 женщин была выявлена хламидийная инфекция. При обследовании 787 женщин Lauderdale и соавторы (1999) показали преимущества транскрипционной амплификации над ИФА (Clearview®) прямой гибридизацией (PACe 2®)



и ЛЦР (LCx®). Чрезвычайно высокая чувствительность и специфичность транскрипционной гибридизации были продемонстрированы в различных популяциях с высокой и низкой распространенностью генитальной хламидийной инфекции в Бордо (Франция) (de Barbeyrac et al., 2000).

В 2001 году появился тест Gen-Probe APTIMA-Combo-2, который можно считать началом нового поколения тест-систем, основанных на транскрипционной амплификации (Hill, 2001). В данном тесте использована новая технология специфического захвата искомой нуклеотидной последовательности target capture (захват мишени), позволяющая до проведения амплификации фиксировать анализируемую последовательность на магнитных микрочастицах. Молекулы захвата состоят из олигонуклеотидной (полиаденин) части и последовательности, комплементарной рибосомальной РНК *C. trachomatis*. При 62°C происходит гибридизация. После снижения температуры образовавшийся комплекс связывается с политимидином, ковалентно присоединенным к магнитной частице. Взвесь частиц размером 1 мкм выделяется с помощью магнитного поля и отмывается. При этом из образца удаляются вещества, которые могут повлиять на чувствительность и специфичность – ингибиторы, ампликоны, белки, компоненты плазмы, нуклеиновые кислоты другой специфичности (рис. 11.6). По данным производителя (Gen-Probe), минимальная чувствительность составляет – 96%, специфичность – 98% (Bott et al., 2001).

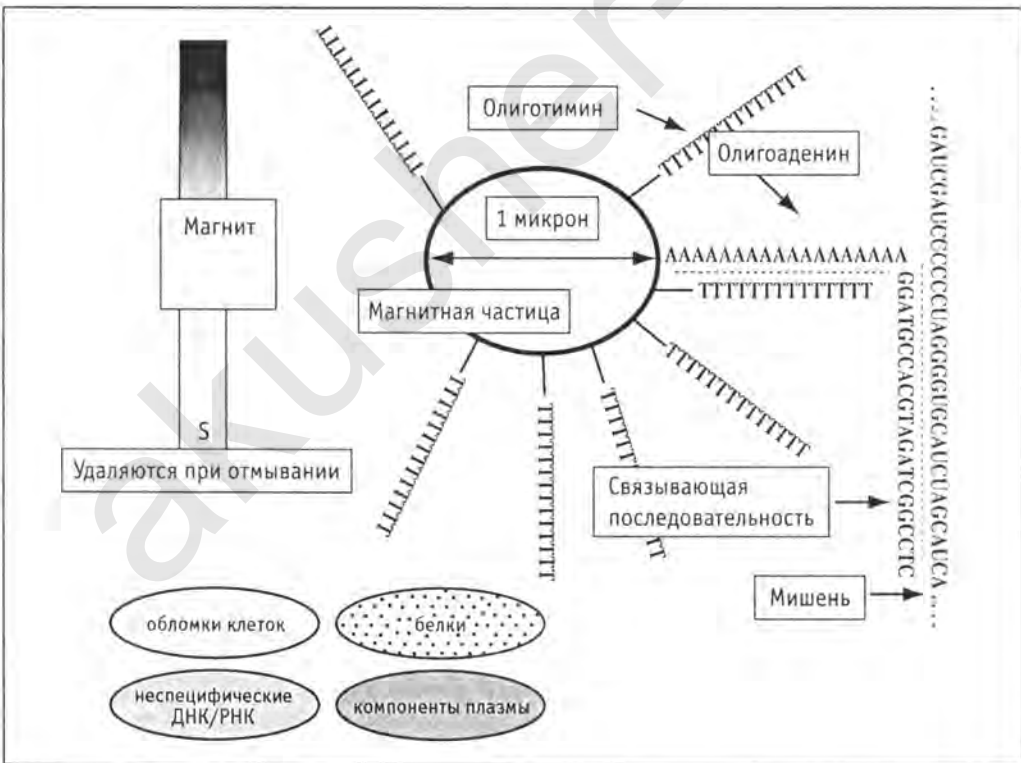


Рисунок 11.6. Технология target capture (захват мишени), позволяющая до проведения амплификации фиксировать анализируемую последовательность на магнитных микрочастицах.

Данные независимых клинических испытаний системы АРТИМА-Combo-2 для диагностики урогенитального хламидиоза были впервые представлены в 2001 году в Берлине на конференции Международного общества по изучению болезней, передающихся половым путем (ISSTD- International Society For Sexually Transmitted Diseases Research). Чувствительность от 92% до 99% при исследовании соскобов слизистой оболочки и от 87% до 99% – при исследовании мочи (Martin et al., 2001; Moncada et al., 2001; Turner et al., 2001). Fuller и соавторы (2002) представили данные сравнения АРТИМА-Combo-2 и BDProbeTec™ (для выявления *C. trachomatis* в эндоцервикальных соскобах и моче у 460 женщин) на конференции Американского общества микробиологов (Юта, США, 2002). Чувствительность оказалась 98%, специфичность – близкой к 100%. При анализе образцов в BDProbeTec ингибция достигала 7,2%, а при анализе в АРТИМА-Combo-2 – 1,1%. Martin et al., 2002 представил сравнительные данные выявления хламидиоза у 290 женщин с помощью трех наиболее современных систем амплификации нуклеиновых кислот (табл. 11.5).

Повышение чувствительности АРТИМА-Combo-2 по сравнению с другими, не менее чувствительными тестами амплификации, при анализе образцов мочи можно объяснить отсутствием действия ингибирующих веществ, которые устраняются в процессе теста (Chernesky et al., 2002).

Таблица 11.5.

**Чувствительность и специфичность трех систем амплификации нуклеиновых кислот при диагностике генитальной инфекции, вызванной *C. trachomatis* (Martin et al., 2002)**

Тест	Чувствительность (%)		Специфичность (%)	
	Соскоб	Моча	Соскоб	Моча
Combo-2	91,5	94,9	94,5	99,0
ProbeTec	81,5	78,5	100	99,5
LCx	80,3	74,2	100	100

### Амплификация, основанная на нуклеотидной последовательности

Технология NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) – амплификация, основанная на нуклеотидной последовательности (АНП), была запатентована компанией Organon Teknica (Cambridge). Для нее характерно добавление в образцы диметилсульфоксида и проведение амплификации при повышенной температуре (41°C), что увеличивает специфичность. РНКазная активность осуществляется не РНКазой N, а другими ферментами, поскольку РНК в образцах может быть разрушена РНКазой. Для высвобождения РНК применяется гуанидина тиоционат. Мишенью служит рибосомальная РНК, которая связывается с частицами двуокиси кремния (Boom et al., 1990). Реакционная смесь состоит из нуклеотид-трифосфатов и двух праймеров, комплементарных консервативному участку рибосомальной РНК хламидий. Праймер 1 связывает искомую последовательность и является промотором для T7-РНК полимеразы. После отжига к РНК-мишени праймер удлиняется с помощью фермента обратной транскриптазы (такой фермент имеется у ретровирусов) и формируется РНК-ДНК-гибрид. Благодаря РНКазной активности праймер 2 присоединяется к копии ДНК в противоположном направлении. Праймер 2 удли-

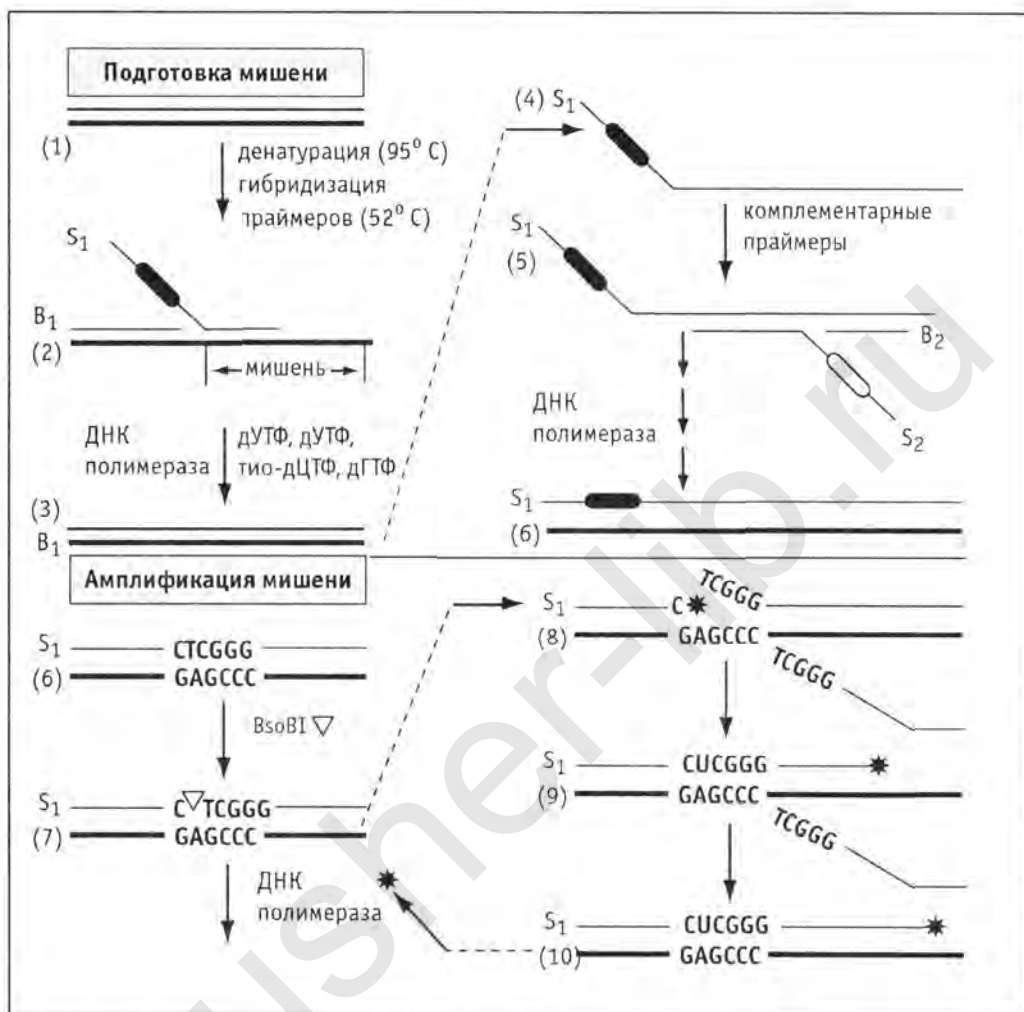
няется благодаря ДНК-полимеразной активности обратной транскриптазы, образуется вторая нить ДНК, которая удлиняется T7-РНК полимеразой. В результате формируется двойная нить ДНК, которая является копией изначальной РНК-мишени и имеет T7-промотор, используемый T7-РНК полимеразой для синтеза большого числа копий РНК, комплементарных изначальной последовательности. Они служат матрицей для циклической фазы реакции, в которой праймер 2 связывается перед праймером 1. Весь процесс является изотермальной реакцией с очень высоким уровнем амплификации (обычно, порядка 10<sup>9</sup>). Для обнаружения продуктов реакции зонд, меченный биотином, связывается с однонитчатым антисмысловым апмликоном, а затем с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином. (Chan, Fox, 1999, Jungkind, 2001). Весь комплекс иммобилизуется на электроде с помощью магнита и зонд, меченный рутением, гибридизируется с мишенью. При подаче напряжения на электрод происходит окислительно-восстановительная реакция, в результате которой генерируется электрохемилюминесцентный световой сигнал, которой можно измерить фотометром (Coombes, Mahony, 2000; Mahony et al., 2001). На сегодняшний день существует мало работ по клинической оценке тест-системы Organon Teknika NucliSens® Basic Kit для диагностики инфекций, вызванных *C. trachomatis*. Использование 16S-pРНК в качестве праймера позволяет повысить чувствительность в сотни раз. Так, порог чувствительности лучших систем ПЦР и ЛЦР не превышает 10-2 колониеобразующих единиц (КОЕ), а для АНП он составляет 10-3 КОЕ (Morre et al., 1996; Mahony et al., 2001). Фактически метод позволяет выявить одну молекулу 16S-pРНК, каждое ЭТ хламидий содержит тысячи таких молекул. Поэтому он с высокой степенью надежности позволяет выявить единственный хламидийный микроорганизм.

### Амплификация со смещением нитей ДНК

Технология SDA (strand displacement amplification) – метод амплификации со смещением нитей ДНК (АСН) – это изотермальный способ, на основе которого была разработана диагностическая система BDProbeTec®ET (Becton Dickinson, USA) (Walker et al., 1992; 1992a; Walker, 1993; Spears et al., 1997). BDProbeTec – это система «второго поколения». Она проста в эксплуатации, имеет большую пропускную способность, обнаруживает продукт амплификации в режиме реального времени в закрытой изолированной системе, что исключает возможность контаминации образцов ампликонами. Мишенью служит ДНК плазмиды *Chlamydia trachomatis*, примерно 100 копий которой содержится в каждой хламидийной клетке, что усиливает чувствительность (Little et al., 1999; Stary 2000; Cheng et al., 2001; van der Pol et al., 2001).

Метод включает две фазы: подготовку мишени и собственно амплификацию. Для простоты схемы показана одна из двух нитей ДНК-мишени (рис 11.7). В реальности процесс происходит на двух нитях и вызывает экспонентную амплификацию мишени (участка ДНК плазмиды *Chlamydia trachomatis*).

При подготовке мишени двойная нить ДНК денатурирует при 95°C (1), что позволяет двум праймерам В1 и S1 связаться с мишенью методом гибридизации (2). В1 – бамперный праймер, тогда как праймер S1 содержит однонитчатую рестриктазу 5' к участку праймера, который связывается с мишенью. В присутствии BstДНК полимеразы и смеси динуклеотидтрифосфатов осуществляется одновременное удлинение продуктов праймеров В1 (3) и S1 (4). В результате происходит смещение продуктов праймера S1, которые



**Рисунок 11.7.** Метод амплификации со смещением нитей ДНК (SDA – strand displacement amplification), позволяющий обнаруживать плазмидную ДНК хламидий непосредственно в процессе амплификации (real-time detection) (Little et al., 1999).

затем могут гибридизироваться с праймерами противоположной нити – B<sub>2</sub> и S<sub>2</sub> (5). Одновременное удлинение двух праймеров приводит к образованию участка, подвергающегося экспонентной амплификации (6). Этот участок является субстратом для фермента BsoBI, содержащегося в реакционной смеси. BsoBI распознает соответствующий сайт на двойной нити ДНК. В данном случае BsoBI-сайт содержит измененный (содержащий тιο-группу) цитозин, поскольку в смеси был тιοцитозин динуклеотид трифосфат (3). Это делает данный сайт устойчивым к полному раскалыванию ферментом BsoBI. Фермент действует только на нить ДНК, которая не содержит измененный цитозин. В результате на ДНК образуется «насечка» (7). Другой фермент, содержащийся в реакционной смеси,



BstДНК полимеразы связывается с этой насечкой и начинается синтез новой нити. При этом противоположная нить смещается – отсюда название метода (8-10). Этот шаг воссоздает двухнитчатый участок, и процесс образования насечки и смещения нити итеративно повторяется.

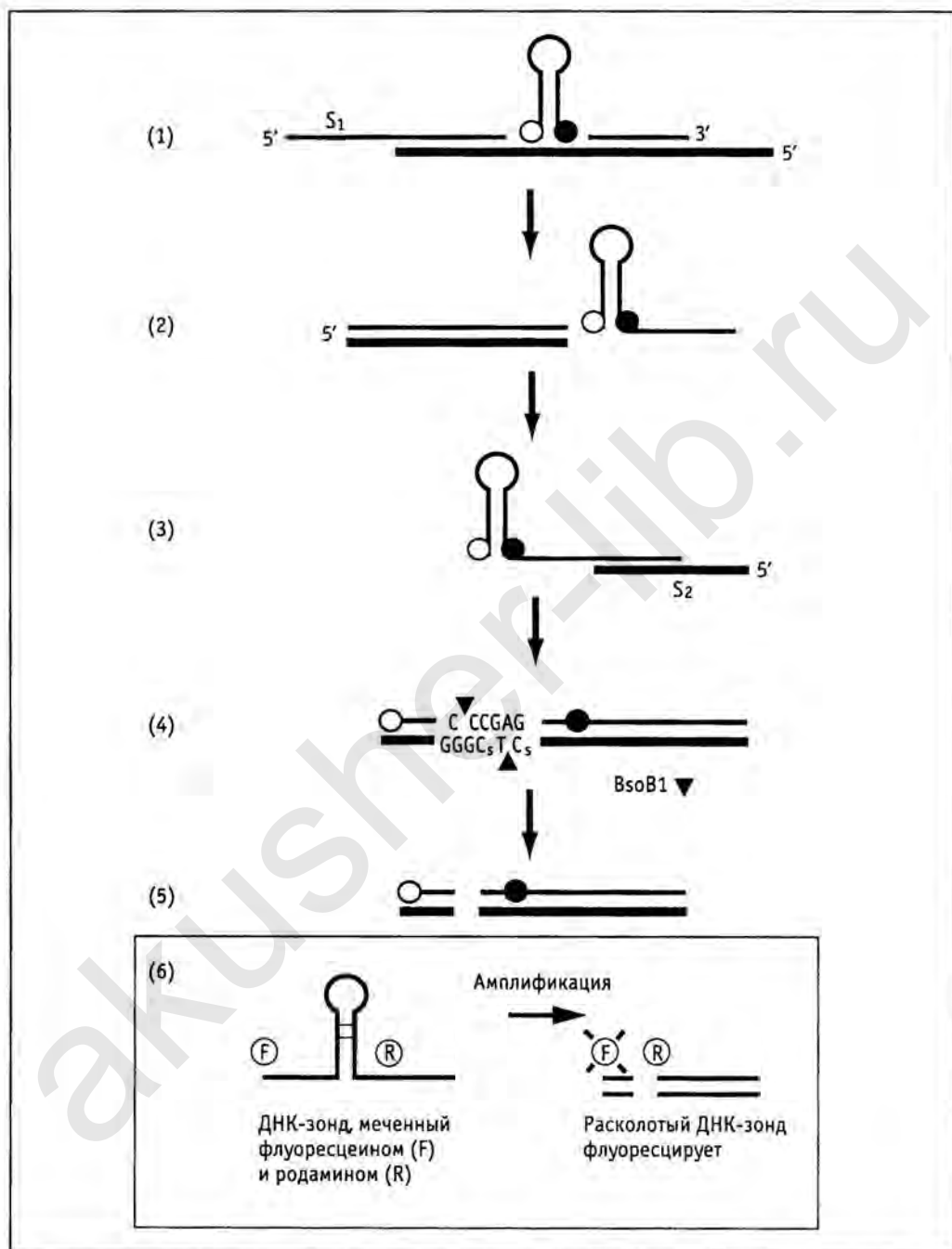
В реальности процесс происходит на двух нитях и вызывает экспонентную амплификацию мишени. Мишенью служит участок ДНК плазмиды *Chlamydia trachomatis* –

**5'AGCAAATAATCCTTGGGACAAAATCAACACCTGTGCGAGCCAAAATGACAGCTTCTGATGGAATATCTT-TAACAGTCTCCAATAATTCATCAACCAATG-3'.**

B1 – бамперный праймер, тогда как праймер S1 содержит однонитчатую рестриктазу 5' к участку праймера, который связывается с мишенью. В присутствии BstДНК полимеразы и смеси динуклеотидтрифосфатов осуществляется одновременное удлинение продуктов B1 и S1. В результате этого происходит смещение продуктов праймера S1, которые затем могут гибридизироваться с праймерами противоположной нити – B2 и S2. Одновременное удлинение двух праймеров приводит к образованию последовательности, подвергающейся экспонентной амплификации. Эта последовательность является субстратом для фермента BsoBI, содержащегося в реакционной смеси. BsoBI распознает соответствующий сайт на двойной нити ДНК. В данном случае BsoBI-сайт содержит измененный (содержащий тио-группу) цитозин, поскольку в смеси был тиоцитозин динуклеотид трифосфат. Это делает сайт устойчивым к полному раскалыванию ферментом BsoBI. Фермент действует только на нить ДНК, которая не содержит измененный цитозин. В результате на ДНК образуется «насечка». Другой фермент, содержащийся в реакционной смеси, BstДНК полимеразы связывается с этой насечкой и начинается синтез новой нити. При этом противоположная нить смещается – отсюда название метода. Этот шаг воссоздает двухнитчатый участок, и процесс образования насечки и смещения нити итеративно повторяется. Смещенные нити способны связываться с праймерами противоположных нитей, что продуцирует процесс экспонентной амплификации при 52,5°C.

Однонитчатые продукты амплификации также связываются с ДНК зондом-детектором, меченым флуоресцеином и родамином. Участок между этими метками имеет структуру петли. В состав петли входит последовательность, распознаваемая ферментом BsoBI. Этот зонд также содержит последовательность, комплементарную мишени, на расстоянии 39 нуклеотидов от родаминовой метки. До специфической амплификации мишени методом АСН флуоресцеин и родамин находятся близко друг от друга. Поэтому энергия возбужденного флуоресцеина поглощается родамином, и флуоресценция не происходит. После АСН зонд превращается в двухнитчатый участок, который раскалывается рестрикционным ферментом BsoBI. Это ведет к увеличению расстояния между метками и излучению флуоресцентного сигнала, благодаря которому регистрируется наличие продуктов амплификации. Механизм этого процесса показан на рис. 11.8.

Вначале гибридизируются смещенная нить (жирная линия), зонд, ковалентно связанный с флуоресцеином и родамином, и праймер амплификации (1). Одновременное удлинение с помощью ДНК полимеразы праймера и зонда приводит к смещению зонда (2). Затем



**Рисунок 11.8.** Трансформация зонда-детектора в процессе амплификации со смещением нитей ДНК. Механизм «включения» флуоресценции зонда-детектора в процессе амплификации со смещением нитей ДНК (Little et al., 1999).

удлиненный зонд связывает праймер противоположной нити (3). Происходит дальнейшее удлинение зонда (4). В результате создается двухнитчатый сайт для фермента BsoVI, который расположен между местами связывания флуоресцеина и родамина. Удлиняющийся участок ДНК в области сайта BsoVI не содержит тиоцитозина. Поэтому BsoVI «раскалывает» обе цепочки ДНК. Вместо «насечки» происходит раскол обеих нитей ДНК (5). До раскола расстояние между метками физически небольшое, хотя количество нуклеотидов между ними значительно. Они образуют «петлю на ножке». Под действием BsoVI эта петля расправляется. В результате две метки – флуоресцеин (F) и родамин (R) физически разделяются, флуоресценция не поглощается родамином и регистрируется на фотометре (6) (рис 11.8) (Little et al., 1999).

Процедура выполнения теста. Уретральные образцы собираются шпателем с вязким наконечником, а эндоцервикальные – с полиуретановым наконечником. Образцы помещают в пробирки с 2 мл лизирующего раствора и нагревают для освобождения нуклеиновых кислот. Образцы мочи собирают в пластиковые контейнеры со специальными реагентами (убирающими ингибиторы), которые предоставляются производителем системы BDProbeTec®ET. В комплект входят готовые реагенты, программируемый разливатель, закрытые микротироважные планшеты 8x12 и фотометр. Каждый планшет содержит положительный и отрицательный контроли, а также контроли на наличие ингибиторов. Одновременно можно анализировать 46 образцов. За смену – до 300. Амплификация и регистрация результатов занимает один час. Общее время анализа – 2 часа 15 минут (рис. 11.9).

Продукты амплификации регистрируются в режиме реального времени – т.е. сразу, по мере образования. Аналитическая чувствительность метода – 10 ЭТ *Chlamydia trachomatis* (Little et al., 1999).

Клинических исследований амплификации со смещением нитей для диагностики хламидийной инфекции в литературе пока немного. Chal и соавторы (2000) сравнивали АСН (BD ProbeTecET) и ПЦР (Roche AmpliCor) для диагностики хламидиоза у 825 мужчин и 399 женщин. Авторы обследовали только образцы мочи. Результаты двух тестов статистически не отличались. В другом исследовании сравнивались АСН (BD ProbeTecET), ПЦР (Roche AmpliCor), ЛЦР (Abbott LCx) и ИФА (Syva MicroTrak). Было обследовано 733 эндоцервикальных образца, взятых у проституток. Чувствительность методов амплификации была выше, чем иммуноферментного анализа. Наиболее высокую специфичность показала АСН – 100% при выявлении *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* в цервикальных соскобах в группе повышенного риска (van Dyck et al., 2001).

В Глазго (Шотландия) McCartney и соавторы (2001) сравнили ЛЦР (Abbott LCx) и АСН (ProbeTecET) на популяции 715 мужчин и 291 женщины, пациентов клиники мочеполовых инфекций (распространенность хламидиоза – 9%). Обследовалась моча у обоих полов. У женщин – еще по два эндоцервикальных соскоба. В случае дискордантных результатов ставилась ПЦР (лабораторный вариант). Истинно положительными считались образцы, показавшие позитивный результат при обследовании тремя методами. Система ProbeTecET на основе амплификации со смещением нитей показала высокие диагностические качества при выявлении хламидиоза. При анализе мочи у мужчин: чувствительность – 95,5%, специфичность – 100%, прогностическая ценность положительного результата – 100%, прогностическая ценность отрицательного результата – 99,5%.

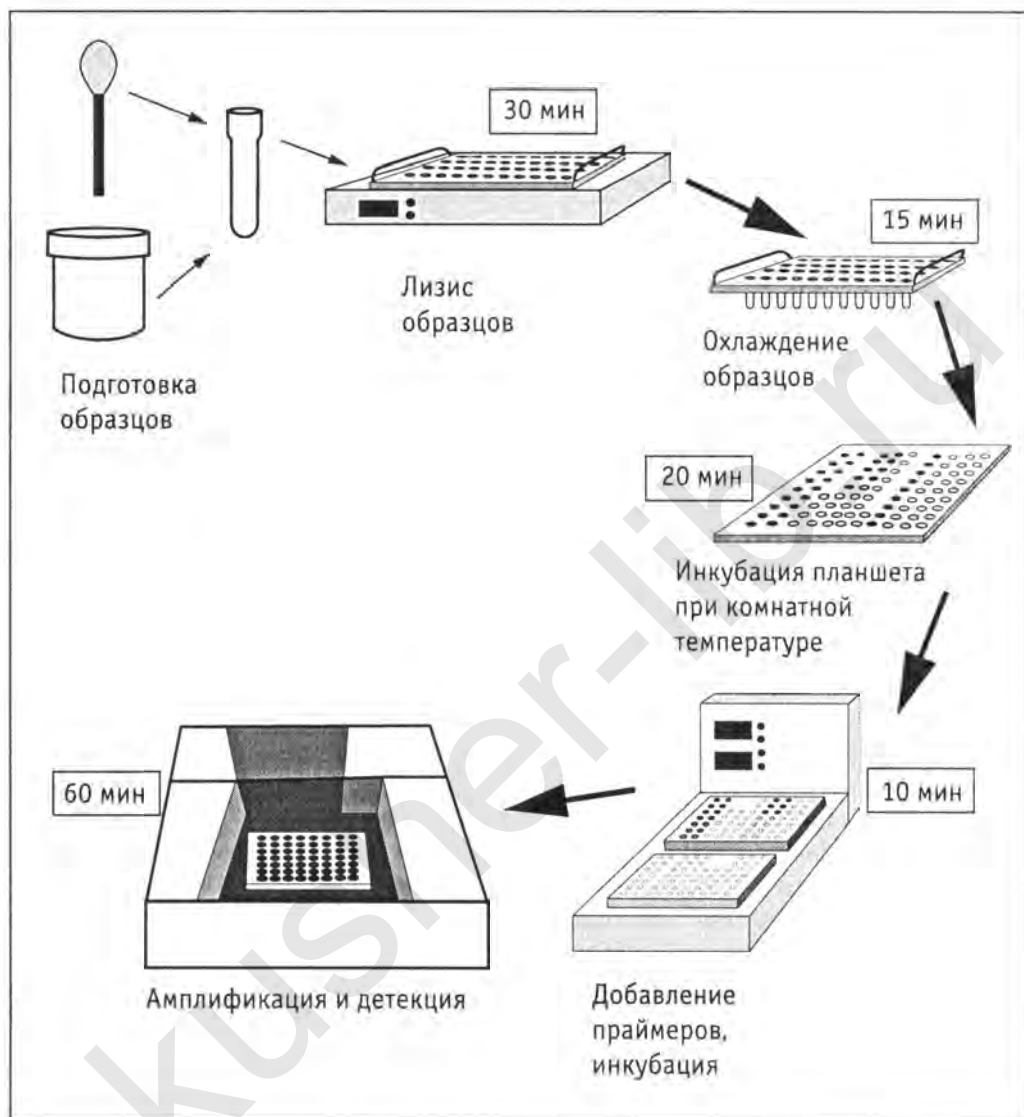


Рисунок 11.9. Процедура постановки теста BDProbeTec® ET.

При анализе мочи у женщин: чувствительность – 77,3%, специфичность – 100%, прогностическая ценность положительного результата – 100%, прогностическая ценность отрицательного результата – 97,3%. Для цервикальных соскобов: чувствительность – 90,9%, специфичность – 100%, прогностическая ценность положительного результата – 100%, прогностическая ценность отрицательного результата – 97,3%.

Известны результаты большого многоцентрового клинического испытания АСН (ProbeTecET). Был собран 4131 образец от 2109 мужчин и женщин (соскобы и первая



порция мочи). В качестве референс-метода использовала ЛЦР (Abbott LCx). Чувствительность у женщин для цервикальных соскобов – 92,8%, для мочи – 80,5%. Для мужчин соответственно – 92,5% и 98,5%, (van der Pol et al., 2001).

Основным преимуществом методов диагностики, основанных на амплификации нуклеиновых кислот, является очень высокая чувствительность и специфичность. Чувствительность ПЦР, ЛЦР и методик транскрипционной амплификации столь высока, что для них не существует референс-метода (золотого стандарта). Для оценки диагностических качеств методов амплификации часто сравнивают результаты систем, основанных на выявлении различных последовательностей одного и того же гена либо на выявлении различных генов хламидий (Mahony et al., 1992; Ossewaarde et al., 1992). В большом многоцентровом исследовании Bianchi и соавторы (2002) обследовали в пяти городах 3551 женщину с помощью коммерческих систем на основе ПЦР, ЛЦР и ДНК-гибридизации. Чувствительность соответственно была 78%, 97% и 90%, а специфичность – 99%, 98% и 98%, соответственно. Эти тесты позволяют выявлять хламидиоз как у больных с симптомами, так и у бессимптомных субъектов, и использовать мочу, свободное отделяемое и другой материал, взятый неинвазивными методами (Ostergaard, 1999; Stary et al., 1998; Stary, 2000).

При рутинном использовании могут возникнуть проблемы с воспроизводимостью тестов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот. Кроме четкого соблюдения инструкции производителя тест-систем, необходим опыт и творческий подход (например, постановка дополнительных контролей, не предусмотренных процедурой выполнения теста). Подобные проблемы, с которыми часто сталкиваются практические работники, не часто становятся предметом научных исследований (Gronowski et al., 2001).

Проведение методов амплификации с целью диагностики требует высокой квалификации персонала и наличия изолированной от клиники высокотехнологичной лаборатории. Это делает данные методы относительно дорогими, но их диагностическая ценность оправдывает вложенные средства. Были проведены специальные экономические исследования, которые показали, что применение ПЦР для массового скрининга экономически выгодно и позволяет в конечном счете экономить значительные средства (Marrazzo et al., 1997; Howell et al., 1998:). Howell и соавторы (1998) на 18.000 женщин штата Мериленд (США) показали, что если не проводить скрининг на хламидиоз, то воспаление органов малого таза разовьется у 497 женщин, что повлечет затраты на их лечение в 2,2 млн. долларов. Использование для скрининга только выявления антигена с помощью ИФА позволит предотвратить 240 случаев и сэкономит 887.000 долларов. Использование же ПЦР и ЛЦР позволит сэкономить 1.174.000 долларов, т.е. на 287.000 больше, с учетом дополнительных затрат на проведение тестов амплификации. В Глазго (Шотландия) большая лаборатория для ЛЦР-диагностики хламидиоза открылась в 1997 году. Лаборатория принимает анализы от частнопрактикующих врачей, клиник, специализированных больниц. Это позволило только в 2000 году дополнительно выявить 331 мужчину и 844 женщины, инфицированных хламидиями, затратив на это всего примерно 227 долларов на мужчин и 368 долларов на женщин. Своевременное лечение этих лиц позволило предотвратить последствия и осложнения, лечение которых стоило бы неизмеримо дороже (Scoular et al., 2001).

### 11.7. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE*

*Chlamydophyla pneumoniae* – распространенный возбудитель инфекций верхних дыхательных путей. Очевидно, *C. pneumoniae* также связана с рядом хронических заболеваний, инфекционная этиология которых окончательно не доказана. Это атеросклероз, бронхиальная астма, аутоиммунные демиелинизирующие заболевания центральной нервной системы (Gaydos, 2001; Hammerschlag, 2001; Jacobson, Cross, 2001; Du et al., 2002; Sriram et al., 2002). Традиционные методы лабораторной диагностики, которые применяются при выявлении *Chlamydia trachomatis*, далеко не всегда применимы к *Chlamydophyla pneumoniae* (Voman et al., 1999; Voman, Hammerschlag, 2002). С приходом в клинику методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот (АНК), возможности лабораторной диагностики *C. pneumoniae* существенно возросли. Различные специалисты (пульмонологи, кардиологи, невропатологи, педиатры) стали учитывать хламидофильную инфекцию в своей практике. Результаты тестов, поставленных в разных лабораториях, часто противоречат друг другу. Методы выявления *C. pneumoniae* и их интерпретация для диагностики инфекции в клинической практике нуждаются в унификации (Tompkins et al., 2000). Ниже приводится характеристика методов выявления данной инфекции, основанных на определении морфологических структур возбудителя, его антигенов, антител к ним, а также специфических нуклеотидных последовательностей. Рассмотрено также диагностическое выделение *C. pneumoniae* в культуре клеток. Обсуждаются методологические особенности тестов, интерпретация их результатов.

#### 11.7.7. Серологическая диагностика

Поскольку диагностическое выделение *C. pneumoniae* является сложным, то на раннем этапе изучения инфекции основным критерием инфицированности служит обнаружение специфических антител. Для этой цели чаще всего применяется микрореакция иммунофлуоресценции (МИФ). Разработанная в свое время для *C. trachomatis*, она подверглась модификации (Grayston et al. 1990). В качестве антигена в тесте используются ЭТ *C. pneumoniae* W183, вместо 15 серотипов *C. trachomatis*. Диагноз острой инфекции дыхательных путей ставится при четырехкратном возрастании титров IgG-антител и/или при однократном титре IgM-антител 1:16 и выше или IgG-антител 1:512 и выше. Хроническая инфекция или инфекция в анамнезе предполагается при титрах IgG-антител от 1:16 до 1:512. При первичной инфекции и реинфекции динамика антител различна. При первичном инфицировании IgM появляются через 3 недели после начала заболевания, а IgG – на 6-8-ой неделе. При реинфекции IgM-ответ может отсутствовать, IgG-ответ появляется значительно раньше – через 1-2 недели. Таким образом, при первичной инфекции в первые недели поставить диагноз на основании серологического исследования невозможно. Данные критерии серологического диагноза респираторной инфекции *C. pneumoniae* справедливы только для взрослых. Для детей они неприемлемы. У детей с хламидофильной пневмонией, подтвержденной культуральным исследованием, сероконверсия МИФ может не наступить (Block et al., 1995; Harris et al., 1998). Однако у детей и взрослых с пневмонией, вызванной *C. pneumoniae*, при отрицательной МИФ имеет место гуморальный иммунный ответ, который регистрируется в иммуноблоттинге (Kutlin et al., 1998; Hammerschlag, Roblin, 2000).

Среди взрослого населения может наблюдаться довольно значительный серопозитивный «фон», достигающий до 80% и выше. Более того, среди этих клинически здоровых лиц с антителами к *C. pneumoniae* встречаются такие, которые имеют серологические критерии «острой инфекции» (IgG 1:512 и выше и/или IgM 1:16 и выше). Однако ни выделением в культуре, ни методом ПЦР подтвердить инфицирование не удастся (Kern et al., 1993; Нуман et al., 1995). Поэтому на основании однократного серологического исследования, даже взятого в острой фазе заболевания, подтвердить или опровергнуть диагноз инфекции, вызванной *C. pneumoniae*, можно далеко не всегда. Известно, что уровень антител у одного и того же субъекта может быть подвержен сильным колебаниям. Деан и соавторы (1998) наблюдали в течение 7 лет двух больных с персистентной респираторной инфекцией, вызванной *C. pneumoniae*, подтвержденной выделением возбудителя в культуре. В определенные периоды титр антител у них падал, несмотря на сохранение симптомов и выделение возбудителя (Dean et al., 1998).

Результаты иммуноблоттинга показывают, что между изолятами *C. pneumoniae* существуют антигенные различия, что может быть причиной расхождения результатов МИФ при использовании в реакции различных антигенов (Kutlin et al., 1998; Tuuminen et al., 2000). Наличие IgG-антител может быть обусловлено гетеротипическими реакциями с другими видами хламидий, поскольку хламидии имеют общий липополисахарид и схожую структуру главного белка наружной мембраны (MOMP) (Carter et al., 1991; Ozanne et al., 1992). Кроме того, антитела к другим бактериям, вызывающим респираторную патологию, могут перекрестно реагировать с *C. pneumoniae*, прежде всего *Bartonella* и *Bordetella pertussis* (Jackson et al., 2000; Maurin et al., 1997). Была обнаружена высокая степень гомологии между белком теплового шока Hsp60 у человека и *C. pneumoniae*, а также с белком GroEL у *Escherichia coli* (Ochiai et al., 2000). Некоторые антигенные детерминанты пикорнавирусов могут давать перекрестные реакции в МИФ с антителами к *C. pneumoniae* (Harkonen et al., 2000).

К настоящему времени МИФ для выявления антител к *C. pneumoniae* не стандартизирована. Отлаженных тест-систем мало, и большинство лабораторий пользуются собственными методиками. В результате имеет место значительная межлабораторная вариация результатов. Peeling и соавторы разослали 22 сыворотки больных хламидофильной пневмонией в 14 лабораторий, 9 из которых использовали собственные методики постановки МИФ, а 5 лабораторий пользовались готовыми тест-системами. В качестве антигена использовались штаммы AR-39, TW-183 и KaJaani-6, в качестве «золотого стандарта» – тест-система университета штата Вашингтон (Сиэтл, США) Результаты совпали в среднем на 80% (Peeling et al. 2000; Peeling et al. 2000a).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) более подходит для создания унифицированных тест-систем при серологической диагностике инфекции *C. pneumoniae*. В последние годы появился ряд таких систем. При клинических испытаниях их сравнивали с МИФ. Данных по изучению диагностической ценности коммерческих тестов для определения антител к *C. pneumoniae* в литературе мало (Dowell et al. 2001; Kutlin et al. 1997; Persson, Voman, 2000; Persson, Haidl, 2000; Tuuminen et al. 2000). Одна из наиболее известных тест-систем Medac rELISA, в которой применен рекомбинантный ЛПС-антиген, может выявлять IgG-, IgA- и IgM-антитела. В одном из первых клинических испытаний данной тест-системы Kutlin и соавторы использовали в качестве референс-

теста выделение *S. pneumoniae* в культуре. При респираторной инфекции у детей выявление IgM-антител имело чувствительность 13%. Выявление IgA- или IgG-антител у взрослых имело чувствительность 75%. Специфичность была, соответственно, 75% и 21% (Kutlin et al. 1997).

IgA против *S. pneumoniae* являются признанным маркером хронической инфекции. Период их полужизни в сыворотке крови около 7 дней, в отличие от 23 дней для IgG, поэтому они свидетельствуют об активной или персистентной инфекции. Определению IgA- и IgM-антител мешает наличие ревматоидного фактора и высоких титров IgG-антител (Jauhainen et al. 1994). Wang и Grayston обследовали молодых людей с острыми респираторными заболеваниями и пожилых людей с хроническими обструктивными бронхолегочными заболеваниями. Установлено, что только у 17-42% лиц, имевших достаточно высокие титры IgG и/или IgM, характерные для текущей или недавней инфекции, были обнаружены IgA-антитела к *S. pneumoniae* (Wang, Grayston, 2000).

Таблица 11.6.

**Рекомендации по применению микрореакции иммунофлуоресценции для серологической диагностики инфекции, вызванной *Chlamydomypha pneumoniae***

Компонент теста	РЕКОМЕНДАЦИИ
Приготовление антигена	Элементарные тельца, очищенные в верографине, ресуспензируют в фосфатно-солевом буферном растворе, содержащем 0,02% формалина, смешивают с 0,5% взвесью желточного мешка и фиксируют в ацетоне
Сыворотки	Исследуют парные сыворотки с интервалом 4–8 недель
Тестирование	Начинают с разведения 1:8 или 1:16 и титруют двухкратным разведением до отрицательного результата  При определении IgM и IgA сыворотки адсорбируют антисывороткой против IgG  Препараты контрастируют родамин-конъюгированным бычьим сывороточным альбумином (1/15 объема) или красителем Эванса (0,05%)
Считывание результатов	Результат учитывают при окуляре x 10 и объективе x 40
Интерпретация	Острая инфекция - IgM 1 : 16 и выше или 4-кратное увеличение титров IgG  Вероятная острая инфекция - IgG 1 : 512 и выше  Вероятная инфекция в прошлом - IgG 1 : 16 и выше
Контроли	Положительные и отрицательные контрольные сыворотки при каждой постановке  Определение воспроизводимости путем титрования положительной контрольной сыворотки между постановками теста  Определение оптимального разведения конъюгата путем титрования с положительной сывороткой  Хранение конъюгата в эликвотах при -20°C  Лаборант, проводящий исследование, не должен знать о клиническом статусе пациента (слепой контроль)

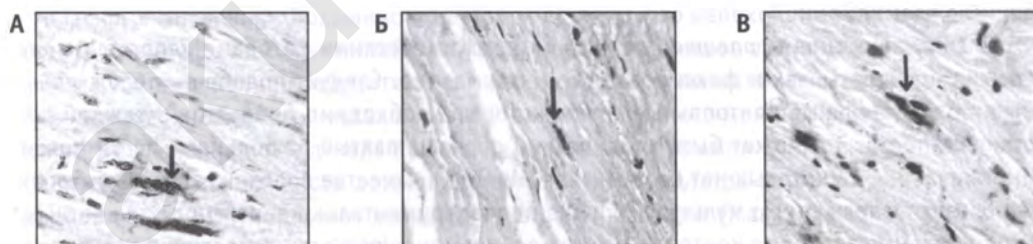


Последние критерии серологической диагностики в МИФ острой инфекции *C. pneumoniae*, которые были приняты в США и Канаде: четырехкратное повышение титров IgG в динамике; титр IgM-антител 1:16 и выше. Наличие IgG- или IgA-антител без повышения титров не может служить основанием для постановки диагноза активной (или персистентной) инфекции (Dowell et al. 2001). Рекомендации по серологической диагностике инфекции, вызванной *C. pneumoniae*, суммированы в табл. 11.6.

### 11.7.2. Иммуногистохимические методы

*C. pneumoniae* может быть обнаружена в тканях с помощью иммунофлуоресценции, иммуногистохимии и гибридизации ДНК/РНК *in situ* (Kuo, Campbell, 2000). Преимуществом этих методов является возможность параллельно исследовать морфологию тканей и определить локализацию возбудителя в определенных клетках. *C. pneumoniae* может быть выявлена в макрофагах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках. При иммунофлуоресцентном методе выявления *C. pneumoniae* могут быть трудности, связанные с обычно малым размером цитоплазматических включений, содержащих возбудитель, и морфологической неоднородностью элементарных телец. Наличие фонового свечения также затрудняет обнаружение специфически светящихся телец. Особенно трудно обнаружить *C. pneumoniae* данным методом в атероматозной ткани. Это связано с неспецифическим окрашиванием воспалительных клеток, которые присутствуют в атероматозной ткани сосудов (Ong et al. 1996; Thomas et al. 1999; Shor et al. 1998; Taylor-Robinson, Thomas, 1998).

Наиболее часто используемая методика иммуногистохимического определения *C. pneumoniae* – обнаружение иммунных комплексов с помощью пероксидазы хрена (иммунопероксидазный метод) и системы авидин-биотин. Имеются различные модификации этого метода. Унифицированного метода не существует. Могут быть трудности в интерпретации результатов, поскольку истинноположительные результаты иногда трудно отличить от ложноположительных (Kuo et al., 1995) (рис. 11.10).



**Рисунок 11.10.** Гладкомышечные клетки стенки артерии. Окраска моноклональными антителами, комплексом авидин-биотин и пероксидазой хрена.

- А.** Истинноположительный результат. Обнаружение *Chlamydia pneumoniae* с помощью моноклональных антител ТТ-401 (Kuo et al., 1995).
- Б.** Ложноположительный результат. Окраска моноклональными антителами против *Chlamydiaceae* CF-2.
- В.** Тот же участок ткани, что и Б. Окраска контрольными моноклональными антителами аналогичного изотипа (IgG2a-антитела против вируса лихорадки Ласса) (Dowell et al. 2001).

Различия в специфичности и avidности моноклональных антител, применяемых в каждом конкретном тесте, могут приводить как к ложноположительным, так и к ложноотрицательным результатам. Моноклональные антитела высокоспецифично связываются с определенным эпитопом (участком молекулы антигена). Сам же эпитоп может присутствовать как на поверхности *S. pneumoniae*, так и входить в состав других микроорганизмов или клеток хозяина. Измененные ткани могут неспецифически связывать антитела. Это обуславливает различия в частоте иммуногистохимического обнаружения *S. pneumoniae* (от 14 до 100%) в пораженных тканях и слабую корреляцию между обнаружением антигена и ДНК. Отсутствие стандартизации и унификации иммунологических методов определения *S. pneumoniae* является причиной расхождений (Dowell et al. 2001). Ericson и соавторы применили два различных метода выявления антигена *S. pneumoniae* в сосудах больных атеросклерозом – иммунофлуоресценцию и иммунопероксидазный метод. У больных с выраженным атеросклерозом результаты обоих методов совпали, тогда как у больных с начальным атеросклерозом имелись значительные расхождения (Ericson et al. 2000). Для улучшения чувствительности и специфичности следует использовать разные моноклональные антитела с соответствующими контролями:

- *S. pneumoniae* – специфичные антитела: RR-402, TT-401, ChlamydoPhyla-Cel-Pn, AY-6;
- *Chlamydiaceae* – специфичные антитела: CF-2, Baxter, LPS, Pathfinder;
- *C. trachomatis* – специфичные антитела: KK-12, Virostat 1641, Virostat 1651.

Следует использовать заведомо отрицательные моноклональные антитела другой специфичности, которые не имеют перекрестных реакций с *S. pneumoniae*, для оценки неспецифического фона окраски. Для этой цели обычно применяют антитела асцитической жидкости мышей. Желательно также применять второй контроль – антитела, имеющие тот же изотип, что и антихламидийные антитела, используемые в тесте. Например, если применяются противохламидийные антитела CF-2, которые относятся к изотипу IgG2a, то в качестве контроля на неспецифическое связывание следует применять моноклональные антитела изотипа IgG2a против инфекций, не дающих перекрестных реакций с хламидиями.

Для обнаружения *S. pneumoniae* иммуногистохимическими методами используют как свежие препараты, так и фиксированные в формалине. Следует подобрать положительные и отрицательные контрольные ткани, которые необходимо проводить в каждой постановке теста. Это может быть клинический образец, взятый от больного, но он может иметь участки, на которых нет возбудителя. Иногда в качестве положительного контроля используют зараженную культуру или ткани экспериментально зараженных животных. Отрицательные тканевые контроли для каждой постановки – это незараженная культура, нормальные ткани. Следует исследовать ткань из разных участков препарата (по крайней мере, из двух). Таким образом, при каждой постановке иммуногистохимического метода необходимо применять один положительный и один отрицательный контроль и использовать два отрицательных и два положительных клона антител.

При интерпретации результатов существенным является установить различие между фоновым и специфическим окрашиванием. Определяющее значение имеет морфология окрашенных структур, тканей и клеток, где они выявляются. Поэтому результат может

быть учтен только специалистом, имеющим соответствующую подготовку. Надо уметь идентифицировать и различать воспалительные клетки (полиморфноядерные лейкоциты, мастоциты, плазматические клетки) и тканевые пигменты (липофусцин, гемосидерин). Только цитоплазматические структуры в макрофагах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках следует рассматривать как показатели положительного теста. Надо учитывать их структуру – форму, локализацию, однородность, зернистость, взаимоотношение с клеточными органеллами, отсутствие артефактов. Постоянно должно проводиться сравнение с позитивными контролями (Kuo, Campbell, 2000).

### 11.7.3. Культура клеток

Выращивать *C. pneumoniae* в клеточных культурах более сложно и трудоемко, чем *C. trachomatis*. Поэтому при хламидофильной инфекции использовать этот метод для рутинной диагностики невозможно. Также невозможно использовать его в качестве «золотого стандарта» при сравнении различных методов диагностики. Однако культура клеток остается существенным методом, позволяющим доказать наличие жизнеспособных *C. pneumoniae* и изучить биологические свойства возбудителя. Она является незаменимой в исследованиях по определению антимикробной чувствительности и изучению эффективности лечения.

Существующие методики изоляции *C. pneumoniae* предполагают инокуляцию клинических образцов в человеческие клеточные линии и использование центрифугирования на монослой клеток. Особенности этих методик по сравнению с *C. trachomatis* состоят в том, что используется питательная среда без сыворотки. Время, необходимое для роста, увеличено, и центрифугирование на монослой проводится несколько раз (Oyelese et al., 1987; Maass et al., 1993; Tjhi et al., 1997). Монослой предварительно обрабатывается полиэтиленгликолем, трипсином и диэтиламиноэтилом для улучшения роста и накопления, однако стандартные рекомендации для рутинной диагностики не выработаны (Roblin et al., 1992; Kazuyama et al., 1997). Между различными лабораториями существуют разногласия о минимальном количестве пассажей до определения результата диагностического выделения. Большинство авторов считают, что необходимо минимум два пассажа при выделении *C. pneumoniae* из бронхолегочных смывов при респираторной патологии. При выделении возбудителя из стенки сосудов количество пассажей может быть больше. Увеличение количества пассажей до определенного момента увеличивает вероятность выделения возбудителя при его крайне незначительном количестве, однако возрастает также возможность ложноположительных результатов из-за концентрации обломков клеток. Оптимальным является от 2 до 6 пассажей (Maass et al., 1998; Dalhoff, Maass, 1996; Bartels et al., 2000).

Наиболее чувствительная и удобная методика диагностического выделения *C. pneumoniae* в клетках HEp-2 была разработана Maass и соавторами (Maass et al., 1998). Авторы обследовали 70 образцов коронарных артерий больных атеросклерозом методом культуры и ПЦР. Для выделения возбудителя из тканей необходимо было провести до 10 пассажей (обычно 2-5). *C. pneumoniae* была выделена из 16% образцов, ДНК обнаружена в 30%. Последовательность ДНК выделенных штаммов была идентична ДНК штамма, выделенного у больного пневмонией. Все больные, у которых была обнаружена *C. pneumoniae*,



были серопозитивны в МИФ. В контрольной группе здоровых лиц все результаты были отрицательные. Используя данную методику, другой группе исследователей удалось выделить *S. pneumoniae* из артерий и поддерживать жизнеспособную культуру (Apfalter et al., 2000).

Для диагностического выделения *S. pneumoniae* при респираторной патологии берут соскобы из носоглотки, ротоглотки, мокроту, бронхоальвеолярные смывы, биопсированные ткани. Кровь не подходит для выделения *S. pneumoniae* в культуре клеток, хотя в мононуклеарных клетках периферической крови можно обнаружить ДНК возбудителя методом ПЦР. Из образцов сосудистой ткани выделить *S. pneumoniae* значительно труднее, чем из респираторного тракта у больных хламидофильной пневмонией. Соскобы следует брать инструментом с дакроновым наконечником и алюминиевым или пластиковым стержнем. Инструмент с деревянным стержнем и ватным наконечником для этой цели неприемлем, как и металлический инструмент (за исключением алюминия). Соскобы помещают в бифосфатный транспортный буфер (сахарозы – 68,4 г; фосфат калия двухосновный – 2,01 г; фосфат калия одноосновный – 1,01 г; гентамицин – 10 мкг/мл; амфотерицин В – 100 мкг/мл; ванкомицин 25 мкг/мл; 10-20% фетальной сыворотки крупного рогатого скота – до конечного объема 1000 мл; pH 7,2). Бронхоальвеолярные смывы, мокроту, плевральную жидкость собирают в бифосфатный транспортный буфер в объемном соотношении образец: буфер – 1:2. Желательно образцы инокулировать в течение 24 часов, сохраняя их при +4°C в холодильнике (или на мокром льду). Возможно длительное хранение образцов при -70°C. Перед инокуляцией образец встряхивают 15-20 секунд, и по стенке пробирки собирают жидкость. Для инокуляции используют 100-200 мкл этой жидкости. Ее центрифугируют 8000-10000 g, ресуспендируют в питательной среде клеточной культуры и гомогенизируют. Следует учесть, что мокрота токсична для культуры и может ингибировать ее рост. Следует также убирать кальцифицированные участки сосудов перед гомогенизацией. Особенности выделения *S. pneumoniae* в культурах клеток приведены в табл. 11.7.

Таблица 11.7.

**Рекомендации по диагностическому выделению *Chlamydophyla pneumoniae*  
в культуре клеток**

Компонент теста	РЕКОМЕНДАЦИИ
Тип клеток	Клетки HEp-2 или HL в 6-, 12-, 24- или 96-ячеечных планшетах для культуры клеток
Среда	Среда Eagle MEM (minimum essential medium) или модифицированная среда IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium), обогащенная фетальной сывороткой крупного рогатого скота (10%), 1-глутамином (2 мМоль), аминокислотами (MEM nonessential amino acids), HEPES-буфер (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid) гентамицин (10 мкг/мл), ванкомицин (25 мкг/мл), амфотерицин В (2 мкг/мл)
Инокуляция	Гомогенизированный образец центрифугируется на монослой 9003000g 60 мин. После центрифугирования питательную среду заменяют на среду с циклогексимидом
Инкубация	35°C в 5% CO <sub>2</sub>
Пассажи	Культуру смотрят на третьи сутки, гомогенизируют (из каждой двух лунок) и заражают новый монослой дважды



Продолжение таблицы 11.7.

Компонент теста	РЕКОМЕНДАЦИИ
Идентификация включений	Монослой фиксируют и красят вначале родоспецифическими, а затем видоспецифическими моноклональными антителами. Количество колониеобразующих единиц на мл используют для подсчета инфекционных телец в образце
Контроли	<p>Положительные контроли (клетки, инфицированные <i>C. pneumoniae</i>) и отрицательные контроли (неинфицированные клетки человека) следует ставить в каждом опыте</p> <p>Новые партии среды, посуды и инструментов для забора должны проверяться на положительных и отрицательных контролях</p> <p>При использовании планшетов, в особенности при множественных пассажах, следует контролировать контаминацию «из лунки в лунку»</p> <p>Лабораторные работники должны уметь отличить свечение <i>C. pneumoniae</i> от артефактов</p> <p>Клетки культуры следует регулярно проверять на микоплазменную контаминацию методом посевов или ПЦР</p>

#### 11.7.4. Полимеразная цепная реакция

Ограниченные возможности традиционных методов диагностики выявлять инфекцию *C. pneumoniae* подчеркивают значение методов, основанных на амплификации нуклеиновых кислот. Возможности полимеразной цепной реакции быстро амплифицировать буквально несколько копий специфической ДНК и РНК, несмотря на присутствие большого количества других нуклеиновых кислот, сделали этот метод незаменимым в диагностике заболеваний, вызванных *C. pneumoniae*. С помощью ПЦР *C. pneumoniae* была обнаружена в дыхательных путях (Tong, Sillis, 1993; Gaydos et al., 1994; Voman et al., 1997), в сосудистой ткани (Kuo et al., 1993; Campbell et al., 1995; Grayston et al., 1995; Jackson et al., 1995), в сыворотке крови и мононуклеарах периферической крови (Naidu et al., 1997; Nystrom-Rosander; et al., 1997; Voman et al., 1998).

Несмотря на совершенствование методов амплификации, ряду авторов не удалось выявить *C. pneumoniae* в сосудистой ткани (Weiss et al., 1996; Paterson et al., 1998; Jantos et al., 1999). Противоречивые данные могут быть связаны с различными методиками забора образцов и мерами по предотвращению ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Многие проблемы в выявлении специфических нуклеотидных последовательностей *C. pneumoniae* пока не решены, поскольку на сегодняшний день нет стандартизованных, унифицированных и проверенных на практике диагностических систем. Методы амплификации применяются в качестве «домашних» методик с многочисленными модификациями в каждой лаборатории (Voman et al., 1999; Voman, Hammerschlag, 2002). Это касается чувствительности и специфичности, клинической оценки методов. В методическом плане это выбор праймеров, оптимизация проведения теста, в частности, экстракции нуклеиновых кислот, обнаружение продуктов амплификации, предотвращение и идентификация ложноположительных и ложноотрицательных результатов (Dowell et al. 2001). В табл. 11.8 приводятся методы выявления *Chlamydomypha pneumoniae* с помощью полимеразной цепной реакции в клинических образцах. В четырех верхних строчках показаны методы, протокол постановки которых

соответствует унифицированным критериям Центров по контролю за заболеваемостью в США для диагностики инфекций, вызванных *S. pneumoniae*:

- чувствительность и специфичность оценены более чем в двух лабораториях с помощью калибровочных и контрольных клинических образцов;
- аналитическая чувствительность метода – 1 или менее единиц, формирующих включение;
- специфичность метода проверена на других представителях *Chlamydiaceae* и на ДНК прокариотных и эукариотных организмов.

Пока ПЦР для выявления *S. pneumoniae* являются инструментом научных исследований и не выпускаются в виде коммерчески доступных тест-систем, сертифицированных для диагностики инфекции. Каждый из вариантов ПЦР, представленных в табл. 11.8, имеет свои достоинства и недостатки.

Таблица 11.8.

**Выявление *Chlamydomypha pneumoniae* с помощью полимеразной цепной реакции в клинических образцах**

Тип ПЦР	Мишень	Размер продукта амплификации (пар оснований)	Метод обнаружения	Публикация
Одноступенчатая ПЦР + ПЦР с рестрикционными ферментами	Клонированный фрагмент гена PstI	437	Электрофорез в агарозном геле	Campbell et al., 1992*
Одноступенчатая ПЦР	Ген 16S-rPHK	463	Электрофорез в агарозном геле	Gaydos et al., 1992*
Гнездная ПЦР + ПЦР «touchdown»	Ген MOMP	Наружный участок — 333; Внутренний участок — 207	Электрофорез в агарозном геле	Tong et al., 1993*
Одноступенчатая ПЦР + ПЦР «touchdown» + ПЦР «горячий старт» + многократная ПЦР	Ген 16S-rPHK	195	Электрофорез в агарозном геле	Madico et al., 2000*
Одноступенчатая ПЦР	Ген 16S-rPHK	463	Иммуноферментный анализ	Gaydos et al., 1993
Гнездная ПЦР	Ген 16S-rPHK	Наружный участок — 1397; Внутренний участок — 858	Электрофорез в агарозном геле	Black et al., 1994
Одноступенчатая ПЦР	Ген белка 53 кДальтон	499	Электрофорез в агарозном геле	Kubota, 1996

\* Протокол постановки соответствует унифицированным критериям Центров по контролю за заболеваемостью в США для диагностики инфекций, вызванных *Chlamydomypha pneumoniae* (чувствительность и специфичность оценены более чем в двух лабораториях с помощью калибровочных и контрольных клинических образцов; аналитическая чувствительность метода – 1 или менее единиц, формирующих включение на образец; специфичность метода проверена на других представителях *Chlamydiaceae* и на ДНК прокариотных и эукариотных организмов) (Dowell et al. 2001).

Продолжение таблицы 11.8.

Тип ПЦР	Мишень	Размер продукта амплификации (пар оснований)	Метод обнаружения	Публикация
Гнездная ПЦР	Ген 16S-рРНК	Наружный участок — 317; Внутренний участок — 178	Иммуноферментный анализ	Wilson et al., 1996
Гнездная ПЦР + множественная ПЦР	Ген 16S-рРНК	Наружный участок — 436; Внутренний участок — 221	Электрофорез в агарозном геле	Messmer et al., 1997
Гнездная ПЦР	Клонированный фрагмент гена PstI	Наружный участок — 437; Внутренний участок — 128	Электрофорез в агарозном геле + гибридизация, Southern blot	Maass et al., 1997
Гнездная ПЦР	Ген 16S-рРНК	Наружный участок — 463; Внутренний участок — 269	Электрофорез в агарозном геле	Nystrom-Rosander et al., 1997
Одноступенчатая ПЦР	Ген белка 60 кДальтон	183	Иммуноферментный анализ	Petitjean et al., 1998
Одноступенчатая ПЦР	Ген 16S-рРНК	465	Иммуноферментный анализ	Jantos et al., 1998
Одноступенчатая ПЦР + ПЦР «touch-down» + ПЦР «горячий старт»	Ген 16S-рРНК + Ген MOMP	165	Электрофорез в агарозном геле + гибридизация, Southern blot	Meijer et al., 1998
Гнездная ПЦР	Ген MOMP	Наружный участок — 496; Внутренний участок — 189	Флуоресценция	Lindholt et al., 1998
Одноступенчатая ПЦР + внутренний контроль	Ген 16S-рРНК	463	Иммуноферментный анализ	Metogho et al., 1997
Одноступенчатая ПЦР + ПЦР с рестрикционными ферментами + внутренний контроль	Ген 16S-рРНК	465	Электрофорез в агарозном геле	Nadrchal et al., 1999
Гнездная ПЦР	Ген 16S-рРНК	Наружный участок — 492; Внутренний участок — 304	Электрофорез в агарозном геле + точечная гибридизация	Pham et al., 1999

Гнездная ПЦР более чувствительна, чем одноступенчатая ПЦР, поскольку имеет две ступени амплификации и использует два набора праймеров. Недостатком гнездной ПЦР является увеличение риска контаминации и реамплификации продуктов, она дорогая и требует больше времени. При множественной ПЦР амплифицируется более одного продукта в одном анализе. Это имеет значение при разграничении различных видов *Chlamydiaceae*. Но при этом, если температура отжига индивидуальных праймеров различна, то чувствительность метода снижается.

Поэтому множественная ПЦР видоспецифична, но менее чувствительна, чем варианты, при которых амплифицируется одна мишень. Внутренние или амплификационные контроли позволяют контролировать ингибицию, которая может быть вызвана различными факторами. Недостатком этих контролей является то, что они могут конкурентно связывать праймеры, если таковые являются идентичными как для генов-мишеней, так и для внутренних контролей. Если используются другие праймеры для внутреннего контроля, то различия в условиях амплификации могут снизить чувствительность метода. ПЦР типа «горячий старт» увеличивает специфичность, поскольку предотвращается неспецифическое связывание праймеров. При этом необходимо применение специальных Taq-полимераз, выдерживающих «горячий старт». Если добавлять обычные полимеразы после старта, то открытие пробирки увеличивает риск контаминации. ПЦР типа «touchdown» увеличивает специфичность, поскольку начальная гибридизация праймер-затравки осуществляется при температурах больших, чем те, которые являются оптимальными для отжига. Однако при этом типе ПЦР требуется больше циклов, что увеличивает время постановки. Для обеспечения улучшения детекции продуктов ПЦР желательно использовать гибридизационные зонды. Они улучшают чувствительность и специфичность, по сравнению с методами визуализации, после электрофореза в агарозном геле и окраски этидия бромидом. Недостатком зондов является то, что они дороги и время постановки метода в целом увеличивается. Зонды, меченные флуоресцентной меткой, позволяют проводить оценку результатов в закрытой системе и могут работать в режиме реального времени (см. раздел «Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот»). Однако оборудование для таких систем очень дорогое.

Специфические рекомендации, относящиеся к проведению ПЦР для диагностики *S. pneumoniae*, связаны с особенностями данной инфекции. Забор, транспортировка и обработка образцов принципиально не отличаются от выделения в культуре клеток. Образец помещают в транспортную среду, суспензируют и разливают по аликвотам (1мл). Центрифугируют 18000 g 15 минут. Из осадка экстрагируют ДНК. При обработке образцов крови применяются специальные пробирки для отделения мононуклеарных клеток от других форменных элементов крови. Образцы тканей разрезаются на маленькие кусочки ( $\approx 25$  мг), и формируются аликвоты, чтобы избежать многократного замораживания и оттаивания при повторных анализах.

Работа с образцами, контролями и реагирующей смесью ПЦР должна проводиться в отдельных помещениях, чтобы избежать контаминации. Следует применять пипетки с защитными барьерами против аэрозолей, менять халаты и перчатки. Мебель и оборудование должны регулярно проверяться на контаминацию ДНК путем анализа смывов и соскобов. ДНК *S. pneumoniae* экстрагируется из клинических образцов при использовании надежного и проверенного в данной лаборатории метода. Каждый новый метод должен проверяться перед рутинными исследованиями на возможность ингибиции. Положительные и отрицательные контроли следует проводить в каждой постановке, включая экстракцию ДНК и процедуру детекции. Положительные контроли должны содержать очень малое количество ДНК (менее 10 нанограммов). Их готовят титрованием из зараженной культуры с малым накоплением *S. pneumoniae* (менее 10 единиц, формирующих включение). Каждая лаборатория готовит наборы контролей от большого до малого количества специфической ДНК. В каждую пятую процедуру экстракции ДНК вводят отрицательный контроль (вода вместо клинических образцов). Для контроля амплификации и самой полимеразной реакции используют постороннюю ДНК, которую вводят в образцы. Применяют несколько внутренних контролей, таких как ДНК



λ фага, MIMICS – конкурентные праймеры, клонированные фрагменты рUC19 вектора (Kubota, 1996; Metogho et al., 1999; Siebert, Larrick, 1993). Поскольку контроли могут конкурировать с мишенями, количество копий ДНК-контролей не должно быть большим.

При определении аналитической чувствительности метода титруют взвеси клеточных культур, зараженных как минимум двумя известными штаммами *S. pneumoniae*: TW-183 (ATCC VR-2282) и SM-1 (ATCC VR-1360). Специфичность новых праймеров и зондов следует проверять на банках ДНК близких видов – *S. psittaci*, *S. trachomatis* и других бактерий и вирусов, которые обычно обнаруживают в дыхательных путях, а также на ДНК человека. При этом следует применять одну из методик, соответствующих критериям Центров по контролю над заболеваемостью в США для диагностики инфекций, вызванных *Chlamydomypha pneumoniae* (табл. 11.8). Исследователи, проводящие диагностические тесты, не должны знать о клиническом статусе пациента, предварительном диагнозе и результатах исследования другими методами (антигены, антитела, культура и т.д.).

### 11.8. УНИФИКАЦИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА

Унификация лабораторных методов диагностики хламидийных инфекций, как часть общей системы унификации, означает научно обоснованный выбор и внедрение в практику работы диагностических лабораторий единых методов и процедур, удовлетворяющих современному уровню развития медицинской науки и потребностям практики (Schachter et al., 1992; Taylor-Robinson, 1992). Унификация призвана обеспечить надежность и сопоставимость результатов диагностических исследований, выполняемых в различных лабораториях. Унификация методов диагностики хламидиоза проводится в соответствии с утвержденными Министерством здравоохранения Украины методическими рекомендациями (Коляденко и соавт., 1999; Мавров и соавт., 2000; Возианов и соавт., 2002).

Система унификации диагностики хламидиоза включает следующие этапы:

- анализ литературы по методам выявления хламидиоза;
- сравнение и выбор методов в соответствии с определенными критериями;
- экспериментальная отработка метода и оптимизация условий его определения;
- обсуждение предлагаемого метода на «Комиссии по унификации и контролю качества лабораторных исследований».

После этого методы публикуются в виде специальных выпусков «Унификация клинических лабораторных методов исследования» (Мавров и соавт., 2000). Они рассылаются в клиничко-диагностические лаборатории и научно-исследовательские институты с целью испытания рекомендуемых методов и получения отзывов на них. Система унификации методов – это непрерывный, динамичный процесс. В работе по унификации методов участвует широкий круг специалистов, ученых, врачей, работников лабораторий.

В основе выбора унифицированного метода лежат аналитические, медицинские, этические и технико-экономические критерии, что позволяет сочетать достижения науки и практические возможности диагностических лабораторий, без чего невозможно реальное внедрение унифицированных методов в практику (Barnes, 1989; Barnes et al., 1990).

К аналитическим критериям относятся: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность, правильность, воспроизводимость. Преимущество должно отдаваться методу, имеющему наиболее высокие аналитические показатели. Однако, учитывая, что унифицированные методы предназначены для работы в практических лабораториях, выбор метода не может основываться только на аналитических критериях.

Вторую группу критериев, имеющих медицинский характер, составляют: диагностическая значимость показателей с учетом применения выбранного метода; длительность процесса анализа; способ взятия материала для исследования. Время, которое требуется для выполнения анализа и получения лабораторной информации клиницистами, должно быть сопоставимо с допустимыми сроками установления диагноза и сроками принятия диагностического и лечебного решения. В этом плане экспресс-методы по медицинским критериям имеют преимущество перед другими методами, так как позволяют получить результат за несколько минут.

Определяющее значение имеет задача исследования. Проводится ли оно для предварительного диагноза, как отборочный тест, или для окончательного – как подтверждающий тест. Выбор метода может быть основан на том, служит ли он для первичной диагностики хламидиоза или для контроля излеченности. Так, тесты, выявляющие антиген и ДНК (РНК) хламидий, могут давать положительный результат в течение 5 недель после окончания лечения. Методы, основанные на диагностическом выделении живых хламидий, могут служить для контроля излечения в первые недели (Moi, Daniclssoon, 1986; Nachamkin et al., 1987; Radcliffe et al., 1990; Claas et al., 1991; Vogels et al., 1993; White et al., 1993).

Среди критериев технико-экономического характера выделяют: расход рабочего времени на производство одного исследования; стоимость реактивов и доступность их широкому кругу практических лабораторий; влияние реактивов на здоровье исследователя (токсичность, канцерогенность, тератогенность); наличие приборов и аппаратуры; достаточная квалификация исполнителя лабораторного исследования; возможность адаптации метода к автоанализаторам. Появление этой группы критериев обусловлено массовым применением методов лабораторной диагностики хламидийных инфекций.

Унификация является первым этапом для перехода к более высокой ступени – стандартизации методов. Принципы стандартизации лабораторных методов диагностики хламидиоза предусматривают разработку ряда научных проблем, касающихся системы единых требований к методу и направленных на улучшение аналитических качеств метода и сравнимости результатов исследования. К первоочередным проблемам стандартизации методов относятся (Меньшиков и соавт., 1987):

- стандартизация аналитических качеств метода или оценка диагностической надежности метода;
- разработка референтных методов («золотой стандарт»), требований к сравнению методов;
- составление требований к характеристике метода;
- унификация терминологии, стандартизация единиц измерения;
- разработка требований к контрольным и калибровочным материалам.

Решение перечисленных проблем создает теоретические основы стандартизации методов лабораторной диагностики хламидийных инфекций.

### 11.8.1. Оценка качества лабораторной диагностики хламидиоза

Качество результата лабораторного исследования зависит от многих факторов (качества реактивов, оборудования, квалификации лаборантов). Определяющее значение имеет качество самого метода. Для объективной оценки качества метода рекомендуется оценка его аналитической надежности. Оценка аналитической надежности метода – продолжительный процесс, во время которого накапливается информация об аналитических качествах метода. При оценке надежности метода задача состоит в выявлении погрешностей, зависящих от метода, поэтому важно оценку надежности метода проводить не в одной, а в нескольких референтных лабораториях.

Количественные аналитические методы лабораторных исследований разнообразны. Некоторые способы оценки надежности метода могут быть пригодны не для всех методов. Оценка аналитической надежности должны подвергаться методы, рекомендуемые для официального утверждения, новые и модифицированные методы. Основными критериями, по которым оценивается метод, являются чувствительность, специфичность, правильность, воспроизводимость (Меньшиков и соавт., 1987).

Чувствительность метода определяется его способностью выявлять наименьшее количество исследуемого вещества (для качественного метода) или наименьшие различия между двумя концентрациями исследуемого вещества (для количественного метода). В процессе калибровки устанавливается диапазон линейности калибровочной кривой, что является частью аналитической характеристики метода. В диапазоне линейности аналитическая чувствительность определяется наклоном калибровочной кривой. Нижний предел чувствительности метода – это концентрация исследуемого вещества, которая соответствует наименьшему результату определения, статистически достоверно отличающемуся от показателей отрицательного контроля (холостой пробы). Нижний предел чувствительности метода может быть охарактеризован количественно. Для определения нижнего предела чувствительности для фотометрических методов проводят многократное исследование отрицательной (холостой) пробы и проб с низкой концентрацией анализируемого вещества и устанавливают статистически достоверные различия. Нижнее значение концентрации анализируемого вещества, статистически отличающееся от контроля, будет количественно соответствовать нижнему пределу чувствительности метода. Экспериментально установлено, что обычно нижний предел чувствительности в количественных фотометрических методах равен среднему значению холостой пробы ( $X$ ) плюс 3 средних квадратичных отклонения ( $S$ ).

$$A = X + 3S$$

Большинство тестов, предназначенных для диагностики хламидиоза, являются качественными (не количественными) тестами, которые выдают результат в количественной форме (оптическая плотность, степень люминесценции и т.д.). Абсолютно совершенных тестов не бывает. Результат всегда подвержен случайным и систематическим ошибкам. Часть из них связана с человеческим фактором (нарушения инструкций по проведению теста), часть – с техникой (возможности прибора, наличие неспецифического фона), а часть – с природными явлениями (неспецифические гидрофобные, ионные взаимодействия в реакциях антиген-антитело и гибридизация нуклеиновых кислот). Поэтому важно определить порог чувствительности – наименьшее количественное значение результата, которое, безусловно, следует

считать положительным, и «серую зону» – диапазон значений, которые предполагают повторение теста или применение другого метода. Обычно эти показатели определяются производителем тест-систем в процессе разработки тестов (статистический порог). Однако их необходимо уточнять в процессе клинических испытаний (клинический порог). Клинический порог предполагает учет клинико-эпидемиологической информации, цели применения теста (скрининг, диагностика у лиц с симптомами, решение правовых вопросов), особенности исследуемой популяции.

Специфичность метода – способность метода измерять лишь тот компонент, для определения которого он предназначен. Низкая специфичность приводит к получению неправильных (ложноположительных) результатов. Оценка специфичности не имеет завершения, поскольку любое вещество может повлиять на результаты. Для оценки аналитической специфичности следует использовать близкие по химической структуре группы веществ, которые имеют практическое значение (например, бактерии, имеющие сходные антигены с хламидиями). Интерференция, в отличие от низкой специфичности, обусловлена влиянием различных веществ на ход реакции. Способ влияния (повышение, понижение) и степень влияния могут быть различными. Важным аспектом этой проблемы является интерференция лекарств. Лекарственные вещества в зависимости от вида, дозы, способа применения могут воздействовать на результаты лабораторных исследований различными путями. Различают фармакологическую интерференцию в организме и техническую интерференцию в ходе выполнения анализа. Низкая специфичность и интерференция снижают правильность метода. Поэтому предпочтение следует отдавать более специфичным методам и свободным от интерференции.

При клинических испытаниях чувствительность и специфичность качественных диагностических тестов, выявляющих инфекцию, оценивается в результате обследования различных популяций в многоцентровых исследованиях. Исследования эти сравнительные, то есть используется другой тест (или комбинация тестов) в качестве стандарта для определения истинно-положительных и истинноотрицательных результатов. В данном случае чувствительность и специфичность зависят от свойств самого стандарта и поэтому не являются абсолютными (табл. 11.9 и 11.10).

Таблица 11.9.

**Определение чувствительности, специфичности и прогностической ценности испытуемого диагностического лабораторного теста по отношению к стандартному тесту**

Испытуемый тест	Истинно-	
	положительные	отрицательные
положительные	a	b
отрицательные	c	d
<p><b>Чувствительность</b> — <math>[a / (a + c)]</math> — вероятность, что испытуемый тест даст положительный результат с истинно-положительным образцом</p> <p><b>Специфичность</b> — <math>[d / (b + d)]</math> — вероятность, что испытуемый тест даст отрицательный результат с истинно-отрицательным образцом</p> <p><b>Прогностическая ценность положительного результата</b> — <math>a / (a + b)</math> — вероятность, что положительный результат испытуемого теста является истинно-положительным</p> <p><b>Прогностическая ценность отрицательного результата</b> — <math>d / (c + d)</math> — вероятность, что отрицательный результат испытуемого теста является истинно-отрицательным</p>		



Таблица 11.10

Чувствительность диагностических методов выявления *Chlamydia trachomatis*  
(усредненные данные)

Метод	Диапазон чувствительности (%)
Полимеразная цепная реакция	90–100
Выделение в культуре клеток	60–80
Иммунофлуоресценция	55–75
ДНК-гибридизация	50–70
Иммуноферментный анализ	50–70
Экспресс-тесты на основе иммунофилтрации и иммунохроматографии	40–60
Окраска по Романовскому-Гимза	20–40

Более широкие диапазоны чувствительности приводит Stary (2000) на основании анализа литературы 1980–2000 годов (рис. 11.11).

Прогностическая ценность тестов зависит от чувствительности и от популяции. В популяциях с низкой распространенностью хламидиоза (менее 5%) прогностическая ценность тестов с чувствительность ниже 80% является низкой и может не удовлетворять потребностям скрининга (Ilstrup, 1990).

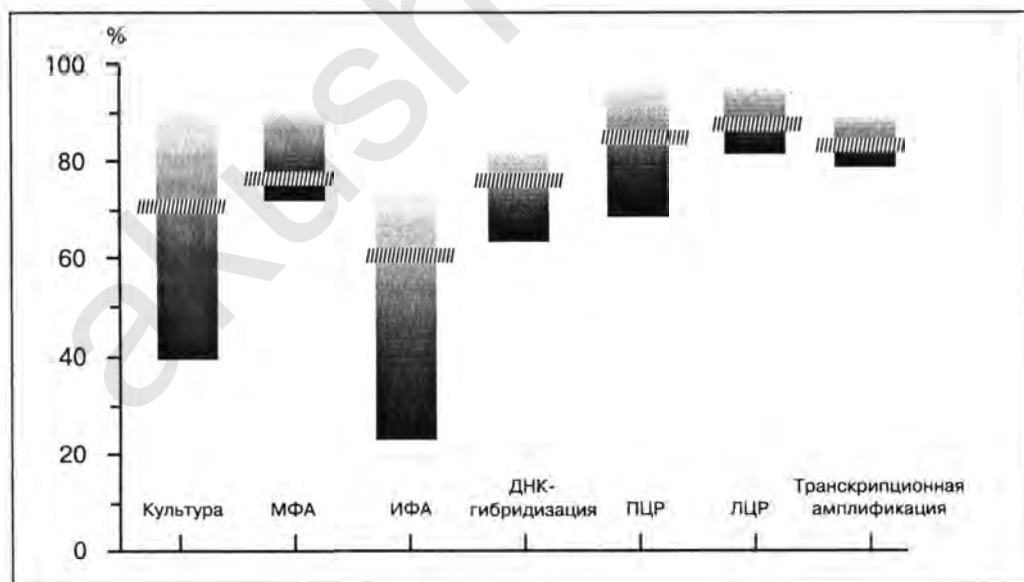


Рисунок 11.11. Диапазон чувствительности различных методов диагностики инфекций, вызванных представителями *Chlamydiales* (Stary, 2000).

Правильность результатов – соответствие среднего значения результатов повторных определений одного и того же материала должной (номинальной) величине. Правильность не имеет числовой величины. Правильность метода определяется правильностью результатов, полученных этим методом, и зависит от наличия систематических погрешностей метода. Систематическая погрешность метода может быть обусловлена рядом причин (низкой специфичностью метода, неправильным построением калибровочной кривой, неправильными контролями, неправильной постановкой и т. д.). Статистическим критерием правильности является средняя арифметическая и степень ее отклонения от должного (номинального) значения. Способы определения правильности могут быть следующие. Способ добавки – внесение в биологическую жидкость точно взвешенного количества анализируемого вещества и определение его с помощью исследуемого метода. Способ смешивания проб – биологическая жидкость с низкой и с высокой концентрацией исследуемого вещества смешивается в различных соотношениях. Исследование контрольного материала с известным содержанием компонентов – наиболее простой способ оценки правильности. Однако он может быть использован только для быстрой ориентировочной оценки правильности метода. Процедура изготовления контрольного материала, хранение его, вид используемой сыворотки могут в значительной степени изменить истинное содержание компонента. Наиболее информативным способом является способ сравнения методов, который позволяет определять общую систематическую погрешность метода. Смысл сравнения методов состоит в сравнении результатов, полученных методом-кандидатом (т. е. методом, правильность которого исследуется) и сравнительным методом (стандартом), который должен давать правильные результаты. Поэтому крайне важную роль играет правильность стандартного метода, используемого для сравнения. Оптимальным для этих целей является применение референтного метода (так называемого золотого стандарта).

Референтный (эталонный) метод – это метод, обладающий максимальной специфичностью, правильностью и воспроизводимостью результатов определения без учета экономических затрат. Он служит главным образом для сравнения методов при оценке аналитической надежности унифицированных и других методов. При диагностике хламидийных инфекций в большинстве случаев таким методом может служить диагностическое выделение хламидий в культурах клеток или в куриных эмбрионах. При персистентной хламидийной инфекции таким методом может служить полимеразная цепная реакция. Однако референтные методы могут быть недоступны лабораториям. Поэтому в качестве сравнительных могут использоваться методы, правильность которых исследована и результаты не дают существенного отклонения от истинных величин (например, тест-системы, которые хорошо себя зарекомендовали, или проверенные, традиционные методы).

Для более точной оценки правильности метода-кандидата сравнение методов следует проводить в соответствии с правилами сравнения методов. Эти правила предусматривают точное соблюдение всех письменных указаний по применению метода, проведение исследований под контролем качества, с применением единого контрольного материала для гарантии стабильности условий исследования. В количественных методах должны быть проверены точность и линейность калибровочных кривых, по возможности применяться одни и те же реактивы, приборы, работа должна проводиться одними и теми же лаборантами. Правильность метода оценивается на всем диапазоне измеряемых концентраций, поэтому рекомендуется исследовать образцы с низкими, нормальными и повышенными концентрациями

вещества. Сравнение методов можно проводить на контрольном материале и на биологическом материале, полученном от больных и здоровых лиц. Для статистической обработки результатов сравнения применяют методы оценки различий (параметрические и непараметрические), корреляционный и регрессивный анализ.

Воспроизводимость результатов – соответствие результатов повторных определений в одном и том же материале. Воспроизводимость не имеет числовой величины, она определяется степенью разброса результатов. Воспроизводимость диагностического метода определяется постоянством результатов, полученных этим методом. Понятие, обратное воспроизводимости, – разброс результатов, или аналитическая вариация, зависит от наличия случайных погрешностей и может быть охарактеризовано количественно. В зависимости от условий определения различают аналитическую вариацию (в серии, во времени) и межлабораторную. Воспроизводимость метода зависит от случайных погрешностей, обусловленных количеством процедур метода (осаждение, центрифугирование, пипетирование), а также стабильностью окрашенного комплекса и другими причинами. Воспроизводимость рассчитывают либо по двум параллельным результатам при исследовании различных образцов, либо по результатам повторных определений на одном и том же контрольном материале в течение не менее 20 дней, следующих друг за другом. Контрольный материал должен быть стабильным в течение всего периода проверки. Можно использовать пригодный биологический материал.

Статистическим показателем разброса результатов является среднеквадратическое отклонение  $S$  и относительный показатель разброса результатов – коэффициент вариации  $V$ . Сравнивают аналитическую вариацию метода с помощью  $F$ -теста (Меньшиков и соавт., 1987; Лапач и соавт., 2000). Чем меньше коэффициент вариации, тем выше воспроизводимость результатов, получаемых тем или иным методом.

### **Дискретивный анализ**

Для диагностики хламидийной инфекции постоянно появляются новые тесты. Диагностические возможности новых тестов определяются чувствительностью – вероятностью, что результат у заведомо инфицированного пациента покажет положительный результат, и специфичностью – вероятностью, что тест от заведомо неинфицированного пациента будет отрицательным. В реальности при клинических испытаниях новых тестов исследования проводятся на случайной выборке больных, инфекционный статус которых заведомо неизвестен. Поэтому необходим метод сравнения – «золотой стандарт». Традиционно тестом сравнения для изучения новых методов лабораторной диагностики хламидиоза являлось диагностическое выделение в культуре клеток. Специфичность теста – 100%, если исключить контаминацию культуры лабораторными штаммами хламидий. Однако культура клеток не может быть идеальным «золотым стандартом», поскольку чувствительность этого метода менее 100%. Чувствительность культурального метода диагностики зависит от многих факторов (подверженных значительным вариациям), которые сложно контролировать (прием антибиотиков, забор и транспортировка образцов, процедура культивирования).

Если новый тест потенциально более чувствителен, чем референс-тест (который используется для определения, инфицирован пациент или нет), то значительное число образцов от инфицированных субъектов могут быть отрицательными в тесте сравнения и положительными в новом тесте. Такая ситуация может значительно исказить истинные показатели чувстви-

тельности и специфичности (Walter, Irwig, 1988). Поэтому в качестве выхода был предложен так называемый дискрептивный анализ (Schachter et al., 1988). Дискрептивный анализ при диагностике хламидиоза – это попытка выявить истинноположительные результаты, которые не были выявлены культурой клеток. Для этого образцы, давшие отрицательный результат в культуре и положительный в сравниваемом методе, подвергают дальнейшим исследованиям с помощью других проверенных, известных тестов. Если они положительны, то при подсчете чувствительности и специфичности их считают истинноположительными. Этот метод не позволяет полностью устранить ошибки, но он существенно снижает отклонения от истинных значений (Green et al., 1998; Green et al., 2001; Hawkins et al., 2001; Cheng et al., 2001; Darwin et al., 2002).

Некоторые исследователи считают, что дискрептивный анализ «работает» в пользу нового теста. Они подвергают его критике за то, что он не вполне согласуется с методами научной статистики и является, в некоторой степени, произвольным (Hadgu, 1996; 1997; 2000). Они считают, что использование дискрептивного анализа нарушает фундаментальный принцип лабораторной диагностики. Новый, непроверенный тест не должен служить для определения истинноположительных результатов. Поскольку только ложноположительные тесты подвергаются дополнительным проверкам, то может создаться предвзятое впечатление по отношению к новому тесту. Как правило, первые пилотные данные дают более высокие показатели чувствительности, чем последующие, более тщательные и многочисленные многоцентровые исследования. Вместо дискрептивного анализа предлагается применять статистическое моделирование и использовать высококачественную культуральную диагностику в качестве референс-теста при проверке новых методов диагностики (Hadgu, 1996; Danielsson et al., 1996).

Чувствительность и специфичность диагностического теста на выявление инфекции не является универсальной константой. Они зависят от квалификации исполнителя и выбранного порога. Кроме того, природа хламидийной инфекции такова, что в ряде случаев наличие или отсутствие маркеров возбудителя в клинических образцах не является абсолютно идентичным понятию – есть инфекция или нет. Типичные примеры – инкубационный период и персистентная инфекция. Большинство исследователей считают, что дискрептивный анализ полезен для оценки диагностического теста. Лучше понаблюдать и перепроверить здорового, чем пропустить больного (Schachter et al., 1996; 1998). Кроме того, не следует забывать, что окончательный диагноз врач ставит не исключительно по результатам лабораторных тестов, хотя они имеют решающее значение. В диагностике помогают клиника, анамнез, эпидемиологические данные.

### 11.9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Под контролем качества работы диагностических лабораторий следует понимать систему мероприятий, предназначенных для выявления и оценки систематических, случайных и субъективных погрешностей в результате исследований, которые проводятся в лаборатории. Контроль дает возможность судить о правильности организации лабораторной диагностики хламидийных инфекций, о степени квалификации лабораторных работников, позволяет своевременно осуществлять мероприятия, направленные на улучшение качества работы лабораторий.



Принципиальное значение имеет вопрос о регистрации и сертификации методов диагностики, применяемых в клинике. К сожалению, некоторые методы, применяемые в настоящее время в Украине, не прошли сертификационных испытаний в Комитете по вопросам иммунобиологических препаратов. Только зарегистрированные и сертифицированные в Украине тест-системы можно применять для диагностики в практическом здравоохранении.

### 11.9.1. Внутрिलाбораторный контроль

Внутрिलाбораторный контроль предусматривает осуществление ряда мероприятий, направленных на проверку всех разделов работы в лаборатории. Необходимым является периодический технический контроль оснащения и аппаратуры в лабораториях специалистами предприятий «Медтехника». Персонал лабораторий в начале каждого дня проверяет правильность работы термостатов, холодильников, водяных бань и сушильных шкафов. Любое автоклавирование может сопровождаться проведением химического контроля (бензойная кислота) и один раз в месяц – биологического. Контроль реактивов. Реактивы тщательно готовят, маркируют с указанием даты изготовления и фамилии производителя. Все реактивы сохраняют в стаканах желтого стекла с туго притертыми пробками. Результаты проверки оформляются актом, неудовлетворительные среды не используют.

Внутренние контрольные образцы. Заведующий лабораторией вводит контрольные образцы в регулярный поток анализов с таким расчетом, чтобы в течение месяца проверить качество работы каждого работника лаборатории. Как контрольные, используются препараты, которые прошли исследование в данной лаборатории и оказались наиболее сложными в диагностическом отношении. Результаты контроля заведующий лабораторией обсуждает на конференциях лабораторного отделения.

### 11.9.2. Межлабораторный контроль

Межлабораторный контроль качества – это сравнительный контроль результатов лабораторных исследований, полученных в ряде лабораторий. Он разрешает:

- обнаружить ошибочные результаты исследования, которые приводят к гипер- и гиподиагностике хламидиоза;
- оценить профессиональную подготовку лабораторных работников;
- стандартизировать и унифицировать методы исследований.

После определения состава контролируемых лабораторий контролирующая лаборатория рассылает контрольные образцы участникам контроля вместе с планом исследования.

Лаборатории, которые обследуются, посылают свои результаты исследования контрольных образцов в контролирующую лабораторию, где проводится оценка и сравнение полученных результатов.

О качестве работы каждой контролируемой лаборатории информируются главные врачи, заведующие лабораториями соответствующих учреждений.

Межлабораторному контролю подлежат все клиничко-диагностические лаборатории, которые занимаются диагностикой хламидиоза.

Контроль должен осуществляться всюду и систематически, не реже одного раза в 6 месяцев. Контрольные исследования должны:

- привлекаться к обычному ходу работы лаборатории;
- проводиться тем самым персоналом, который выполняет повседневные исследования;
- проводиться теми самыми методами, которые лаборатория использует в повседневной практике.

Для более объективной оценки выполнения непосредственный исполнитель не должен знать, что исследуемый материал является контрольным.

Порядок осуществления контроля. Контроль осуществляют по графику 1 раз в месяц следующим образом:

1. Рассылка в контролируемые лаборатории по 5 пар заведомо положительных и отрицательных образцов. В лабораториях присланные образцы исследуют и возвращают с подробным описанием результатов в контролирующие лаборатории. Вывод, подписанный главным врачом и зав. лабораторией, направляют в контролируемую лабораторию вместе с контрольными образцами.
2. Запрашивание из контролируемых лабораторий 5 пар образцов, в которых были найдены хламидии. Присланные препараты исследуют, и вывод о качестве лабораторной диагностики направляют главным врачам соответствующих учреждений.
3. Выезд врачей-лаборантов контролирующих лабораторий в лечебно-профилактические учреждения – для контроля качества лабораторной диагностики хламидиоза на местах, а также для предоставления консультативно-методической помощи.

При выявлении лабораторий с дискордантными результатами необходимо введение обязательного контроля за их работой. Результаты контроля оформляют актом (выводом), один экземпляр которого остается у контролирующей лаборатории, а другой направляют вместе с рекомендациями срочных мер по ликвидации имеющихся недостатков главному врачу обследуемого учреждения. В конце календарного года контролирующие организации информируют соответствующие научно-методические и контрольные центры по лабораторному делу МОЗ Украины о результатах контроля и мероприятиях по ликвидации недостатков в работе обследуемых лабораторий.

При осуществлении лабораторной диагностики хламидиоза врачи-лаборанты должны руководствоваться данными методическими рекомендациями.

### 11.9.3. Мероприятия в случае аварии в лаборатории

О каждом аварийном случае немедленно сообщать заведующему лабораторией. При попадании заразного материала на одежду немедленно обработать ее дезраствором, протереть влажным тампоном, смоченным в дезрастворе. Руки продезинфицировать 70° спиртом и помыть с мылом. При попадании заразного материала на лицо, все лицо смочить 70° спиртом и тщательно вымыть. Глаза промыть 0,01% раствором марганцевокислого калия. При попадании заразного материала в рот – прополоскать рот раствором марганцевокислого калия. При попадании заразного материала на пол, мебель, стены и прочие предметы – зараженное место промыть дезраствором и водой.

#### 11.9.4. Документация

Материал для исследования присылается в лаборатории с сопроводительной запиской. Необходимо указать в ней такие данные: имя, фамилия, возраст, адрес пациента, номер истории болезни (амбулаторной или стационарной), клинический диагноз, результаты предшествующих лабораторных, в том числе микробиологических исследований, проведенное antimикробное лечение, вид материала, время его взятия и направления на исследование. Регистрацию результатов исследования приводят в журнале лаборатории (учетная форма № 48, утвержденная МОЗ). Эту же форму используют для регистрации проводимых контрольных мероприятий и результатов контроля (Калужная и соавт. 2002).

### ГЛАВА 12. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ (раздел написан совместно с Чиновым Г.П.)

#### 12.1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

##### 12.1.1. Урогенитальные хламидиозы

Впервые связь между хламидиями и генитальной инфекцией была показана в 1910 году, когда Нейман обнаружил характерные включения в соскобах из половых органов. Тогда же Fritsch и коллеги показали с помощью экспериментов на обезьянах, что хламидии вызывают уретриты у мужчин, цервициты у женщин и конъюнктивиты у детей (Hare, Thin, 1983). Окончательно этиологическая роль хламидий в возникновении воспалительных заболеваний гениталий была доказана в 1959 году, когда Jones и соавторы (1959) впервые выделили *C. trachomatis* в куриных эмбрионах из половых путей женщин, дети которых болели конъюнктивитом с включениями (Jones et al., 1959). Затем Dunlop и соавторы выделили *Chlamydia trachomatis* от пациентов с негонококковым уретритом (НГУ) (Dunlop et al., 1966).

Урогенитальные хламидиозы являются самыми распространенными среди инфекций, передающихся половым путем (ИППП). По последним оценочным данным в мире, ежегодно этой патологией заболевают около 90 миллионов людей (Gerbase et al., 1998). По мнению Schachter (1999), это число занижено, поскольку скрининг и лабораторная диагностика хламидийной инфекции во многих странах не налажены должным образом.

Половая хламидийная инфекция у мужчин, женщин и детей обычно проявляется после инкубационного периода, продолжающегося от 5-7 до 30 дней. Спектр клинических проявлений достаточно широк. Инфекционный процесс в мочеполовой сфере может протекать как в активной форме (острой или хронической), так и в латентной форме, характеризующейся бессимптомным течением (Молочков, Ильин, 1998; Мавров, 2002). Возможно изменение этих форм инфекции в динамике патологического процесса под влиянием различных факторов. Урогенитальная хламидийная инфекция протекает в хронической и персистентной форме и реже – в виде острых воспалительных процессов. Клиническая картина заболевания во многом зависит от вирулентности возбудителя, сроков, прошедших с момента инфицирования, топографии поражения и выраженности местных и общих реакций макроорганизма. Эти факторы обуславливают разнообразие клинических проявлений манифестных форм хламидиоза или его бессимптомное

течение. Долгое время считалось, что хламидийная инфекция не обладает клинической патогномичностью (Шаткин, Мавров 1983; Ильин, 1991). В настоящее время, когда стала доступной этиологическая диагностика хламидийной урогенитальной инфекции с помощью ряда лабораторных методов, эти представления подверглись пересмотру. За последние два десятилетия установлены объективные клинические характеристики для различных форм заболеваний мочеполовой системы, вызываемых хламидиями (Мавров, 2002). Единой клинической классификации урогенитального хламидиоза не существует. Выделяют впервые диагностированный и хронический рецидивирующий урогенитальный хламидиоз; активную, хроническую, обострение хронической и персистирующую инфекцию, а также острую, подострую, хроническую и рецидивирующую хламидийную инфекцию (Прохоренков, Шапран, 2002). Глазкова и Герасимова (1997) предлагают разделять генитальный хламидиоз на острую форму (осложненную и неосложненную), хроническую форму (с топической локализацией процесса) и персистентную форму.

### Урогенитальные хламидиозы у мужчин

Хламидийный уретрит является наиболее распространенной формой урогенитальной хламидийной инфекции у мужчин, протекающей с клиническими симптомами. Хламидийные уретриты вызываются *Chlamydia trachomatis*, сероварами от D до K. В клинической практике уретрит может быть результатом смешанной инфекции, где хламидии сочетаются с другими бактериями, включая *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Trichomonas vaginalis* и анаэробные бактерии, вызывающие бактериальный вагиноз у женщин (Horner et al., 2001; Taylor-Robinson, 2002; Pepin et al., 2001; Keane et al., 1997; Bowden et al., 1998).

При хламидийном уретрите инкубационный период составляет 7-14 дней (Stamm et al., 1984). Субъективные жалобы больных – неприятные ощущения, зуд, боль в уретре, учащенные позывы к мочеиспусканию, выделения. Заболевание протекает по типу острого, подострого или хронического воспаления. При остром уретрите больные жалуются на боль в мошонке, промежности, в заднем проходе, в поясничной и крестцовой областях, по ходу седалищного нерва и в нижних конечностях. Однако для хламидийного уретрита наиболее характерно хроническое и реже – острое или подострое течение болезни. Частым проявлением уретрита являются выделения из мочеиспускательного канала слизистого, слизисто-гнойного или редко – гнойного характера. В острых случаях они стекают свободно или появляются при надавливании. У большинства пациентов с острым или подострым началом заболевания интенсивность выделений уменьшается в течение нескольких дней. При малосимптомном уретрите с незначительными жалобами выделения очень скудные, в виде «утренней» капли. Нередко выделения появляются после длительной задержки мочи, иногда при дефекации или в конце мочеиспускания. У 20-23% обследуемых, больных хламидийным уретритом, выделения отсутствуют (Burstein, Zenilman, 1999; Stamm et al., 1984). По данным многолетних наблюдений, проведенных в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, обильные выделения были у 11%, умеренные – у 24% и скудные – у 53% больных, у 12% больных выделений не было совсем. Слизистый характер выделений отмечался у 58%, гноисто-слизистый – у 24% и гнойный – у 7% больных (Мавров, 2002). При незначительном количестве выделений моча в первой и второй порциях обычно прозрачная и содержит единичные или множественные слизисто-гнойные нити. При большом количестве выделений моча может быть мутной в первой или в обеих порциях. У больных отмечают различную степень воспалительных изменений в области наружного отверстия мочеиспускательного канала (гиперемия, пастозность, слипание). Нередко удается установить признаки воспаления парауретральных протоков.



Хламидийный парауретрит редко вызывает у больных субъективные жалобы, но вследствие эпидемиологической опасности его диагностика является одной из задач клинического обследования для назначения адекватной терапии. При уретроскопии не определяются какие-либо характерные для хламидийной инфекции изменения слизистой оболочки мочеиспускательного канала. Обычно у пациентов обнаруживают мягкий инфильтрат, остаточные явления мягкого инфильтрата, переходный инфильтрат и литтреиты. В отдельных случаях может быть и твердый инфильтрат. В предстательной части канала нередко определяют ограниченные грануляции и поражение семенного бугорка. Воспалительный процесс может захватывать бульбоуретральные железы (Мавров, 2002).

Хламидийный куперит часто протекает без субъективных жалоб больных, но иногда имеются жалобы на периодическую боль в области промежности и бедра. В этих случаях бульбоуретральную железу обычно прощупывают в виде плотного узелка величиной с горошину.

Мужчины с бессимптомным хламидийным уретритом являются резервуаром инфекции для женщин. Риск заражения – 65% (Lin et al., 1998). Наличие хламидийного уретрита у мужчины увеличивает в 2-3 раза риск передачи ВИЧ-инфекции своим половым партнерам (Winter et al., 1999).

Хламидийный простатит является частым осложнением хламидийного уретрита (Weidner et al. 1983). По данным Маврова (1985), простатит развивается у 46% больных хроническим хламидийным уретритом. Ряд исследователей отвергают участие хламидий в развитии простатита. Приводятся доводы об отрицательных результатах культурального исследования секрета предстательной железы, отсутствии хламидийных антител в сыворотке крови больных простатитом, отсутствии тропизма хламидий к эпителию, выстилающему протоки и ацинусы предстательной железы (Королюк и соавт., 1993; Corradì et al., 1993; Mazzoli et al., 1995). Другие авторы считают обоснованным диагноз хламидийного простатита при обнаружении хламидий в секрете предстательной железы (Purvis, Christiansen, 1993; Адаскевич, 1999; Деревянко, Нефедова, 2000). Непатогномичность клинических проявлений для различных этиологических форм простатитов, отсутствие четких критериев этиологического диагноза ведет к недооценке этиологической значимости *Chlamydia trachomatis* в этиологии хронического простатита. Этиологическая роль *C. trachomatis* в возникновении хронического простатита признается большинством исследователей. У больных простатитом хламидии выделены из уретры (Болотовский, Перламутров, 1990; Nielsen, Christensen, 1984) при трансперитонеальной пункции простаты (Doble, Thomas, 1989; Poletì, Medici, 1985), а антитела к хламидиям выделены в сыворотке крови (Болотовский, Перламутров, 1990). Однако Doble et al. (1989) при обследовании 50 больных хроническим бактериальным простатитом (путем трансперитонеальной пункции простаты под контролем УЗИ) не обнаружили хламидии в секрете ни у одного из пациентов. Правда, авторы не исключают хламидии в качестве инициаторов воспалительного процесса в железе. Вопрос о том, насколько часто хламидии поражают предстательную железу, вызывая тем самым снижение фертильности эякулята, остается открытым.

Гомберг и Ковалык (2002) считают, что истинная роль *C. trachomatis* при простатите остается неясной в основном из-за методологических проблем, поскольку в большинстве исследований нельзя было полностью исключить контаминацию секрета предстательной железы уретральным содержимым. Чаще всего для обнаружения *C. trachomatis* используется метод выделения возбудителя на культуре клеток. Однако в случае простатита такая методика не всегда адекватна

из-за влияния ингибирующих веществ, содержащихся в секрете предстательной железы. Также крайне затруднительно применять прямую иммунофлуоресценцию из-за малого количества эпителиальных клеток в секрете предстательной железы и в сперме. Определение *C. trachomatis* в секрете предстательной железы (после проведения массажа с последующим взятием секрета из области наружного отверстия уретры) не вполне соответствует строгим критериям научных исследований при установлении этиологической роли этого возбудителя. При пассаже через мочеиспускательный канал секрет предстательной железы подвергается контаминации содержимым уретры (Гомберг, Ковалык, 2002). *C. trachomatis* была обнаружена в секрете и биопсийном материале предстательной железы, взятым путем трансперинеальной пункции, что, по мнению многих авторов, доказывает хламидийную этиологию воспаления предстательной железы у некоторых больных (Pust, 1986; Машкилейсон и соавт., 1995; Молочков, Ильин, 1998; Петров, Бабкин, 1999). В исследовании Mutlu и соавторов (1998) хламидийный антиген был обнаружен у 14 из 55 (25,4%) больных с хроническим простатитом и только у 6% пациентов без простатита ( $P = 0,0268$ ). Ostaszewska и соавторы (1998) считают, что хламидии, без сомнений, могут вызывать уретрогенный простатит.

С появлением диагностических методов, основанных на молекулярной биологии, появилась возможность разрешить сомнения в отношении роли хламидий в этиологии простатита. ДНК *C. trachomatis* была обнаружена в ткани предстательной железы у 18 из 78 (20,6%) больных хроническим простатитом методом гибридизации *in situ* (Gumus et al., 1997). Внедрение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в клиническую медицинскую практику расширило возможности выявления *C. trachomatis* в секрете предстательной железы. Ващенко (2002) провел сопоставление между обнаружением ДНК *C. trachomatis* в секрете предстательной железы, клиническими и лабораторными признаками простатита и наличием ИППП в анамнезе. Автор предположил этиологическое значение хламидий в развитии хронического простатита. Для подтверждения этиологической роли *C. trachomatis* в развитии воспаления предстательной железы были использованы следующие критерии: хламидиоз в анамнезе, ДНК *C. trachomatis* в секрете предстательной железы (выявленная методом ПЦР), лейкоцитарная реакция как критерий воспаления и клинические признаки простатита (Ващенко, 2002).

Считается, что *C. trachomatis* и другие инфекции, передающиеся половым путем, не занимают ведущего места в этиологии всех простатитов у мужчин. Если брать возрастную группу до 35 лет, то пропорция простатитов венерической этиологии гораздо выше. Не исключено, что *C. trachomatis* является ведущей в этиологии уретрогенных простатитов у молодых мужчин. Имеются данные о существовании ассоциации хламидиоза с другой, в том числе условнопатогенной, бактериальной флорой. Этим можно объяснить тот факт, что антибиотики, назначаемые по результатам посевов секрета простаты, часто не дают желаемого эффекта (Dale et al., 2001).

Хламидийный простатит обычно протекает хронически, торпидно, иногда обостряясь. Очень редко воспалительный процесс имеет острое течение. Больные предъявляют жалобы, соответствующие уретропростатиту: выделения из мочеиспускательного канала, иногда во время акта дефекации (дефекационная простаторея) или в конце мочеиспускания (микционная простаторея), зуд, неприятное ощущение в канале, прямой кишке, неопределенную боль в области промежности, мошонки, паховой и крестцовой областях, внизу живота, по ходу седалищного нерва. Пациенты иногда обращают внимание на слипание наружного отверстия

мочеиспускательного канала после длительной задержки мочи, учащение мочеиспускания, особенно по ночам. Моча в первой и второй порциях чаще прозрачная, с примесью слизистых или слизисто-гнойных нитей и хлопьев, а в ряде случаев бывает мутной в первой или обеих порциях.

По степени поражения предстательной железы различают три формы простатита: катаральную, фолликулярную и паренхиматозную. При пальпаторном исследовании через прямую кишку предстательная железа при катаральном простатите не увеличена, нормальной консистенции, слегка болезненна. При фолликулярном простатите она также не увеличена, но при пальпации в ней определяют чувствительные, а иногда и плотные узелки различной величины. Значительное увеличение всей железы или одной из ее долей, изменение ее конфигурации и консистенции определяется пальпаторно при паренхиматозном простатите. В этом случае предстательная железа обычно уплотнена и резко болезненна.

Для ответа на вопрос о роли хламидий в развитии простатита следует учитывать результаты обычных гистологических исследований и проводить иммуногистохимическое изучение биоптатов железы, серологические тесты. Для выявления хламидий в простате рекомендованы такие чувствительные и специфичные методы, как ПЦР и ДНК-гибридизация *in situ*. Кроме того, для установления роли хламидии при простатите следует оценивать результаты ответа на соответствующую терапию (Stamm, 1999). Оптимальными методами выявления хламидийной инфекции при андрологических исследованиях является исследование семенной жидкости с помощью ПЦР и определение секреторных IgA в сперме (Mazzoli et al., 1996; Meacci et al., 1996). Mazzoli, в частности, признает возможность хламидийной этиологии простатита и считает, что патогенез хламидийного простатита носит иммунный характер (Mazzoli, 1996).

Хламидийный везикулит выявляют примерно у 15% мужчин активного полового возраста одновременно с хламидийным уретритом и клиническими проявлениями паренхиматозного простатита или эпидидимита (Мавров, 2002). Субъективные жалобы больных неопределенны, их трудно дифференцировать от жалоб, предъявляемых при рассмотренных формах хламидийной инфекции. Для хламидийного везикулита характерно хроническое течение. При пальпаторном исследовании через прямую кишку определяют набухание семенных пузырьков, их небольшую упругость и болезненность.

Хламидийный эпидидимит является наиболее тяжелым проявлением урогенитального хламидиоза у мужчин. Хламидии, наряду с гонококками и микоплазмами, могут быть одной из причин орхоэпидидимита у молодых мужчин (Berger et al., 1977; Hoosen et al., 1993; Joly-Guillou, Lasry, 1999; Zdrodowska-Stefanow et al., 2000). Односторонний эпидидимит развивался у 5-10% больных с хламидийным уретритом (Шаткин, Мавров, 1983; Мартынова и соавт., 1996; Мавров, 2002). Хламидийный эпидидимит обычно развивается на фоне первичного поражения мочеиспускательного канала и (часто) последующего простатита и везикулита. Хламидии проникают в придаток яичка каналикулярно, поражая эпителий, выстилающий просвет семявыносящих протоков. У некоторых пациентов обнаруживают признаки деферентита и фуникулита. Воспаленный семявыносящий проток пальпируется в виде слегка болезненного тяжа. При фуникулите воспаленный семенной канатик уплотнен и болезнен при пальпации (Oriel, Ridgway, 1983).

Эпидидимит, вызываемый хламидиями, может протекать в острой, подострой и хронической формах. Для острого эпидидимита характерно бурное начало, повышение температуры тела до 39°C, сильная боль в придатке яичка, которая может нарастать в течение нескольких

дней и иррадиировать чаще всего по ходу семенного канатика в поясничную и крестцовую области. Кожа мошонки обычно гиперемирована и отечна на стороне воспаленного придатка, который увеличен в размере, плотный на ощупь. Иногда определяется бугристость поверхности придатка. У больных наблюдаются лейкоцитоз, увеличение СОЭ. Для подострого эпидидимита характерны умеренная боль, субфебрильная температура и меньшая выраженность клинических симптомов. Хронический хламидийный эпидидимит обычно характеризуется отсутствием общей температурной реакции, незначительной болью, умеренным увеличением и уплотнением придатка с сохранением его гладкой поверхности. Воспалительный процесс может распространяться на оболочки яичка или охватывать все яичко с развитием орхидипидимита. При острой форме орхидипидимита, помимо клинических симптомов, характерных для изолированного поражения придатка, определяют асимметрию, а также отечность в гиперемированной, горячей на ощупь мошонке (на стороне воспаления), резко болезненной при пальпации. В увеличенной половине мошонки обнаруживают овальную опухоль обычно с равномерно напряженной поверхностью, которая дает ощущение ложного зыбления и очень болезненна при пальпации. При отсутствии лечения эпидидимит может длиться от нескольких месяцев до нескольких лет, периодически обостряясь (Nickel et al., 2002). У больных с торпидным течением одностороннего орхидипидимита в сочетании с простатитом, везикулитом и деферентитом, нередко отмечаются нарушения половой и репродуктивной функции (Molijn, Bogdanowicz, 1997; Ward et al., 1999; Мавров, 2002).

По клиническим признакам поставить диагноз хламидийного эпидидимита сложно. Основным критерием является лабораторная диагностика хламидиоза у такого больного (наличие активного или бессимптомного хламидийного уретрита) (Ely et al., 1992). По сравнению с гонококковым и бактериальным эпидидимитом, хламидийный эпидидимит протекает клинически более мягко. Предшествующие симптомы уретрита могут отсутствовать, а в сперме не повышается количество лейкоцитов (Ostaszewska et al., 2000; Hori, Tsutsumi, 1995).

Значение хламидийного эпидидимита часто недооценивается. Его последствиями могут быть мужское бесплодие и нарушения половой функции. В настоящее время мужской фактор бесплодия в браке составляет от 30 до 40% (Oriel, Ridgway, 1983; Мавров и соавт., 2002). Получена клиническая модель хламидийного эпидидимита на крысах породы Wistar. Заражение животных мышинным видом хламидий (*C. muridarum*) непосредственно в придатки яичек, вызвало острый эпидидимит с последующим фиброзом и развитием бесплодия (Jantos et al., 1992).

### Урогенитальные хламидиозы у женщин

Клинические проявления хламидийной инфекции у женщин разнообразны. Нередко отмечается скрытое течение инфекции. По данным венерологических учреждений, у большинства пациенток устанавливают бессимптомное течение инфекции или выявляют такие симптомы, которым женщины не придают значения. В то же время инфицированные хламидиями женщины, обратившие внимание на появление симптомов заболевания мочеполовых органов, обычно не связывают это с венерической инфекцией и первично обращаются за медицинской помощью в гинекологические учреждения. Там далеко не всегда проводят этиологическую диагностику хламидийной инфекции, которая обычно маскируется диагнозом неспецифического воспалительного процесса соответствующей локализации. Это обстоятельство следует учитывать при объективной оценке частоты и взаимосвязей манифестно и латентно протекающей хламидийной инфекции (Hare, Thin, 1983; Шаткин, Мавров, 1983; Мавров, 2002).



Уретрит у женщин может быть вызван *C. trachomatis*, так же, как и *U. urealyticum* (Hare, Thin, 1983; Skerk et al., 2000; Mutlu et al., 2001). Одной из первых работ, показавших связь хламидий с уретритом у женщин, было исследование Dunlop и соавторов (Dunlop et al., 1972). Для этого заболевания характерен зуд в мочеиспускательном канале, боли в начале мочеиспускания и учащенные позывы, а также скудные, слизистые, бесцветные выделения, выявляемые после массажа. Эти явления обычно кратковременны, но у большинства больных в период ремиссии при уретроскопии определяются изменения слизистой оболочки мочеиспускательного канала (мягкий инфильтрат, остаточные явления мягкого инфильтрата, грубые складки слизистой оболочки и т. п.). Нередко хламидийному уретриту сопутствует парауретрит той же этиологии (Мавров, 2002). Хронический воспалительный процесс в парауретральных протоках определяют по гиперемии их устьев и слизистому или слизисто-гнойному содержимому, выдавливаемому в виде капли. Преддверие влагалища также может быть вовлечено в патологический процесс, вызываемый хламидиями, с преимущественной его локализацией в складках в области наружного отверстия мочеиспускательного канала или между клитором и уретрой. Из инфицированных хламидиями складок при давлении сбоку выделяют слизистое отделяемое.

Хламидийный бартолинит обычно протекает вяло, малосимптомно, не сопровождаясь определенными жалобами, способными указывать на локализацию воспалительного процесса. Хламидии способны размножаться в покровном столбчатом эпителии выводных протоков бартолиновых желез (Davies et al., 1978). Часто признаком поражения протока является обнаруживаемое при осмотре гиперемированное пятно величиной с горошину с центральной темно-красной точкой, соответствующей устью выводного протока железы. При пальпации воспаленной бартолиновой железы из устья выводного протока удается выдавить каплю слегка мутноватой слизи. При закрытии выводного протока он превращается в большую кисту, наполненную прозрачной жидкостью. Обычно воспалительные явления в окружности железы не выявляются, но в ряде случаев хламидийного бартолинита воспалительный процесс распространяется и на окружающие ткани, что приводит к образованию болезненного инфильтрата диаметром несколько сантиметров, расположенного сбоку, у входа во влагалище. На основании результатов бактериологических исследований можно полагать, что наиболее тяжелые формы бартолинита возникают при смешанной инфекции, чаще хламидийно-гонококковой природы (Мавров, 2002).

Хламидийный вагинит является редким проявлением хламидийной инфекции и практически не встречается у взрослых женщин с нормальной гормональной активностью. Хламидии не склонны размножаться в нормально функционирующем плоском поверхностном эпителии влагалища и в свободном состоянии (вне клетки) проявляют высокую чувствительность к кислой реакции содержимого влагалища. Чаще возникает вторичный хламидийный вагинит – на фоне эндоцервицита, в результате мацерирующего действия выделений из канала шейки матки, а также других факторов (травмы, снижение эстрогенной активности) на эпителий влагалища. Хламидийный вагинит может развиваться у детей (вульвовагинит), пожилых женщин, а также во время беременности – при структурно-функциональных изменениях эпителия, связанных с особенностями гормонального состояния (Schachter, 1986). Больные обычно жалуются на выделения из влагалища, ощущение жжения, зуд. Слизистая оболочка влагалища гиперемирована, отечна. Между складками определяется скопление отделяемого различного характера. Характер и длительность заболевания обычно зависят от инфекции, протекающей в шейке матки, мочеиспускательном канале, преддверии влагалища, бартолиновых железах.

Хламидийный цервицит является наиболее распространенным первичным проявлением хламидийной урогенитальной инфекции у женщин, протекающей в форме эндоцервицита. Заболевание часто не вызывает жалоб. Иногда больные обращают внимание на появившиеся выделения из влагалища, отмечают неопределенную тянущую боль внизу живота. Воспалительный процесс в канале шейки матки, в столбчатом эпителии которого происходит размножение хламидий, сопровождается слизисто-гнойным отделяемым. В ранних работах Rees и соавторов (1977) выделения отмечены у 84% больных хламидийным цервицитом. Выделения мацерируют многослойный сквамозный эпителий слизистой оболочки влагалищной части шейки матки, вызывают его частичную десквамацию. Шейка матки становится отечной, гиперемированной, вокруг наружного отверстия канала шейки матки образуются эрозии, часто в виде «красного венчика», наблюдается эктопия столбчатого эпителия, перемещающегося из канала. При длительно протекающих хламидийных цервицитах часто возникают гипертрофические эрозии, выявляемые у 87% инфицированных хламидиями женщин (Sellors et al., 2000). В ряде случаев в области зева обнаруживаются везикулы размером с просыное зерно, наполненные мутным содержимым (Шаткин, Мавров, 1983). Для хламидийного цервицита также характерно образование в слизистой оболочке, обычно в области зева, лимфоидных фолликулов. Фолликулярный цервицит совершенно не характерен для инфекций, вызываемых *N. Gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis* или *Ureaplasma urealyticum*. Хламидийная инфекция шейки матки может характеризоваться и признаками неспецифического воспаления, не обязательно сопровождаясь образованием гипертрофических эрозий, лимфоидных фолликулов и слизисто-гнойного отделяемого. В ряде случаев при персистентной хламидийной инфекции канала шейки матки, кроме обнаружения возбудителя различными лабораторными методами, не удается выявить (в момент обследования) каких-либо клинических признаков заболевания.

Хламидийный эндоцервицит обычно вызывается сероварами *C. trachomatis* от D до K. Имеются данные клинических и эпидемиологических исследований, где бессимптомный цервицит связывают с сероваром E *C. trachomatis*. Этот серовар встречается в половине случаев цервицита и характерен для женщин, имеющих многочисленные половые связи и не считающих себя больными (Sturm-Ramirez et al., 2000). Для хламидийного цервицита характерно хроническое течение с периодическими обострениями, вызванными реинфекциями (новый серовар) или активацией персистентной инфекции (ранее обнаруживавшийся серовар). В одном исследовании 552 женщин с тремя и более обострениями эндоцервицита в течение двух лет у 24% находили тот же самый серовар. Серовары подгруппы C способны вызывать инфекцию при повторном заражении одним и тем же сероваром (Dean et al., 2000).

Наличие эндоцервицита является строгим показанием для обследования женщины на хламидийную инфекцию (Chandeying et al., 1996; Sellors et al., 1998). По данным Sellors и соавторов (1998), наличие гнойно-слизистого цервицита предполагает хламидийную инфекцию в 29,3% случаев. Статистически цервицит связан с эндометритом, сальпингитом и патологической беременностью (Nyirjesy, 2001). В некоторых регионах мира распространенность хламидийного эндоцервицита может достигать более четверти населения – среди женщин репродуктивного возраста (в Папуа Новая Гвинея – 26%) (Tiwara et al., 1996). В ряде стран были проведены популяционные исследования с целью определения факторов риска и анамнестических факторов, указывающих на вероятность хламидийной инфекции (Morrison et al., 1999). В одном таком исследовании были обследованы на хламидиоз 13204

женщины – рекруты армии США, с помощью чувствительного и специфичного метода лигазной цепной реакции. Среди данного контингента инфицированность хламидиями составила 9,2% (Gaydos et al., 1998). Многофакторный анализ показал наличие следующих факторов риска (в порядке убывания): вагинальные половые сношения, возраст менее 25 лет, более чем один половой партнер в течение 90 дней, новый половой партнер в течение 90 дней, половые партнеры не всегда использовали презервативы, венерические болезни в анамнезе.

**Воспаление органов малого таза.** Говорить о чисто хламидийной этиологии воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ) можно весьма условно, поскольку в реальности имеет место смешанное инфицирование хламидиями и другими патогенными и условно-патогенными бактериями. Каждый из компонентов микробной ассоциации вносит свой вклад в механизм развития этих заболеваний. Однако в настоящий момент большинство специалистов признает решающую роль хламидий в их этиологии и патогенезе. Топическое разделение ВЗОМТ (сальпингит, офорит и т. д.) также условно и может зависеть от преимущественного поражения какого-либо органа или его участка (матка, маточные трубы, яичники, брюшина). Как правило, наблюдается многоочаговое поражение. Приведенное ниже синдромное разделение принято для удобства изложения.

ВЗОМТ развиваются в результате восходящей инфекции из нижних отделов мочеполового тракта в полость матки, маточные трубы, яичники и в брюшную полость гонококков, хламидий, микоплазм и условнопатогенной (часто анаэробной) флоры (Cohen et al., 2002). Эндометрий, слизистая маточных труб и брюшина реагируют на инфекцию воспалением (эндометрит, сальпингит, тазовый перитонит). Клинические проявления могут быть разной выраженности – субфебрильная лихорадка, выделения из цервикального канала, чувствительность шейки матки при движениях во время бимануального обследования, тяжесть и болезненность в области придатков матки. В таких случаях прежде всего необходимо обследование на гонококки, хламидии, генитальные микоплазмы, а также на *Trichomonas vaginalis* и другую флору. Микрофлора, выделяемая из цервикального канала, может не дать представления об истинной этиологии ВЗОМТ. Весьма желательна исследование маточного содержимого с предотвращением его контаминации влажной флорой (при лапароскопии). Обычные бактериологические методы не выявляют возбудитель у 63% пациенток, так как микроорганизмы могут находиться в толще пораженных воспалением тканей (Тихомиров, 2001; Кисина, Канищева, 2002).

По клиническим признакам определить хламидийную этиологию ВЗОМТ не представляется возможным (Washington et al., 1990). Ультразвуковое и лапароскопическое обследование помогают уточнить топический диагноз и определить степень поражения. При лапароскопии важным является осмотр маточных труб – наличие окклюзий, спаек, экссудата (Eschenbach et al., 1997). Однако лапароскопическое исследование требует общей анестезии и может проводиться лишь в условиях гинекологического стационара, что ограничивает его широкое применение для уточнения диагноза ВЗОМТ (Paavonen, 1998; Washington et al., 1990). Одним из клинико-морфологических признаков восходящей хламидийной инфекции является эндометрит с наличием плазматических клеток при биопсии эндометрия (Paavonen, 1987). Характерен также лейкоцитоз цервикального и вагинального отделяемого, болезненность при движениях матки и придатков при осмотре, повышение температуры, повышение СОЭ (скорость оседания эритроцитов) и наличие С-реактивного белка. При трансвагинальной сонографии и магнитном резонансе маточные трубы утолщены, наполнены жидкостью. Можно видеть признаки tuboовариального абсцесса. По данным разных авторов, при тщательном

клиническом обследовании больной без лапароскопии и других инструментальных методов можно поставить диагноз ВЗОМТ в 65-95% случаев (сравнение с лапароскопией, которая сама не является абсолютным критерием). Клинические проявления заболевания широко варьируют по степени тяжести и наличию или отсутствию вышеперечисленных симптомов и признаков. Диагностика, основанная на клинических критериях, не всегда достоверна, что приводит к гиподиагностике (чаще) либо гипердиагностике (реже) (Paavonen, Eggert-Kruse, 1999). В первом случае велика вероятность нарушения репродукции (трубное бесплодие) и развития острой патологии, опасной для жизни (трубная беременность), во втором – женщина подвергается необоснованным обследованиям и лечению. В постановке диагноза помогает расспрос пациентки, данные о половых партнерах. Отмечено, что у женщин до 25 лет клинически поставить диагноз ВЗОМТ легче. Большинство женщин со стертым клиническим течением сальпингита не обращаются к врачу, поскольку не испытывают субъективных беспокойств (Мавров, Мальцева, 2003; Кисина, Канищева, 2002; CDC STD Guidelines, 2002). Субклинические формы ВЗОМТ обнаруживают у 27% женщин с генитальной инфекцией *C. trachomatis*. Заболевание проявляется эндометритом. Эпидемиологические и клинические факторы, способствующие развитию ВЗОМТ у женщин, инфицированных хламидиями, неизвестны. У женщин, принимающих гормональные контрацептивы, хламидийная инфекция нижних половых путей встречается чаще, однако ВЗОМТ у них встречаются реже и протекают в легкой форме, в основном как асимптомный эндометрит и/или сальпингит (Henry-Suchet, 1997). Важным фактором, определяющим течение ВЗОМТ, являются реинфекции гомо- и гетерологичными штаммами *C. trachomatis*, а также генотипические факторы (Scholes et al., 1998; Возіанов та співавт., 2003).

**Хламидийный эндометрит** – наименее изученная клиническая форма хламидийной инфекции. Острый хламидийный эндометрит впервые был выявлен Mardh и соавторами (1981) у больных цервицитом той же этиологии. Было показано, что хламидии проникают в полость матки из канала шейки, последовательно инфицируя выстилающий матку эпителиальный слой. Поскольку в процессе менструального цикла эндометриальный слой обновляется, то истинный эндометрит возможен только в периоды отсутствия месячных. О послеродовом и послеабортном остром хламидийном эндометрите сообщили соответственно Wager и соавторы (1980) и Битр и соавторы (1981). Описанные случаи острого хламидийного эндометрита протекали с характерными жалобами больных и клиническими симптомами, устанавливаемыми и при эндометритах другой этиологии. У больных внезапно повышалась температура тела до 38-39°C, определялся лейкоцитоз, увеличение СОЭ. Возникла усиливающаяся боль внизу живота, нарушались сроки менструации, отмечались интенсивные слизистогнойные выделения из канала шейки матки. При исследовании влагалища матка была болезненной. Нередко наблюдалось хроническое течение воспалительного процесса и последовательное поражение маточных труб.

Если учитывать относительно большую частоту хламидийных сальпингитов, чем острых эндометритов, а также каналикулярный путь распространения хламидий из канала шейки матки по эндометрию в маточные трубы, то есть все основания полагать, что острый эндометрит не является единственной клинической формой, отражающей воспалительный процесс (который вызывают хламидии, проникшие в матку). По всей вероятности, восхождение инфекции в матку может происходить и без резко выраженных симптомов, а воспалительный процесс может быть ограниченным и нередко исчезать спонтанно – в период отторжения функционального слоя эндометрия при менструации (Wiesenfeld et al., 2002).



Хламидийный сальпингит является наиболее частым проявлением восходящей хламидийной инфекции у женщин детородного возраста. Установлено также, что хламидии инфицируют маточные трубы как через полость матки, так и гематогенным путем, распространяясь из шейки матки по эндометрию и вызывая воспалительный процесс (который последовательно охватывает лизистый, мышечный и серозный слои) (Мавров, Мальцева, 2003). Больные предъявляют жалобы на боль внизу живота, выделения из влагалища, нарушение менструального цикла, дизурические явления. Боль носит тупой характер, усиливается при физическом напряжении, во время менструации, при дефекации, при гинекологическом обследовании. Иногда вследствие перистальтики труб возникает как бы самопроизвольная схваткообразная боль с иррадиацией в бедро. У больных повышается температура тела до 38-39°C, возникают лейкоцитоз, увеличение СОЭ.

Установлено, что хламидийная инфекция вначале поражает слизистую оболочку, что выражается гиперемией, отеком и усиленной секрецией (Мавров, Мальцева, 2003). При катаральном сальпингите труба отечна, равномерно утолщена, пальпируется при исследовании. В ее просвете скапливается серозно-гнойная жидкость, нередко образуются внутренние спайки. При прогрессировании процесса складки слизистой оболочки отекают, препятствуя прохождению секрета, который при закрытии воронки растягивает стенки трубы. Образуется гидросальпинкс или, при гнойном содержимом трубы, пиосальпинкс. В этот период выявляют утолщение трубы до значительных размеров – ее опухолеподобную форму. При хламидийной инфекции так же, как и при гонорее, может наблюдаться двустороннее поражение труб матки. При распространении инфекции через брюшное отверстие маточной трубы в воспалительный процесс обычно вовлекается яичник. Возникает сальпингоофорит. При сальпингоофорите больные часто отмечают ноющую боль внизу живота и в крестцовой области, которая усиливается при напряжении брюшной стенки, нередко появляются кровотечения в межменструальный период. Характер патологического процесса в яичнике при восходящей хламидийной инфекции может быть поверхностным или глубоким. Помимо поверхностных поражений, приводящих к сращениям с окружающими тканями и органами, воспалительный процесс может распространяться и в глубину яичника, повреждая его внутреннюю структуру. При хламидийном сальпингите могут поражаться и другие органы, как за счет каналикулярного распространения инфекции через брюшное отверстие маточных труб, так и в результате последовательного поражения всех слоев их стенки, а затем и брюшины.

Хламидийный пельвиоперитонит. Еще в ранних исследованиях Rees и соавторов (1977), а также Raavonen и Valtonen (1980) было показано, что тазовый перитонит является довольно частым осложнением хламидийного сальпингита и сальпингоофорита. Описаны также случаи хламидийного сальпингита, перитонита и асцита, возникающих после аборта по медицинским показаниям или аппендэктомии – в результате активации бессимптомной урогенитальной инфекции (Lannigan et al., 1980; Qvigstad et al., 1982). В острой стадии болезни на фоне жалоб, характерных для сальпингита, внезапно возникает резкая боль внизу живота. У больных определяют напряжение брюшной стенки, положительный симптом Щеткина-Блюмберга, повышение температуры тела до 38-40°C, учащенный пульс, выраженный лейкоцитоз, увеличенную СОЭ. Нередко отмечается задержка стула, метеоризм.

Попав в брюшную полость, хламидии способны поражать, кроме тазовой брюшины, и другие участки. В 1930 году Curtis – гинеколог из Чикаго (США) обратил внимание на то, что у женщин с восходящей гонококковой инфекцией имеются спайки в виде «скрипичных

струн» между печенью и брюшной стенкой. Затем Fitz-Hugh в 1934 году описал ранние проявления перигепатита у больных гонореей. Данное состояние получило название синдрома Fitz-Hugh-Curtis. Позднее описаны перисплениты, перинефриты и периаппендициты (Gatt, Jantet, 1987). Заболевание встречается исключительно у женщин, поскольку у них имеется анатомическая возможность проникновения инфекции из нижних половых путей. Однако в литературе приводятся единичные описания подобного синдрома у мужчин, возникшего в результате гематогенного заноса при дессиминированной гонококковой инфекции (Bolton, Darougar 1983).

С помощью лапароскопии и этиологической диагностики установлена хламидийная этиология острого фибринозного перигепатита, определяемого как синдром Fitz-Hugh-Curtis (Wolner-Hanssen et al., 1980; Wang et al., 1980). Синдром проявляется острой болью в верхнем правом квадранте живота, боль имеет характеристики воспаления брюшины – усиливается при движении, глубоком вдохе, пальпации. Часто наблюдается тошнота и отсутствие аппетита. Боль может иррадиировать в спину и в правое плечо. Брюшная стенка может быть напряжена. Над правой реберной дугой аускультативно определяются шум трения края печени о брюшную стенку. Примерно у половины пациентов повышается температура, но желтуха и разлитой перитонит не развиваются. Можно обнаружить признаки слабо выраженного тазового перитонита при тщательном обследовании. Дифференцировать следует с подострым безжелтушным гепатитом, нижним плевритом, нижнедолевой пневмонией, эмболией легких или диафрагмальной грыжей. Ошибка в клиническом диагнозе может, с одной стороны, привести к назначению неоправданного обследования и лечения, а с другой стороны – генитальная инфекция, которая привела к данному состоянию, остается нераспознанной. При тщательном расспросе более чем две трети больных указывают на генитальную инфекцию и воспалительные заболевания половых органов в анамнезе (Bolton, Darougar, 1983). Признаки раздражения брюшины в правой верхней части живота у молодых женщин следует рассматривать как возможное осложнение хламидийной инфекции (Wolner-Hanssen et al., 1980). При лапароскопии и ультразвуковом исследовании наблюдаются спайки по типу «скрипичных струн» между поверхностью печени и передней стенкой живота (van Dongen et al., 1993). Эти спайки нежные и легко рвутся при прикосновении лапароскопа, образуя белые фиброзные бляшки и гемморрагические точки. Перигепатит может сопровождаться незначительным асцитом, выявляемым при ультразвуковом обследовании (van Dongen et al., 1993; Schoenfeld et al., 1992). Для больных с синдромом Fitz-Hugh-Curtis характерны высокие титры антител к хламидиям в сыворотке крови (Puolakkainen et al., 1985). Одновременно могут наблюдаться симптомы цервицита и сальпингита. Для больных характерны также спайки тазовой брюшины (70%) и наличие антител к белку теплового шока хламидий (67%). Больные перигепатитом реже применяли пероральные контрацептивы (Money et al., 1997). Существует экспериментальная работа, где развитие перигепатита у мышей при заражении хламидиями было связано с нарушениями Т-клеточного иммунного ответа (Thoma-Uszynski et al., 1998).

### Урогенитальные хламидиозы у детей

Роль хламидий в появлении заболеваний урогенитальной сферы у детей и подростков во всей полноте стала выясняться лишь в последние годы. Исследователи отмечают высокий процент обнаружения *C. trachomatis* у девочек-подростков (39%), живущих половой жизнью, и беременных подростков (47%) (Маврова, Ткачук, 1996; Мерзляков и соавт., 1999).

Хламидийная этиология воспалительных заболеваний мочеполовых органов у детей все больше привлекает к себе внимание педиатров (Мавров и соавт., 2001; Маврова и соавт., 2002; Баилайшвили, Маврова, 2002; Маврова, 2002). Заражение детей происходит тремя путями: при прохождении ребенка через инфицированные хламидиями родовые пути, при нарушении санитарно-гигиенического режима в условиях бытового контакта (общая постель, предметы туалета и т. п.), а также в случаях половых контактов при соприкосновении или насилии. Rettig и Nelson (1981) выявили хламидийную инфекцию у 27% детей, больных гонореей. Авторы выделяли *C. trachomatis* из мочеиспускательного канала мальчиков в возрасте 5-11 лет и из влагалища и прямой кишки девочек в возрасте 4-9 лет. После излечения гонореи сопутствовавшая хламидийная инфекция проявлялась манифестно, по типу постгонорейного воспалительного процесса, или бессимптомно на протяжении 1,5-2 мес., сопровождаясь накоплением в сыворотке хламидийных антител. Половой путь заражения детей хламидиями был надежно установлен только в одном из девяти эпидемиологически изученных случаев хламидийно-гонококковой инфекции. Хламидийная инфекция мочеполовых органов у детей может длительно протекать бессимптомно, активируясь под влиянием различных факторов, в том числе и других патогенных агентов. При манифестном проявлении постгонорейного хламидийного уретрита у мальчиков наблюдают слизистые или слизисто-гнойные выделения из мочеиспускательного канала, гиперемию и отек наружного отверстия, а также незначительные дизурические явления (Rettig, Nelson, 1981).

Хламидийная инфекция играет важную роль и в формировании соматической патологии у детей. Анализ отягощенного перинатального анамнеза детей первых трех лет жизни, имевших хламидийную инфекцию, показал, что у 58,3% детей первого года жизни был выявлен неревматический кардит, а у детей от одного года до трех лет – в 45% случаев. Признаки интерстициальной пневмонии наблюдались у 66,7% детей первого года жизни и у 20% детей от одного до трех лет жизни. Клинико-рентгенологические симптомы интерстициальной пневмонии были у 78,2% детей обеих групп (Евсюкова и соавт., 1995; Лузан, 1998; Маврова и соавт., 2002).

**Вульвовагинит.** Заражение хламидиями влагалища новорожденных, родившихся от матерей, имевших хламидийный цервицит, впервые системно изучили Schachter и соавторы (1979). До этого были лишь публикации отдельных случаев. Хламидийная этиология вульвовагинита у девочек в возрасте 16 мес. и 9 лет, одновременно страдавших офтальмохламидиозом, была установлена соответственно Dunlop и соавторами (1964) и Mordhorst (1977).

Наиболее частой локализацией хламидийной инфекции у девочек являются наружные половые органы и влагалище, реже мочеиспускательный канал и прямая кишка. Хламидийная этиология вульвовагинита была установлена у девочек 15 месяцев и 9 лет, которые одновременно страдали офтальмохламидиозом (Маврова, 1990). Клинические проявления хламидийного вагинита не отличаются от проявлений других воспалительных процессов той же локализации (Шаткин, Мавров 1983). При выраженном вагините отмечают гиперемию слизистой оболочки наружных половых органов, слизистые, слизисто-гнойные или гнойные выделения из влагалища, которые при надавливании на промежность или низ живота становятся обильными (Shapiro et al., 1993). Воспалительный процесс захватывает также преддверие влагалища и девственную плеву, что выражается гиперемией и болезненностью. Для малосимптомного хламидийного вагинита, при отсутствии соответствующего лечения, характерны ремиссия и обострение (Маврова, 2001).

**Патология почек и мочевыводящих путей.** У детей и подростков может иметь место хламидийный пиелонефрит и гломерулонефрит. При выяснении этиологии воспалительных заболеваний мочеполовых органов у детей с дизурией и пиурией, хламидии обнаруживались у 27% больных (из мочеиспускательного канала у мальчиков и девочек в возрасте 4-9 лет) (Маврова, 2002). У детей и подростков клиническая картина хламидийных поражений почек и мочевыводящих путей варьирует от стертых до тяжелых форм. Легкое течение пиелонефрита наблюдают у 49,8% пациентов. Средняя форма – у 4,0%. В клинике заболевания сочетались общие и местные симптомы (недомогание, повышение температуры тела, боль в поясничной области). Тяжелая клиническая форма заболевания выявлялась у 10% пациентов, у которых в анамнезе отмечался пиелонефрит и мочекаменная болезнь. Чаще клиника проявляется вялотекущими симптомами, наличием субфебрилитета, нерезко выраженной дизурией, умеренно выраженной лейкоцитурией, гематурией. Пиелонефриту сопутствует вульвовагинит, который часто рецидивирует (до 5-6 раз в год и более).

**Артриты.** По данным Института дерматологии и венерологии АМН Украины, роль хламидийной инфекции в развитии артритов у детей составляет 12,9%. Особенностью хламидийного артрита у детей является преобладание подострого начала заболевания (у 73,2% больных). У большинства детей наблюдалось сочетание воспалительных изменений суставов с повышением температуры тела до субфебрильных цифр. У 21,4% был диагностирован конъюнктивит, у 14,2% – вульвовагинит. Заболевание рецидивировало у 64% больных (Мавров, 2001).

### **Хламидиозы у новорожденных**

Возможно перинатальное инфицирование новорожденных при родах, во время прохождения через родовые пути женщин с хламидийным эндоцервицитом (в том числе и бессимптомным). Возможен также внутриутробный путь заражения органа зрения у плода. В литературе имеется сообщение о конъюнктивите новорожденного, развившемся через три дня после родоразрешения путем кесарева сечения без предварительного разрыва амниотической оболочки, что указывает на трансплацентарное заражение (Shariat et al., 1992). *C. trachomatis* (генитальные серовары от D до K) является возбудителем инфекции, поражающей полостные органы новорожденного, слизистую оболочку которых выстилает столбчатый эпителий. Этим определяется спектр патологии у новорожденных. Согласно литературным данным, инфицирование хламидиями новорожденных с клиническими и эзографическими признаками внутриутробной инфекции достигает 9,8% (Дмитриев, 2002). От 30 до 70% инфицированных детей заражаются при прохождении через родовые пути инфицированной матери, а у 10-20% из них развивается пневмония (Басилайшвили, Маврова, 2002). Дети, которые родились от матерей, имевших хламидийную инфекцию, нередко ослаблены, рождаются на 12-14 дней раньше срока с признаками недоношенности. У них отмечают энцефалопатии, кефалогематомы, конъюнктивит и пневмония (Глазкова, Герасимова, 1996).

**Конъюнктивит с включениями у новорожденных.** (*Ophthalmia neonatorum*) долгое время признавали единственной формой хламидийной инфекции у новорожденных. Он является самой частой формой хламидийной инфекции и встречается у 35-50% младенцев, родившихся от инфицированных матерей (Shen et al., 1995; Мавров, 2002). В общей популяции США частота хламидийного конъюнктивита новорожденных составляет 2-6% (Schachter et al., 1986; Schachter, 1999). В Китае это число составляет 8,6% (Zhang et al., 1994). Это с учетом



того, что у новорожденных могут быть не только манифестные, но и малосимптомные формы хламидийного конъюнктивита. В перинатальный период может возникнуть персистентная инфекция, при активации которой в последующие годы жизни могут развиваться манифестные формы конъюнктивита, кератоконъюнктивита и воспалительных процессов другой локализации.

Инкубационный период хламидийного конъюнктивита у новорожденных – от 10 до 14 дней. Это заметно меньше, чем при гонорейном конъюнктивите, где инкубационный период длится 2-3 дня. Начало заболевания, как правило, острое, часто двустороннее. Наблюдаются отек век, сужение глазной щели, обильные, сначала слизистые, затем гнойные выделения. Конъюнктивит век и ее своды резко гиперемированы, отечны, диффузно инфильтрированы. С первых дней развивается гипертрофия сосочков, особенно выраженная в области хрящевек (Francois et al., 1989). Так как в первые недели (иногда месяцы) жизни у новорожденных отсутствует развитая подконъюнктивальная аденоидная ткань, в этот период не выявляется фолликулярная реакция, и наиболее ярким симптомом является папиллярная гипертрофия. Нередко в остром периоде образуются ложные пленки, располагающиеся на поверхности конъюнктивы. Через 3-4 недели воспалительный процесс стихает и в ряде случаев происходит самоизлечение, но чаще заболевание приобретает хроническое течение. Выделения, гиперемия и отек конъюнктивы уменьшаются, сосочки уплощаются. Через 1,5-2 месяца (в соответствии со сроками развития лимфоидной ткани) возникают фолликулы, увеличивающиеся в размере, нередко сливающиеся.

При отсутствии лечения заболевание длится от 3 до 12 месяцев. В ряде случаев возникает персистентная инфекция, способная существовать долгие годы. У части таких больных впоследствии выявляют симптомы, сходные или аналогичные симптомам при синдроме спорадической трахомы и конъюнктивита с включениями у взрослых. Характерны линейные, нежные рубцы на конъюнктиве, васкуляризация лимба и роговицы, отмечаются случаи поверхностного, а иногда и субэпителиального кератита. Возможны случаи офтальмохламидиоза у новорожденных и у детей старшего возраста с образованием тарзальных фолликулов, интенсивным рубцеванием и паннусом.

Диагностику и дифференциацию офтальмохламидиоза у новорожденных проводят по клиническим, лабораторным и эпидемиологическим показателям так же, как и у взрослых. Большое значение имеет информированность врачей об эпидемиологической взаимосвязи рассмотренной формы хламидийной инфекции новорожденных с урогенитальной инфекцией матерей, определяющей пути и средства санации неконтролируемых источников инфекции. Хламидийная инфекция глаз у новорожденных может осложняться поражением других органов при каналикулярном распространении возбудителя через носослезный проток, вызывая ринит, назофарингит, евстахиит, острый отит, а также более глубокие поражения дыхательной системы. Данная локализация хламидийной инфекции не всегда сочетается с манифестным конъюнктивитом (Veem, Saxop, 1977; Панкратова и соавт. 1982).

Хламидийная пневмония. Респираторный хламидиоз является второй по частоте формой хламидийной инфекции у новорожденных. Это заболевание развивается примерно у половины новорожденных, больных конъюнктивитом с включениями (Veem, Saxop, 1977; Малова, 2001; Островский, 2001). В то же время хламидийная пневмония может быть первичным проявлением инфицирования новорожденных без конъюнктивита с включениями. Если пневмония развилась внутриутробно, то летальный исход у младенца более вероятен (Басилайшвили,

Маврова, 2002). В настоящее время невозможно объективно оценить частоту возникновения этого заболевания, хотя Schachter (1999) считает, что хламидийная пневмония развивается у 10-20% детей, родившихся от матерей с урогенитальной инфекцией, которая в свою очередь выявляется в 5-12% случаев. Предполагается, что на 1000 живых новорожденных приходится в среднем 2-4 случая хламидийной пневмонии, частота которой среди пневмоний, выявляемых у детей первого года жизни, составляет 15-50% (Черепова, Кутюва, 1999; Schachter, 1999).

Для хламидийной пневмонии характерен ряд клинических особенностей. Первые симптомы болезни проявляются в различные сроки после рождения – от 4-5 дней до нескольких месяцев (чаще от 3 до 12 недель). Причина такого колебания продолжительности инкубационного периода не ясна. Поздние сроки начала болезни могут быть связаны с бессимптомным течением инфекции, приобретенной в период родов, и ее последующей активацией под влиянием различных факторов (стресс, наслонившаяся вторичная инфекция, исчезновение антител, переданных от матери). Заболевание развивается постепенно и приобретает хроническое течение. Сначала возникают признаки ринита, затем у больных появляются учащенное дыхание, сухой, приступообразный, отрывистый кашель (*staccato* или «пулеметная очередь»), иногда кратковременная задержка дыхания. «Лающий» кашель, характерный для коклюша, не наблюдается. Температура тела нормальная. При аускультации определяют диссеминированную крепитацию. Границы легких расширены. Печень и селезенка ощутимы при пальпации вследствие давления диафрагмы. В ряде случаев наблюдаются серьезные нарушения легочной вентиляции, проявляющиеся цианозом (Heřeka, Dhar, 2001). Рентгенологические изменения в легких определяются четко. На рентгенограмме определяют картину, характерную для диффузной интерстициальной пневмонии и ателектаза. Характерных рентгенологических признаков пневмонии новорожденных, вызванной *C. trachomatis*, не существует. Плевральный выпот и консолидация долей не характерны. Обычно рентгенологическая картина более выражена, чем клинические проявления (Radkowski et al., 1981). Из лабораторных данных типичны гипергаммаглобулинемия (особенно IgM) и эозинофилия (более 300-400 в мм<sup>3</sup>). При патогистологическом изучении выявляют смешанную клеточную инфильтрацию легочной ткани с облитерацией альвеол и некротический бронхолит. Хламидийной пневмонии сопутствуют эозинофилия и увеличение сывороточных IgG и IgM. Для нее также характерно накопление в сыворотке крови больных специфических антител в количестве, обеспечивающем диагностику инфекции серологическими методами. Реакция микроиммуофлуоресценции является адекватным методом лабораторной диагностики хламидийной пневмонии новорожденных и детей первого года жизни (Levitt et al., 1983).

Без этиотропного лечения заболевание может продолжаться многие месяцы и годы. При отсутствии осложнений возможно спонтанное излечение. Однако заболевание не проходит без последствий. У таких детей через 7-8 лет функциональные показатели дыхательной функции достоверно ниже, чем в контрольной группе, и у них чаще развивается бронхиальная астма (Weiss et al., 1986). Наиболее опасными являются пневмонии смешанной хламидийно-бактериальной и хламидийно-вирусной (в том числе и хламидийно-цитомегаловирусной) природы. Хотя случаи воздушно-капельной передачи этой формы пневмонии в литературе не описаны, ее возможность необходимо учитывать при госпитализации и контакте с больными детьми. Наряду с развитием конъюнктивита, назофарингита, ринита и пневмоний, у детей имеет место и бессимптомное течение хламидийной инфекции.

Наблюдения за такими детьми показали, что хламидии выделялись из глаз, носовой части глотки, влагалища, прямой кишки на протяжении нескольких месяцев, при отсутствии клинических проявлений. Течение латентной хламидийной инфекции может длиться годами и проявляться в период полового созревания. Перинатальная персистентная инфекция является причиной последующих воспалительных процессов у подростков, у которых не подтверждается половой путь инфицирования (Крючкова и соавт., 2001; Крячкова и соавт., 2001).

Большинство клинических исследований хламидийной пневмонии новорожденных было проведено до того, как была установлена роль *C. pneumoniae* как ведущего респираторного патогена. Значение данного вида хламидий в этиологии пневмонии новорожденных не изучено. Не исключено, что *C. pneumoniae* и другие представители *Chlamydiales* могут также вызывать пневмонии у детей до 1 года жизни.

### **Генитальная хламидийная инфекция у детей как результат совращения или насилия**

Достоверный диагноз генитальной хламидийной инфекции у детей препубертатного возраста указывает на возможность сексуального совращения и/или насилия (Ingram et al., 1986; Kellogg et al., 1991; Siegel et al., 1995). Однако доказано, что генитальный хламидиоз, которым ребенок заразился перинатально от матери, может длительно персистировать. Поэтому один лишь факт наличия инфекции не может служить доказательством полового контакта. Ingram и соавторы (2001) проанализировали данные за 10 лет (1988-1998) относительно 3040 детей (2141 девочки и 626 мальчиков) в возрасте от новорожденности до 12 лет, которые обследовались на предмет возможного сексуального совращения или насилия. Дети подверглись подробному расспросу, тщательному осмотру и были обследованы на хламидиоз и гонорею. Материал брался из гениталий, прямой кишки, полости рта и высевался на питательные среды и инокулировался в культуру клеток. Инфицированными оказались 58 детей: 37 – гонококком и 25 – хламидиями. У четырех были выявлены оба микроорганизма. Венерический хламидиоз встречается у 2% детей, имевших при тех или иных обстоятельствах половые контакты со взрослыми (Everett et al., 1998).

Диагноз генитальной или ректальной инфекции *C. trachomatis* у ребенка может служить доказательством в суде, только если он получен исключительно с помощью культурального исследования, как обладающего стопроцентной специфичностью. Диагностическая лаборатория, где выполнялся анализ, сама может быть объектом независимой экспертизы на предмет возможности контаминации или неправильной идентификации образцов.

Современные тесты, основанные на амплификации, позволяют обследовать ребенка неинвазивным способом (образцы мочи), что могло бы уберечь его от дополнительной психотравмы во время гинекологического обследования (Hammerschlag, 2001). Однако во многих странах ПЦР и другие тесты, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, на данном этапе не могут фигурировать в суде как доказательство. Поскольку все меньше лабораторий осуществляет рутинную диагностику хламидиоза с помощью культуры клеток, то ситуация в ближайшем будущем изменится в сторону признания ПЦР методом диагностики в случаях, связанных с инфицированием ребенка половым путем. Положительный результат должен быть подтвержден с помощью различных тестов, амплифицирующих разные участки генома хламидий. При ПЦР вероятность ложноотрицательных результатов из-за ингибиции гораздо выше, чем ложноположительных результатов из-за контаминации, поскольку последняя зависит от лаборатории и легче контролируется (Hammerschlag, 2001).

Тесты на основе моноклональных и поликлональных антител менее специфичны и могут давать ложноположительные реакции из-за перекрестного реагирования с *S. pneumoniae* и бактериями, имеющими общие антигены с *C. trachomatis*. Таким образом, при установлении этиологического диагноза венерической хламидийной инфекции у ребенка, который может иметь юридические последствия, следует придерживаться следующих рекомендаций (Centers for Disease Control and Prevention, 2002):

- материал следует брать из гениталий (влагалище и/или шейка матки), прямой кишки и передней стенки глотки;
- применяется метод диагностического выделения в культуре клеток;
- для демонстрации включений в клетках культуры необходимо использовать хорошо проверенные антитела, специфичные к *C. trachomatis*;
- тесты, основанные на выявлении антигенов и антител, недостаточно чувствительны и специфичны в данном случае;
- тесты, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, могут применяться при отсутствии возможности провести выделение в культуре клеток. Положительный результат должен быть подтвержден другим тестом, выявляющим другой ген хламидий.

### 12.1.2. Экстрагенитальные поражения, вызванные *Chlamydia trachomatis*

Помимо поражения органов и тканей в зоне первичного заражения, хламидии способны вызывать воспалительные процессы другой локализации, эпидемически связанные с урогенитальной инфекцией. Основными условиями возникновения экстрагенитальных хламидиозов являются их перенос (различными способами) из первичного очага инфекции и наличие на вторично инфицируемом участке клеток, чувствительных к патогенному микроорганизму. *C. trachomatis* проявляет выраженный тропизм к клеткам столбчатого эпителия.

#### Хламидийный проктит

Dunlop и соавторы (1969) впервые установили инфицирование хламидиями прямой кишки у женщин – половых партнерш больных негонококковым уретритом. Заболевание протекает с выраженными воспалительными изменениями слизистой оболочки, в том числе (в отдельных случаях) с лимфоидной фолликулярной реакцией или рубцеванием. Хламидийный проктит обнаруживается у женщин и у мужчин-гомосексуалистов. Инфекция может протекать без видимых изменений слизистой оболочки, но со слизисто-гнойными выделениями, либо бессимптомно. Сочетанную хламидийную инфекцию прямой кишки и мочеполовых органов выявляют у большинства женщин, больных хламидийным проктитом.

#### Хламидийный фарингит

Отдельные случаи орофарингеальной хламидийной инфекции, возникшей при орорегенитальных половых контактах, описаны как у женщин, так и у мужчин (Goldmeier, Darougar, 1977; Schachter, Atwood, 1975; Komaroff et al., 1983). Источниками возбудителя инфекции являются половые партнеры с хламидийным уретритом или цервицитом. Клинические проявления этой формы хламидиоза, диагностируемой по выделению хламидий из носовой части глотки, слабо выражены, ограничиваются, как правило, локализованной зоной гиперемии слизистой оболочки



и, в некоторых случаях, фолликулярной реакцией. Хламидийный фарингит может и не иметь непосредственной эпидемиологической связи с урогенитальной инфекцией, развиваясь как осложнение офтальмохламидиоза, вследствие распространения возбудителя из конъюнктивального мешка по эпителию или с отделяемым через носослезный проток в носовую часть глотки. Хламидийный воспалительный процесс в носовой части глотки может сопровождаться евстахиитом, реже – отитом, а также поражением различных отделов дыхательной системы.

### **Хламидии и восходящая инфекция мочевых путей**

Хламидийный уретрит, передающийся половым путем, в ряде случаев сопровождается или предшествует воспалительным процессам, выявляемым в различных отделах мочевых путей. Рецидивирующий уретроцистит чаще возникает у женщин и реже у мужчин, мочеиспускательный канал которых инфицирован хламидиями. В редких случаях у больных хламидийным уретритом или реконвалесцентов развивается не только цистит, но и пиелонефрит. В результате наблюдений случаев восходящей хламидийной инфекции возникло представление о хламидиях как возбудителях, поражающих различные мочевые органы. Потенциальным источником инфекции считают не только инфицированный хламидиями мочеиспускательный канал, но также предстательную железу, шейку матки и другие мочеполовые органы. Вгусе и соавторы (1981) сообщили о выделении хламидий из утренней порции мочи 31 (27%) из 119 женщин, больных рецидивирующим цистоуретритом. Причем у 25 женщин была установлена хламидийная моноинфекция. Остается сомнительной локализация выделенных хламидий в мочевом пузыре, так как использовавшаяся проба мочи могла быть контаминирована хламидиями из мочеиспускательного канала.

Вопрос о возможной хламидийной этиологии восходящей инфекции мочевых путей остается невыясненным. *C. trachomatis* обладает выраженным тропизмом к столбчатому эпителию и неизвестно, способна ли она размножаться в переходном эпителии, выстилающем мочевой пузырь, мочеточники и почечные лоханки. При восходящей инфекции мочевых путей можно предполагать потенциальную этиологическую роль сопутствующей бактериальной флоры, присоединившейся к хламидийной инфекции мочеполовых органов (Никитенко, 2002). По данным Ильина (1991), восходящая инфекция мочевых путей при венерических НГУ протекает в виде уретроцистита и пиелонефрита, сопровождаясь частым и болезненным мочеиспусканием, пиурией и терминальной гематурией.

Нарушения функции почек и очаговый пиелонефрит, не связанные с восходящей инфекцией, могут наблюдаться при тяжелых формах генерализованного хламидиоза зоонозной природы и при орнитозе (Казанцев, 1973; Ильинский, 1974; Гнутов, Ерохина, 1980). Эти хламидийные инфекции вызываются представителями хламидий, первично поражающими животных, и относятся к видам *Chlamydophyla psittaci* и *Chlamydophyla abortus*. Ohsawa и соавторы (2001) описали 24-летнюю больную с хламидийным сальпингитом, у которой развилась почечная недостаточность, сопровождающаяся макрогематурией и протеинурией. Поликлональная сывороточная гипергаммаглобулинемия, тромбоцитоз, повышенное содержание интерлейкина-6 в сыворотке и моче указывали на иммунный характер поражения. Биопсия показала иммунокомплексную гломерулопатию с интенсивной интерстициальной инфильтрацией различными типами воспалительных клеток, включая плазмочиты. Авторы заключили, что хламидийный сальпингит мог быть одним из причинных факторов, вызвавших иммунокомплексное поражение клубочков (Ohsawa et al., 2001).

### Офтальмохламидиоз

Инфицированные хламидиями мочеполовые органы являются первичным источником хламидийной офтальмоинфекции, определяемой в соответствии с клиническими проявлениями, как конъюнктивит с включениями и спорадическая трахома. Конъюнктивит с включениями – воспалительный процесс в конъюнктиве, обусловленный хламидиями, которые образуют в пораженных эпителиальных клетках цитоплазматические включения (микроколонию возбудителя инфекции) сероваров от D до K *S. trachomatis*. Спорадическая трахома, в противоположность эндемической, определяет трахомный синдром, связанный, как правило, с урогенитальным источником возбудителя инфекции вне эндемических по трахоме территорий (Шаткин, Мавров, 1983; Viswalingam et al., 1983).

Конъюнктивит с включениями (глазная форма паратрахомы, хламидийный конъюнктивит), как правило, возникает при переносе возбудителя из мочеполовых органов в конъюнктивальный мешок глаза больного или его полового партнера. Это контактный механизм передачи инфекции, чаще с помощью загрязненных рук. По данным Schachter и Dawson (1979), эта форма офтальмохламидиоза нередко является также следствием непосредственного инфицирования при орогенитальных сношениях. Давно известны случаи заболевания гинекологов, венерологов и офтальмологов, возникавшие после обследования ими больных урогенитальной хламидийной инфекцией, а также случаи заражения глаз у лиц, контактирующих с новорожденными с офтальмохламидиозом (Thygeson, Stone, 1942; Jones et al., 1964; Jones, 1964). Эпидемиологические вспышки этой формы офтальмохламидиоза могут возникать при пользовании общественными водными резервуарами («бассейновые» конъюнктивиты). Однако для хламидийного конъюнктивита данный путь передачи не характерен (в отличие от аденовирусных конъюнктивитов). У больного хламидийным конъюнктивитом всегда можно найти генитальную хламидийную инфекцию, которая, как впервые отметил Mordhorst (1967), часто бессимптомна. Генотипирование с помощью ПЦР и серотипирование с помощью МИФ показало, что штаммы хламидий, выделенные из глаз и из гениталий у данного больного, идентичны (Garland et al., 1995; Isobe et al., 1996). Имеются эпидемиологические данные, что клинически выраженный конъюнктивит с включениями развивается в одном из 300 случаев генитального хламидиоза. Однако, если учитывать клинически стертые случаи, то это количество значительно больше (Tullo et al., 1981; Postema et al., 1996).

Заболевают в основном лица активного полового возраста (20-40 лет), женщины болеют чаще, чем мужчины. Особенности развития и течения конъюнктивита с включениями у взрослых изучены при естественной и экспериментальной инфекции (Майчук, 1986; Майчук и соавт., 1990; Dawson, Schachter, 1967; Dawson et al., 1970). Инкубационный период равен 5-14 дням. В опытах на добровольцах начальные симптомы определялись на 2-19-й день после заражения, в зависимости от дозы введившегося в конъюнктивальный мешок возбудителя. Начало заболевания острое. Обычно поражается один глаз. Двусторонний процесс наблюдается примерно в одной трети случаев. У больных отмечают отек и гиперемию кожи век. Глазная щель сужена, имеется птоз. Через 3-5 дней возникает регионарная «предушная аденопатия». Увеличенная лимфатическая железа уплотнена, подвижна, болезненна. Характерны обильные выделения – сначала слизисто-гнойные, затем гнойные. Конъюнктивит век и ее своды резко гиперемированы, отечны и инфильтрированы, имеют бархатистый вид за счет выраженной сосочковой гипертрофии. Верхний и нижний своды конъюнктивы набухшие. При выворачивании век они выступают в виде валиков. На 2-3-й неделе заболевания

появляются лимфоидные фолликулы, постепенно занимающие все большие участки конъюнктивы и увеличивающиеся в размере. В области верхнего хряща века особенно выражена гипертрофия сосочков, среди которых определяются мелкие фолликулы.

При отсутствии лечения воспалительный процесс наиболее активен в течение 2-3 мес., после чего сосочковая гипертрофия ослабевает, преобладают фолликулы, которые нередко сливаются. При обратном развитии многие фолликулы постепенно уплотняются и рассасываются. Характерной особенностью конъюнктивита с включениями, в отличие от трахомы, является отсутствие рубцевания фолликулов и интактность роговицы. Однако это характерно для типичного течения, без выраженной воспалительной реакции. При синдроме конъюнктивита с включениями может наблюдаться рубцевание фолликулов, в ряде случаев устанавливаемое только при биомикроскопии. У 50% больных в остром периоде выявляют отек, васкуляризацию и диффузную инфильтрацию верхнего лимба, а также эпителиальный аваскулезный кератит, без признаков характерного для трахомы паннуса (Viswalingam et al., 1983). При экспериментальной инфекции Dawson и соавторы (1970) отмечали отек лимба и точечный эпителиальный кератит, который был у всех зараженных добровольцев. Во многих случаях наблюдали субэпителиальные инфильтраты в роговице, а также неоваскуляризацию лимба и роговицы. Инфильтраты возникали на 20-34-й день после заражения и сохранялись в ряде случаев на протяжении 21 мес.

По данным Jones (1975), из 92 больных с установленным урогенитальным источником возбудителя заболевание протекало по традиционному типу конъюнктивита с включениями в 14% случаев, у 32% больных был, кроме того, точечный субэпителиальный кератит, а у 54% выявляли и типичные признаки трахомы – активный рубцовый процесс в конъюнктиве и паннус на роговице. Таким образом, спорадическая трахома (хламидийный кератоконъюнктивит) является одной из самых тяжелых клинических форм офтальмохламидиоза, эпидемиологически связанного с урогенитальным источником. Клинические ее проявления и прогноз сходны с таковыми обычной трахомы. Серовары трахомы (А, В, Ва и С) и окулогенитальные серовары (от D до K) не отличаются по степени вирулентности. При трахоме осложнения обусловлены множественными реинфекциями. В развитых странах синдром спорадической трахомы не является частым клиническим проявлением офтальмохламидиоза урогенитального происхождения. Для его возникновения необходимо многократное инфицирование глаза, вероятность которого у одного и того же больного не так уж велика. Обычно первичный воспалительный процесс в конъюнктиве заставляет больного обратиться за медицинской помощью (Darougar, Viswalingam, 1988).

Хроническое течение офтальмохламидиоза может продолжаться многие месяцы и годы, но в ряде случаев может наступить и спонтанное излечение. При хламидийной офтальмоинфекции у 15-20% больных развивается односторонний евстахиит (Майчук, 1986). Нередко возникает и диффузная лимфоидная гиперплазия в носовой части глотки, способная вызвать блокаду евстахиевой трубы и двусторонний средний отит (Dawson, Schachter, 1967). Возможны проявления хламидийного фарингита и поражение других отделов дыхательной системы. Наиболее тяжелые осложнения, в первую очередь в отношении зрительной функции глаза, могут возникать при спорадической трахоме. Однако соответствующая этиотропная терапия обычно предупреждает или ограничивает развитие этих осложнений.

Диагноз офтальмохламидиоза и его клинической формы устанавливают на основе клинических данных, выявления в соскобах конъюнктивы цитоплазматических включений возбудителя (в эпителиальных клетках методом иммунофлуоресценции с помощью моноклональных антител),

Таблица 12.1.

**Дифференциальная диагностика хламидийного конъюнктивита взрослых**  
(Viswalingam et al., 1983)

Этиология	Характеристика
Аденовирус	Острый сосочковый и фолликулярный конъюнктивит. Вначале односторонний, затем становится двусторонним, спустя 5–7 дней. Слезотечение, отек век. Предущая лимфоаденопатия более выражена, чем при хламидийном конъюнктивите. Характерны экхимозы бульбарной конъюнктивы и петехиальные геморрагии конъюнктивы век. Фолликулы меньше, чем при хламидийном конъюнктивите. Кератит в области зрачка вызывает резкую светобоязнь и ухудшение зрения.
Вирус простого герпеса	Герпес может протекать в виде острого фолликулярного конъюнктивита без пузырьков на веках и без эрозий на роговице. Через 7–14 дней после начала возникает точечный кератит с эрозиями и язвами. Характерно наличие рецидивов герпеса в анамнезе.
Стафилококки	Обычно односторонний и сопровождается блефаритом, мейбомитом и халазией. Плотные краевые инфильтраты желтоватого цвета. Поверхностная васкуляризация верхних и/или нижних зон роговицы. В мазке по Граму легко определяются стафилококки, в культуре — <i>S. aureus</i> .
Розацеа	Блефароконъюнктивит, связанный с <i>M. furfur</i> . Клинически напоминает стафилококковый, но с телеангиоэктазией сосудов век и носа.
Аллергия (атопия)	Часто связан с лекарствами. При атопическом конъюнктивите характерны лимбальные и бульбарные фолликулы. Вернальный (весенний) конъюнктивит — большие белесые сосочки, напоминающие морские камешки. При цитологическом исследовании — эозинофилы. Характерна аллергия в анамнезе.
Контагиозный моллюск	Хронический кератоконъюнктивит, напоминающий хламидийный. Первичный узелок, как правило, просматривается. Узелки с пуповидным вдавлением и эозинофильные включения при цитологии являются патогномоничными.
<i>Chlamydia</i>	Хронический фолликулярный конъюнктивит, обычно односторонний. Начало подострое. Субъективно — ощущение инородного тела, слезотечение, слизистые выделения, краснота, фотофобия, отек век. На глазной конъюнктиве видны фолликулы, преимущественно у верхнего и нижнего сводов и в области <i>sacculi</i> . Роговица обычно не вовлекается. Может быть легкий точечный кератит, который разрешается спонтанно.

обнаружений ДНК (РНК) хламидий с помощью тестов амплификации и эпидемиологических показателей. Morton и соавторы (1990) предлагают брать дополнительный соскоб из полости носа, что увеличивает выявляемость хламидийного конъюнктивита на 53%.

Хламидийный конъюнктивит необходимо дифференцировать от других конъюнктивитов инфекционной и неинфекционной природы — гонококковых, стафилококковых, аденовирусных, герпетических и аллергических (табл. 12.1).

### 12.1.3. Урогенитальные хламидиозы и репродуктивная функция

#### Бесплодный брак как социальная и медицинская проблема

Брак считают бесплодным, когда беременность отсутствует после 12 месяцев регулярной половой жизни без предохранения (Юнда, 1990; Паращук, 1994; Сметник, Тумилович, 1995).



Бесплодный брак может быть результатом женского бесплодия, мужского бесплодия или бесплодия обоих супругов одновременно. Отсутствие детей в семье может быть обусловлено также половыми расстройствами, невынашиванием беременности или добровольной бездетностью (Veevers, 1972; Poston, 1977). Будущее любой страны определяется нормальным процессом воспроизводства населения. Среди факторов, влияющих на демографическую ситуацию, важная роль отводится проблеме бесплодия (Грищенко и соавт., 1990; 2000). Она определяется такими факторами, как семейное неблагополучие и даже распад семей, не имеющих детей (Королев, 1978). Тревога и депрессия констатируются как наиболее частые психологические отклонения у бесплодных супругов (Seibel, Taumog, 1982; Wright et al., 1989; 1991; Коломбок, 1992). Выраженные отрицательные эмоции сами по себе могут снизить вероятность оплодотворения и беременности. Описаны случаи бесплодия, обусловленного гиперпролактинемией на почве тревожного синдрома (Harrison, 1982). Если учитывать тот факт, что каждая пятая женщина не имеет детей, то бесплодие становится государственной проблемой, без решения которой нельзя преодолеть отрицательные демографические тенденции в Украине (Урядовий кур'єр, 2002; Іркіна, 2002).

Причиной бесплодного брака в 40-50% случаев является патология репродуктивной системы у одного из супругов, реже (5-10%) – у обоих. В 60-80% причиной бесплодного брака является состояние здоровья жены, в 20-40% – мужа (Акунц, 1978; Сметник, Тумилович, 1995). В литературе встречается много классификаций женского бесплодия. Выделяют различные клинические формы, в зависимости от этиологии и патогенеза нарушений репродуктивной функции: трубное, эндокринное, иммунологическое и бесплодие, обусловленное анатомическими нарушениями (Грищенко и соавт., 1990, 2000; 2001). Среди экскреторных форм выделяется перитонеальное, маточное и шеечное бесплодие. Кроме того, в отдельный пункт выделено психогенно-сексуальное бесплодие (Юнда, 1990). Мужское бесплодие может быть следствием многих заболеваний. Существует много классификаций и систематизаций форм мужской стерильности, основанных на различных принципах (Бойко, 2002). Единую классификацию форм бесплодного брака создать трудно, поскольку в реальной жизни врач часто сталкивается с несколькими этиологическими и патогенетическими факторами, имеющимися у данной бесплодной пары. Один фактор выявляется менее чем у половины бесплодных пар. Чаще выявляется от двух до семи факторов (Пшеничникова, 1991).

Мочеполовые инфекции, вызванные хламидиями и микоплазмами, являются самыми распространенными среди венерических заболеваний. Они вызывают патологические изменения в половых органах, в результате которых может произойти нарушение половой и детородной функции. С 1991 по 2001 годы Институтом дерматологии и венерологии АМН Украины в содружестве с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины были всесторонне изучены клинические, эпидемиологические и морфологические аспекты репродуктивных нарушений у больных мочеполовым хламидиозом и микоплазмозом. Обследовано в общей сложности более 600 человек репродуктивного возраста (Мавров, 1991; 1994; 1995; 1996; 2002; Мавров, Цераидис, 1993; Мавров, Шевченко, 1994; Мавров, Мальцева, 2003, Мавров и соавт. 1994; 2002, Бабюк, Мавров, 1994). На основании проведенных исследований разработана комплексная система лечебно-профилактических мероприятий, позволяющая предотвращать патогенное влияние хламидийной и микоплазменной инфекции на детородную функцию. Внедрена диагностическая программа, направленная на своевременное выявление мочеполового хламидиоза

и микоплазмоза у бесплодных пар. Сформулированы рекомендации по этиотропному и патогенетическому лечению бесплодных пар, больных хламидиозом и микоплазмозом, разработаны принципы оказания медицинской помощи больным мочеполовыми инфекциями с нарушенной репродуктивной функцией (Мавров, 1994; 1995; 1997; Мавров, Пиняев, 1992; Мавров, Пиняев, 1992; Мавров и соавт., 1992; 1995). Большое значение здесь играют так называемые вспомогательные репродуктивные технологии (Дахно, 2002; Чайка, 2002). При обследовании 138 женщин и 123 мужчин, лечившихся по поводу хронического мочеполового хламидиоза и микоплазмоза, изучались частота, характер половых и генеративных расстройств в зависимости от этиологии заболевания и течения патологического процесса в половых органах. При изучении клинических проявлений хронической мочеполовой инфекции установлено, что поражение «верхнего отдела» урогенитального тракта при хламидиозе и уреаплазмозе наблюдалось у 41-47% мужчин и у 23% женщин. При смешанном инфицировании хламидиями и уреаплазмами восходящая инфекция наблюдалась у 87% мужчин и у 47% женщин. В патологический процесс вовлекались предстательная железа, маточные трубы, придатки яичек, семенные пузырьки, а также матка, маточные трубы, яичники.

### Женское бесплодие

К началу 80-х годов стало ясно, что приблизительно у 20% женщин, страдающих бесплодием, наблюдается патология маточных труб, возникшая в результате воспалительных процессов (Вуд, Петерсон, 1983; Давыдов, 1977). Наиболее часто трубное бесплодие – это результат перенесенного острого, подострого либо бессимптомного сальпингита (Бодяжина, 1978; Сокольская, Иванюта, 1975; Иванюта, Иванюта, 2002). Многолетние наблюдения Westrom (1976) над большой группой больных, перенесших сальпингит, показали, что у этих женщин риск возникновения бесплодия в 4-7 раз выше, чем в контрольных группах.

Долгое время основным этиологическим агентом сальпингита из группы микроорганизмов, передающихся половым путем, считали *Neisseria gonorrhoeae* (Майзель, 1985; Побединский,

Таблица 12.2.

### Диагностическое выделение *C. trachomatis* у женщин, больных сальпингитом

АВТОРЫ, год	Хламидии	
	выделены из шейки матки*	выделены из труб, спаек и эндометрия*
Thompson et al., 1980	3/30 (10%)	3/30 (10%)
Henry-Suchet et al., 1980	6/10 (60%)	4/17 (24%)
Gjonnaess et al., 1982	25/56 (46%)	5/31 (16%)
Wolner-Hanssen et al., 1985	142/373 (38%)	11/22 (50%)
Wasserheit et al., 1986	14/23 (61%)	10/23 (44%)
Kiviat et al., 1986	21/55 (38%)	24/36 (67%)
Paavonen et al., 1987	16/31 (52%)	12/31 (39%)
Brihmer et al., 1987	50/187 (27%)	22/187 (12%)

\* – количество положительных результатов/количество обследованных и процент выделения хламидий

1949). Однако еще Falk (1965) показал, что окклюзия маточных труб чаще наступает после гонококковых сальпингитов, чем после гонококковых. Роль *Chlamydia trachomatis* как возбудителя острых сальпингитов впервые была доказана в 1976 году (Hamark, Brorsson, 1976). В 1977 году Mardh и соавторы выделили хламидии непосредственно из фаллопиевых труб у 6 из 20 больных сальпингитом (Mardh, Ripa, 1977). В последующие годы проведены исследования, установившие ведущую роль хламидий в этиологии сальпингита. Данные ранних авторов суммированы в табл. 12.2. Было проведено также несколько серологических исследований, доказывающих роль *C. trachomatis* в этиологии сальпингита у определенной части больных (Eschenbach, 1986; Mardh, 1980; Raavonen, Makela, 1985). Данные серологических исследований сведены в табл. 12.3.

Лапароскопические данные о характере поражения маточных труб достоверно не различались у женщин с сальпингитом в анамнезе и без такового (Kane, Woodland, 1984). Как видно из табл. 12.2 и 12.3, имеются веские серологические доказательства связи мочепоолового хламидиоза с трубным бесплодием у женщин. Первые данные зарубежных авторов о роли хламидиоза в патологии репродуктивной системы соотносились с первыми данными отечественных исследователей (Аракелова, Данилов, 1989; Иванюта, Руденко, 1986, 1988).

Серозидемиологические обследования больших групп населения подтверждали роль *C. trachomatis* как одного из ведущих этиологических агентов восходящей генитальной инфекции у женщин (Панкратова, Шаткин, 1990). В отличие от специфических антител в сыворотке крови, сами хламидии выделялись из маточных труб больных бесплодием далеко не всеми авторами. Впервые это сделала Henry-Suchet с соавторами в 1981 году у 6 из 39 бесплодных женщин. Затем эти результаты были подтверждены другими исследователями

Таблица 12.3.

**Выявление антител к *C. trachomatis* в сыворотке крови у бесплодных женщин с поражением и без поражения маточных труб**

АВТОРЫ, год	Антитела к хламидиям	
	у женщин с поражением труб*	у женщин без поражения труб*
Punnonen et al., 1979	21/23 (91%)	52/105 (49%)
Henry-Suchet et al., 1981	32/64 (50%)	8/40 (20%)
Cevenini et al., 1982	36/40 (90%)	8/30 (27%)
Moore et al., 1982	24/33 (73%)	0/35 (0%)
Jones et al., 1982	46/77 (60%)	13/77 (17%)
Gump et al., 1983	34/53 (64%)	38/134 (28%)
Conway et al., 1984	36/48 (75%)	23/75 (31%)
Kane et al., 1984	27/70 (35%)	6/52 (12%)
Guderian and Trobough, 1986	115/159 (72%)	17/106 (16%)
Robertson et al., 1987	37/48 (77%)	27/77 (34%)
Anastad et al., 1987	59/67 (88%)	63/128 (49%)

\* – количество положительных результатов/количество обследованных и процент выявления антител к хламидиям

(Иванюта, Руденко, 1988, 1990; Sellors, Mahony, 1988; Shepard, Jones, 1989). В нескольких исследованиях авторам не удалось выделить или обнаружить хламидии в маточных трубах у женщин с трубным бесплодием, несмотря на большое количество обследованных (Anastad, Lunde, 1987; Gump, Gibson, 1983; Kane, Woodland, 1984). Такие результаты можно объяснить тем, что обследовались больные не с активной инфекцией, а с ее последствиями. С другой стороны, могла иметь место персистенция с малым количеством возбудителя, когда чувствительность применяемых в то время диагностических методов не позволяла выявить хламидиоз (Шаткин, Попов, 1986). Кроме того, нейтрализующие антитела и прием антибактериальных препаратов могли препятствовать диагностическому выделению хламидий (Kiviat, Paavonen, 1986; Mardh, 1980).

Известно, что воспалительная реакция брюшины, вплоть до перигепатита, может наблюдаться при мочеполовом хламидиозе (Eschenbach, 1984; Wolner-Hanssen, Westrom, 1982). Хламидии были выделены из перитонеальных спаек больных бесплодием (Иванюта, Руденко, 1988). Хламидии, попадая из маточных труб в брюшную полость, могут вызвать воспаление, образование спаек и перитонеальное бесплодие. Изолированный эндометрит встречается редко, являясь чаще всего сопутствующим фактором другой гинекологической патологии, выявляемой у бесплодных женщин (Пшеничникова, 1991; Tomoika, Anzai, 1987). Исследования показали, что существует корреляция между плазмноклеточным эндометритом и лапароскопически подтвержденным сальпингитом (Kiviat, Paavonen, 1986, 1987; Paavonen, Aine, 1985; Wasserheit, Bell, 1986). Нарушения функции эндометрия в результате инфекции мешает процессам имплантации и питания бластоцисты. Хламидийный эндометрит был впервые описан Gump et al. (1981). Последующие исследования подтвердили роль *C. trachomatis* как ведущего этиологического агента плазмноклеточных эндометритов (Mardh, Moller, 1981; Paavonen, Aine, 1985; Wolner-Hanssen, Mardh, 1982).

Описана морфология хламидийного эндометрита, для которого характерны герминативные фолликулы, состоящие из трансформированных лимфоцитов, высокая концентрация плазматических клеток в эндометриальной строме и интраэпителиальные полиморфноядерные лейкоциты (ПМЯЛ) в эндометриальных железах (Kiviat, Paavonen, 1986; Paavonen, Aine, 1985). Ряд авторов выделили хламидии из эндометрия у бесплодных женщин, хотя для этого понадобились множественные пассажи в культуре клеток (Cleary, Jones 1985; Shepard, Jones, 1989). Fedele и соавторы (1989) выделили хламидии из эндометрия у 13 из 52 женщин с бесплодием неясного генеза. Они предположили, что маточный фактор при бессимптомной хламидийной инфекции может вызвать бесплодие у некоторых женщин. Еще раньше Eggert-Kruse et al. (1988) обнаружили IgG-антитела в сыворотке крови у 26% и хламидии в образцах эндометрия у 3,5% (5 из 144) клинически здоровых женщин.

В связи с приведенными данными возникает вопрос, может ли хламидийная инфекция влиять на имплантацию и каковы механизмы такого влияния. Вполне логично предположить, что, являясь внутриклеточным паразитом, хламидии могут изменить морфологию клеток и снизить их чувствительность к гормонам, регулирующим циклические процессы в функциональном слое.

Если учитывать значение цервикальных факторов в обеспечении репродуктивной функции, то представляется важной роль хламидийного эндоцервицита при бесплодии. Хронический эндоцервицит – частое явление у женщин с бесплодием. Клетки цилиндрического эпителия канала шейки матки являются наиболее благоприятным местом для паразитизма



хламидий (Щербинов, 1989). Иванова и соавторы (1990) обнаружили антиген хламидий в шейке матки у 61 (23,4%) из 256 бесплодных женщин. Гистологическая картина хламидийного цервицита характеризуется воспалением с выраженной мононуклеарной инфильтрацией, микроабсцессами, десквамацией эпителия и наличием герминативных лимфоидных фолликулов в цервикальной строме (Hare, Toone, 1981; Kiviat, Paavonen, 1986; Kumimoto, Brunham, 1985; Paavonen, Stevens, 1988). Такие изменения не могут не сказаться на качестве цервикальной слизи. В литературе мало публикаций, рассматривающих взаимоотношения между хламидийным эндоцервицитом и цервикальными факторами бесплодия. Данные немногочисленных авторов противоречивы. Одни не выявляли корреляции между маркерами хламидийной инфекции и отклонениями при посткоитальном тесте (Ruijs, Kauer, 1990). Другие сообщили об улучшении показателей цервикальной слизи у больных мочеполовым хламидиозом после антибактериальной терапии (Eggert-Kruse, Gerhard, 1990).

Известно, что длительный воспалительный процесс в яичниках может вызвать секреторные нарушения и помешать процессу овуляции (Бодяжина, 1978; Китаев, 1982). Хроническое воспаление придатков матки вызывает функциональные сдвиги в гипоталамо-гипофизарно-гонадной системе по типу первичного дискорреляционного гипогонадизма (Имшинецкая, 1990). Исходя из этих представлений, можно объяснить расстройства овуляции у больных хронической восходящей хламидийной инфекцией (Eschenbach, 1986). Беднова и соавторы (1989) наблюдали нарушения фолликулиновой фазы овуляторного цикла у 58% и лютеиновой у 15% больных смешанной гонорейно-хламидийной инфекцией. Другие авторы сообщили, что у больных хламидиозом, кроме поражения маточных труб, отмечены эндокринные нарушения: снижение показателей эстрогена, прогестерона и соотношения ЛГ/ФСГ (Батыршина, Щербинов, 1990; Щербинов, 1989).

Известно, что инфекция нижнего отдела половых путей способствует сенсбилизации женского организма к антигенам эякулята (Джонес, 1983). Вероятно, хламидийная инфекция в этом смысле не является исключением. Результаты исследования иммунитета при хламидийных инфекциях показывают, что *C. trachomatis* может поликлонально активировать В-лимфоциты, взаимодействуя с их рецепторами к IgG и IgM (Бартенева, 1986; Kumimoto, Brunham, 1985). Активация В-системы иммунитета может способствовать возникновению гуморального ответа к антигенам сперматозоонов и вызвать иммунологическое бесплодие (Пшеничникова, 1991). Hanna et al. (1982) изучали иммунный ответ к антигенам хламидий у человека и установили повышенную фагоцитарную активность макрофагов. При хронических воспалительных заболеваниях органов малого таза количество макрофагов увеличивается и их фагоцитарная активность в отношении сперматозоонов усиливается (Пшеничникова, 1991). Таким образом, могут создаваться условия для повышенной агрессивности иммунной системы по отношению к сперматозоонам.

Трубная беременность и последующая тубэктомия являются одной из частых причин вторичного бесплодия (Пепперелл, Хадсон, 1983; Паращук, 1994). У женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза трубная беременность наступает в 7 раз чаще по сравнению с теми, у кого нет и не было воспалительного процесса в половых органах (Westrom, Bengtsson, 1981). У женщин, оперированных по поводу внематочной беременности, риск развития бесплодия – 50% и риск повторной эктопической беременности – 10-20% (Eschenbach, Daling, 1983). Brunham et al. (1986) сообщили о вялотекущем сальпингите у женщин с трубной беременностью и наличии антител к *C. trachomatis*. Данные других

исследователей подтверждают, что если хламидии поражают маточные трубы, то риск трубной беременности возрастает (Gump, Gibson, 1983; Swensson, Mardh, 1985).

Если не выявить восходящий инфекционный процесс в тазовых органах, то последствия для фертильности женщины могут быть серьезными. В серии ставших классическими исследований, проведенных в Швеции Westrom и коллегами, было установлено влияние ВЗОМТ на репродуктивную способность. За 1960-1984 гг. 2501 женщина подверглась тщательному клинико-лабораторному исследованию, включая лапароскопию. Данные суммированы в табл. 12.4. (Westrom et al., 1992).

Таблица 12.4.

**Влияние инфекции тазовых органов на репродуктивную способность женщин**  
(Westrom et al., 1992).

	Инфекция есть	Инфекции нет
Подверглись диагностической лапароскопии, n = 2501	74% (1844)	26% (657)
Удалось собрать данные о репродуктивной функции, n = 2333	94% (1732)	91,5% (601)
Пытались забеременеть	75,6%	75%
Не могли забеременеть	16%	2,7%
Непроходимость маточных труб	10,8%	0%
Эктопическая беременность	9,1%	1,4%

В другом исследовании 708 женщин с лапароскопическими признаками инфекции было показано, что обструкция маточных труб при одной инфекции составляет 11,4%, при двух инфекциях – 23,1%, а при трех инфекциях – 54,3% (Westrom and Mardh, 1983). В приведенных исследованиях *C. trachomatis* была наиболее частым этиологическим агентом ВЗОМТ, хотя ее значение, вероятно, было оценено не полностью, поскольку методы диагностики в то время не всегда позволяли выявить инфекцию. Роль хламидий в этиологии эктопической беременности была подтверждена большим исследованием типа «случай-контроль», проведенным во Франции (Coste et al., 1994). Доля хламидий в этиологии ВЗОМТ варьирует в различных странах и в разных популяционных группах. В США 5-20%, в Европе – 25-40%, в Великобритании – 55% (Schachter, 1999; Bevan et al., 1995). В Скандинавии пик гонококковых и хламидийных сальпингитов пришелся на начало 1970-х годов. Отражением этого стало увеличение эктопических беременностей спустя полтора десятка лет, в конце 1980-х (Bjartling et al., 2000).

С помощью серологического обследования не всегда можно диагностировать хламидийную этиологию трубно-перитонеального бесплодия, однако в эпидемиологических исследованиях связь между повышенными титрами антител к хламидиям и трубным бесплодием явно прослеживается (Robertson et al., 1987). Большинство женщин с бесплодием не имеют в анамнезе ВЗОМТ и к врачу не обращаются. Это так называемый молчаливый, или бессимптомный, сальпингит, который характерен для восходящей хламидийной инфекции. Однако определенная часть женщин с хламидийной инфекцией испытывает боли внизу живота. Buchan и соавторы (1993) сравнили 1355 женщин, повторно госпитализированных по ВЗОМТ с 10507 женщинами, госпитализированными с другими диагнозами. У женщин с хламидийным сальпингитом

в 10 раз больше вероятность эктопической беременности, они в 8 раз чаще подвергались гистероэктомии и в 6 раз чаще у них встречался эндометриоз. При лапароскопии у таких женщин, как правило, находят спайки тазовой брюшины (Robertson et al., 1987; 1988; Eschenbach et al., 1997).

В исследованиях, проведенных в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, было показано, что мочеполовой хламидиоз приводит к нарушению функций маточных труб во взаимодействии с рядом сопутствующих факторов. У женщин, инфицированных хламидиями, развитию трубного бесплодия способствуют раннее начало половой жизни вне брака, применение внутриматочных спиралей для предохранения от беременности, длительное течение инфекции без установления этиологического диагноза и адекватного лечения (Мавров, 1994; Мавров, 1996; Мавров, Чинов, 2003). Исследуемую группу составили 59 супружеских пар, у которых была выявлена мочеполовая хламидийная инфекция. Эти больные были отобраны с целью выявления анамнестических и клинко-эпидемиологических особенностей урогенитального хламидиоза, сочетаемого с трубным бесплодием. В основную подгруппу входили 32 пары, где у жены было трубное бесплодие, а подгруппу сравнения составили 27 пар, где супруги были фертильными. По социально-демографическим данным больные сравниваемых подгрупп не различались. При изучении анамнеза больных установлено, что для женщин с трубным бесплодием были характерны раннее начало половой жизни вне брака и использование в прошлом ВМС для предохранения от беременности (Мавров, 1996; Мавров, Чинов, 2003). Женщины с трубным бесплодием чаще лечатся у гинекологов по поводу «неспецифических» воспалительных заболеваний придатков матки. Этиология этих заболеваний часто не установлена. Длительное течение хламидийной инфекции без адекватного лечения способствует возникновению трубного бесплодия у женщин. Персистенция возбудителя, повторные заражения (суперинфекция) приводят к повреждению маточных труб и облитерации их просвета.

Выявлены некоторые особенности течения заболевания у супругов с трубным бесплодием (Мавров, 1994). У мужей женщин с трубным бесплодием отсутствие субъективных проявлений заболевания наблюдалось чаще, чем у мужей фертильных женщин. Между бессимптомным течением инфекции у мужчин и трубным бесплодием у их жен имелась корреляционная связь. Когда у мужчины инфекция хламидиоза протекала бессимптомно, супружеская пара реже попадала в поле зрения врачей, инфекция дольше оставалась невыявленной, и вероятность поражения маточных труб повышалась (Мавров, 1994; 1996). В большом исследовании PEACH – (Pelvic Inflammatory Disease Evaluation and Clinical Health), проведенном в США при участии 563 женщин, не было установлено статистически достоверной связи между гормональными контрацептивами и воспалительными заболеваниями органов малого таза (Ness et al., 2001).

При изучении репродуктивной способности у 138 женщин, больных хроническим мочеполовым хламидиозом и микоплазмозом, Мавров и соавторы (2002) установили, что бесплодие было у 19% больных, а невынашивание и другая патология беременности и плода имелись в анамнезе у 8% больных. Таким образом, репродуктивные нарушения наблюдались у 27% женщин с восходящей хламидийной инфекцией. Среди бесплодных женщин, больных хламидиозом и микоплазмозом, первичное бесплодие было у 31%, а вторичное – у 69% пациенток. Высокая частота вторичного бесплодия у больных активной мочеполовой инфекцией отражает преимущественное действие факторов, связанных с воспалительными процессами в органах репродукции. Наиболее частым клиническим проявлением хламидиоза у бесплодных

женщин был хронический сальпингит (у 57%). Это заболевание привело к трубэктомии у 15% больных и вызвало непроходимость маточных труб у 42%. Трубный фактор был причиной бесплодия у 88% стерильных женщин с хламидиозом. В целом, среди больных мочеполовой инфекцией непроходимость маточных труб имела место у 17% больных. Расстройства овуляции и недостаточность лютеиновой фазы менструального цикла наблюдались у 8% больных. Этот фактор явился причиной бесплодия у 42% бесплодных женщин. В большинстве случаев (73%) наличие эндокринного фактора в генезе бесплодия сочеталось с трубным фактором. Длительный воспалительный процесс в половых органах, связанный с хламидийной и микоплазменной инфекцией, приводит не только к нарушению проходимости маточных труб, но и вызывает вторичные расстройства овуляторной функции (Мавров и соавт., 2002).

Хотя больные бесплодием часто не предъявляют жалоб со стороны мочеполовой сферы, при объективном обследовании воспалительные проявления в области гениталий были выявлены у 13,5% женщин и у 5% мужчин. У 10% пар воспалительные проявления имели место у жены и отсутствовали у мужа. Признаки воспаления мочеполовых органов только у мужа наблюдались у 2% пар. При бесплодном браке воспалительные заболевания мочеполовых органов чаще имели место у жен, чем у мужей (Мавров, 1994, 1996, Мавров и соавт. 2002). Воспалительные проявления хотя бы у одного из супругов, живущих в бесплодном браке и не предъявлявших субъективных жалоб, наблюдались у 16% пар. В большинстве случаев (73,3%) они были обусловлены хламидийной инфекцией. В то же время более чем у половины бесплодных пар (61%), инфицированных хламидиями, воспалительные проявления со стороны мочеполовых органов отсутствовали. При изучении связи причинных факторов бесплодного брака с мочеполовой инфекцией выявлена корреляция между хламидиозом и трубным бесплодием (Мавров и соавт., 2002). Среди инфицированных хламидиями бесплодных женщин трубное бесплодие наблюдалось у 67%, а среди тех, у которых хламидии не были обнаружены, – у 29%. Распределение факторов бесплодия у инфицированных супружеских пар указывает на причинно-следственную связь трубного бесплодия с хламидийной инфекцией. Другие формы женского бесплодия, а также мужское бесплодие не были столь очевидно связаны с хламидиозом и микоплазмозом, хотя и встречались в парах с мочеполовой инфекцией (Мавров, 1994; 1996; Мавров и соавт., 2002).

### **Мужское бесплодие**

Острая инфекция мужских половых органов является общепризнанной причиной бесплодия. Влияние латентной, хронической инфекции изучено недостаточно (Юнда, Добровольская, 1990). Текущие или перенесенные венерические урогенитальные заболевания у мужчин с патоспермией встречаются до 70% (Михайличенко, 1990). Давно отмечено, что воспалительные заболевания мужских половых органов имеют значение в генезе бесплодия, однако механизмы, приводящие к снижению репродуктивной способности, известны далеко не полностью. Так, патоспермия выявляется у 33-83% больных, а копулятивные расстройства – у 15-28% (Мавров, 2002).

Еще до того, как хламидии были признаны основной причиной негонококкового эпидидимита, ранние исследователи указывали на репродуктивные нарушения при этом заболевании (Ильин, 1977; Порудоминский, 1964; Bowie, 1982; Hendry, Parslow, 1982; Nilsson, Obrant, 1968). Мавров (1985), Ильин (1990) писали о нарушениях фертильных свойств эякулята у больных мочеполовым хламидиозом при вовлечении предстательной железы, семенных пузырьков



и придатков яичек. В одном исследовании из 115 бесплодных мужчин с остаточными явлениями хронического эпидидимита урогенитальный хламидиоз был выявлен у 74 (64%). В контрольной группе из 15 фертильных мужчин хламидиоз был выявлен только у одного. При исследовании эякулята констатирована астеноспермия и олигозооспермия. Результаты гистологического исследования показали выраженную степень дистрофии сперматогенного эпителия у некоторых больных (Жила, Кравченко, 1990). О роли хламидийной инфекции в развитии бесплодия у мужчин сообщили Таринский и Фалеев (1989), обследовавшие 130 мужчин, живущих в бесплодном браке. Хронический простатит считается многими андрологами наиболее частой причиной нарушений репродуктивной функции у мужчин (Тиктинский, Новиков, 1985; Ткачук, Горбачев, 1989; Юнда, 1987).

Наиболее очевидный механизм воздействия *C. trachomatis* на мужскую фертильность – последствия хламидийного эпидидимита (Мавров, 1994). Согласно некоторым наблюдениям, двусторонний эпидидимит ведет к бесплодию в 40%, а односторонний – в 23% случаев (Berger, 1990). Ludwig и Haselberger (1977) длительное время наблюдали 47 больных, перенесших односторонний эпидидимит. У 2/3 больных лишь вначале была преходящая олигозооспермия, а у 1/3 – изменения в эякуляте были стойкими (Ludwig, Haselberger, 1977). Упомянутые авторы не принимали в расчет хламидийную инфекцию как причину эпидидимита, хотя Нерар еще в 1975 году писал о хламидийной этиологии эпидидимита. Имеется несколько сообщений о выявлении значительно более высоких титров антител к хламидиям у бесплодных мужчин, по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (Nikkanen, Terho, 1980). Fowler (1981) в своей обзорной статье, касающейся вопроса хламидийной инфекции и мужского бесплодия, призвал к дальнейшим исследованиям в этой области.

Позже была показана коррелятивная связь между текущей урогенитальной инфекцией и патологическими изменениями эякулята (Witkin, Toth, 1983). Другие авторы сообщили о высоких титрах антиспермальных антител у мужчин с уретритом, по сравнению с контрольной группой здоровых лиц (Shahmanesh, Stedronska, 1986). Hellstrom et al. (1987) не смогли найти значимой разницы между мужчинами с патоспермией и нормоспермией в частоте выявления серологических признаков хламидийной инфекции. В другом случае были обследованы 270 бесплодных мужчин. Антитела к хламидиям в сыворотке крови были выявлены лишь у 16 (6%). Спермагглютинирующие антитела были обнаружены у 8 из 16 (50%) мужчин с признаками хламидиоза и только у 41 из 149 (16%) мужчин – без таковых (Close, Wang, 1987). В данном исследовании частота выявления антител к хламидиям у бесплодных мужчин была низка. Тем не менее авторы заключают, что хламидийная инфекция способствует образованию АСАТ. В одной работе сравнивали 120 бесплодных и 120 фертильных мужчин и не выявили коррелятивной зависимости между серологическими показателями хламидиоза и бесплодием (Gregoriu, Vitoratos, 1989). Krauss и Weidner (1989) также пришли к выводу, что хламидийная инфекция не играет существенной роли в генезе мужского бесплодия (Krauss, Weidner, 1989). К аналогичным выводам пришли и другие исследователи, хотя и признавали, что в острой фазе урогенитальной инфекции мужская фертильность может ослабевать (Ruijs, Kauer, 1990). Soffer et al. (1990) обследовали 175 бесплодных мужчин без клинических признаков урогенитальных инфекций, сперма которых дала отрицательный или сомнительный результат в посткоитальном тесте. Наличие у них хламидийной или микоплазменной инфекции не влияло на качества эякулята и функции придаточных половых желез. Однако антиспермальные аутоантитела в семенной плазме у мужчин с бессимптомной инфекцией выявлялись чаще.

Авторы считают, что местный иммунный ответ на хламидии может снизить оплодотворяющую способность эякулята из-за перекрестной реакции местных антител. Eggert-Kruse et al. (1990) обследовали большую группу мужчин ( $n=491$ ) из семей, где брак был бесплодным. Все мужчины не имели симптомов урогенитальных инфекций. Авторы не выявили связи между IgG-антителами к *C. trachomatis* в сыворотке крови, такими показателями, как спермограмма, посткоитальный тест, тест *in vitro* на проникновение сперматозоонов в цервикальную слизь и местными циркулирующими IgG- и IgA-аутоантителами к сперматозоонам. Однако в парах, где были антитела к хламидиям у мужчины, вероятность наступления беременности в дальнейшем была ниже. В таких семьях у жен значительно чаще имелся трубный фактор бесплодия. Другая группа исследователей обследовала 209 бесплодных мужчин на хламидиоз. Антитела к *C. trachomatis* обнаружены у 15,4% этих мужчин и, хотя они не предъявляли жалоб и не имели объективных признаков воспаления урогенитального тракта, тест на эластазу полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) в семенной плазме показал, что у них имеется хроническое субклиническое воспаление, связанное с небольшим количеством персистирующего возбудителя. Характерно, что у больных с признаками хламидиоза уровень лимонной кислоты в эякуляте был ниже, что косвенно указывало на вялотекущий хронический везикулит (Wolff, Neubert, 1991).

При критическом анализе ранних работ видно, что они используют серологические критерии (антитела) в качестве маркеров хламидийной инфекции. Однако известно, что у мужчин хламидии могут не вызывать системного гуморального ответа (Theharnе, 1983). Кроме того, на результаты серологического обследования может оказать влияние сероположительный «фон» в связи с перекрестными реакциями антител, направленных к другим представителям *Chlamydiales*, в частности *Chlamydothyla pneumonia* (Wang, Grayston, 1990).

Наличие такой связи между урогенитальным хламидиозом и мужским бесплодием подтверждается клиническими, морфологическими и эпидемиологическими исследованиями последних лет (Ness et al., 1997). При хламидийном уретрите в сперме мужчин увеличивается количество лейкоцитов и появляются антитела к хламидиям, что может приводить к аутоиммунному ответу к сперматозоонам и развитию иммунологического бесплодия (Witkin et al., 1995; Ochsendorf et al., 1999). На примере генитальной инфекции, вызванной *Ureaplasma urealyticum*, было показано, что при лейкоспермии увеличивается количество супероксидных радикалов, которые повреждают сперматозооны путем перекисного окисления липидов мембран (Potts et al., 2000). Сперматозооны могут повреждаться также протеолитическими ферментами, которые являются компонентом воспалительного процесса. Подвижность половых клеток снижается, и он не в состоянии преодолеть лучистый венец яйцеклетки, что было показано в пенетрационном тесте *in vitro* (Wolff, 1995). Персистентная инфекция *C. trachomatis* в предстательной железе и в придатках яичек может быть источником воспалительных цитокинов, которые попадают в эякулят. Однако не все авторы разделяют мнение о непосредственном влиянии хламидиоза на мужскую фертильность (Haberman, Krause, 1999; Ochsendorf et al., 1999). При обследовании 123 мужчин Мавров и соавторы (2002) показали, что хламидийная и микоплазменная инфекции воздействовали на мужскую фертильность двояко. С одной стороны, они вызывали повреждения сперматозоонов, нарушая их двигательную и пенетрирующую способность, а с другой – меняли состав семенной плазмы в результате нарушения функций придаточных половых желез. Установлено, что активно и длительно протекающая хламидийная и уреоплазменная инфекции

вызывают патоспермию у 20% больных. Чаще наблюдается экскреторно-токсическая форма снижения мужской фертильности, для которой характерны увеличения pH, вязкости эякулята и снижение подвижности (19%). Реже происходит уменьшение количества половых клеток в эякуляте (у 14%) и увеличение процента патологических форм (у 13%). Нарушение репродуктивной функции у мужчин при хламидиозе и микоплазмозе коррелирует с длительностью и тяжестью заболевания и вовлечением в патологический процесс предстательной железы, семенных пузырьков и придатков яичек. Снижение фертильности эякулята чаще имеет место при смешанной хламидийно-микоплазменной инфекции (у 33%), чем при хламидиозе и микоплазмозе как моноинфекциях (Мавров и соавт., 2002).

### Урогенитальные хламидиозы и беременность

Рассмотренные выше формы проявления урогенитальных хламидиозов у женщин указывают на потенциальную роль хламидий как патогенных агентов при патологии беременности. Данные об инфицировании хламидиями канала шейки матки у 5-12% беременных женщин подтверждают потенциальную роль хламидийной инфекции в появлении различных форм патологии беременности, в том числе внематочной беременности, преждевременных родов и, возможно, аномалий внутриутробного развития плода. Были проведены исследования хламидийной инфекции у матери и плода как единой биологической системы. Изучались возможности дородовой диагностики внутриутробного инфицирования плода хламидиями (Башмакова и соавт., 1990; Мавров и соавт., 1999). При выяснении акушерско-гинекологического анамнеза у пациенток, больных урогенитальным хламидиозом, была выявлена патология беременности и плода. У них наблюдалось невынашивание беременности, рождение мертвого плода в 7% случаев, а также недоношенность и неонатальная смерть (4%). Показано, что хламидийная инфекция не только непосредственно поражает репродуктивные органы, но и нарушает функции жизнеобеспечения плода. У беременных с неотягощенным гинекологическим и акушерским анамнезом хламидийная инфекция выявлена у 6,4%. У беременных с отягощенным гинекологическим и акушерским анамнезом инфицирование хламидиями канала шейки матки выявлено в 37,2%. Анализ течения и исход беременности у женщин с хламидийной инфекцией показал, что у 53% отмечен патологический исход беременности. В другом исследовании в родах и послеродовом периоде, у 30,6% рожениц и родильниц с предшествующими воспалительными заболеваниями тазовых органов были обнаружены хламидии (Мавров и соавт., 1999). Анализ родового акта у таких женщин показал, что лишь у 28,5% роды протекали без осложнений. Наиболее частыми осложнениями в родах была слабость родовой деятельности (у 22,2%), несвоевременное излитие околоплодных вод (у 19%), дефект отделения послеродового лоchia (у 11%), внутриутробная асфиксия плода (у 15,9%), лихорадочное состояние (у 8%). Мавров и соавторы (2000) выявили инфицирование хламидиями шейки матки у 38,2% беременных женщин с воспалительными заболеваниями мочеполовых органов и у 6,4% – без акушерско-гинекологических осложнений. Кутюва и Черепова (1999), в результате исследования околоплодных вод больных хламидиозом беременных, в 10 случаях из 32 выделили *C. trachomatis*. Таким образом, 31,2% плодов были инфицированы хламидиями внутриутробно. Błaszczyk et al (1997) обследовали 52 беременных женщин, получавших лечение по поводу угрозы выкидыша. У 18 (34,6%) из них обнаружили антитела к хламидиям. Преждевременный разрыв околоплодных оболочек произошел у 19,2% пациенток с положительными результатами обследования на *C. trachomatis*.

#### 12.1.4. Урогенитальные хламидиозы и копулятивная функция

##### Половые расстройства у мужчин

Было изучено состояние копулятивной функции у 123 мужчин, больных хроническим активным хламидиозом и микоплазмозом (Мавров, 2002). Половые расстройства выявлены у 20% мужчин с хламидиозом. Наиболее часто встречалась ускоренная эякуляция (у 17%). Невротические проявления наблюдались у 19% больных. Вероятность развития полового расстройства при тяжелом и длительном течении заболевания была выше. Большинство больных хроническим хламидиозом, имевших сексуальные нарушения, соматически и психически ослаблены. Патогенез ускоренной эякуляции, развивающейся в результате хронической мочеполовой инфекции, связан с поражением предстательной железы и семенного бугорка. Образовавшийся застойно-воспалительный очаг вызывает патологическую нервную импульсацию и способствует формированию вегетативного невроза, при котором нервные центры, обеспечивающие эякуляцию, снижали свой порог возбудимости. Поражение эрекции составляющей копулятивного цикла наблюдалось у 5% больных (Мавров, 2002).

##### Половые расстройства у женщин

Данные, полученные при изучении половой функции у 138 женщин, показали, что длительно протекающий, активный мочеполовой хламидиоз вызывает половые расстройства у 45% больных, а уреоплазмоз – у 35% больных. Частота и выраженность копулятивных нарушений зависела от тяжести и длительности патологического процесса в половых органах. Наиболее характерными были гипооргазмия, снижение либидо и невротические симптомы (Мавров, 2002). Менструальная функция была нарушена у 8% женщин, что не превышало известных из литературы данных для среднестатистической популяции (Сметник, Тумилович, 1995). Нарушения менструального цикла укладывались в клиническую картину дисфункциональных маточных кровотечений, которые возникли вторично и были хронологически связаны с мочеполовой инфекцией.

Либидо у женщин при хламидиозе и микоплазмозе снижается в 30% случаев, что связано с тормозным процессом в коре головного мозга в ответ на патологическую нервную импульсацию из воспалительных очагов, а также с изменениями гормонального фона. Боль и другие неприятные ощущения в области гениталий приводят к частичной дезактуализации полового чувства. Среди обследованных женщин гипо- и аноргазмия встречались у 46%. Большинство нарушений оргазма носит вторичный характер и возникает после начала заболевания. В результате длительного, упорного воспалительного процесса происходит поражение генитосегментарной составляющей копулятивного цикла, что ведет к дезориентации взаимодействия между нервными центрами и органами-мишенями, обеспечивающими оргазм. Невротические симптомы наблюдаются у 45% женщин, больных хроническим хламидиозом и микоплазмозом. Преобладают неврастеноподобные синдромы с элементами истерии (Мавров, 2002).

#### 12.1.5. Смешанные урогенитальные инфекции

Нижние отделы мочеполовой системы, соприкасающиеся с внешней средой, являются входными воротами для многих микроорганизмов, различающихся по своей природе и патогенным свойствам. При инфекциях, передающихся половым путем, у половых партнеров



постоянно происходит обмен микрофлорой и смешанное (сочетанное, ассоциированное) инфицирование. Наибольшее значение при этом имеет сочетанное инфицирование, в котором принимают участие патогенные микроорганизмы, и тот суммарный результат, который будет проявлять данная ассоциация при своем взаимодействии (синергизм, антагонизм или независимое сосуществование). При наличии одного и отсутствии других (известных) патогенных агентов, обычно определяется соответствующая условная моноинфекция.

*C. trachomatis* не является представителем нормальной флоры мочеполовой системы, она не способна длительно сохранять свою жизнедеятельность на поверхности слизистой оболочки. Прямые или косвенные доказательства присутствия этого патогенного внутриклеточного паразита четко указывают на наличие хламидийного инфекционного процесса, сопровождающегося размножением возбудителя и соответствующими реакциями организма. В соответствии с установленным порядком лабораторного обследования больных с воспалительными заболеваниями мочеполовых органов, передающимися половым путем, первые данные о смешанных урогенитальных инфекциях хламидийной и иной природы были получены при выявлении хламидий у больных гонореей, трихомонозом и кандидозом.

Согласно наблюдениям венерологов, гонококково-хламидийная инфекция мужского мочеиспускательного канала устанавливается у 9-34% больных с первичным диагнозом гонореи (Бондаренко, 1996; Mavrov, Bondarenko, 1996). Совместное инфицирование гонококками и хламидиями выявляли у 23% половых партнеров женщин, больных гонореей, а также у 4,2 и 4,7% профилактически обследовавшихся мужчин и женщин, считавших себя здоровыми (Thelin et al., 1980). У мужчин значительно реже обнаруживали хламидийно-кандидозное и хламидийно-трихомонадное поражение мочеиспускательного канала.

Смешанная гонококково-хламидийная инфекция у женщин определяется у 19-62% обследованных (Агуа et al., 1981, Бондаренко, 1998). Сочетанная хламидийно-трихомонадная инфекция выявлялась при трихомонозе у 13-35%, а хламидийно-кандидозная (при первичном диагностировании кандидоза) – у 9-19% пациенток венерологических учреждений. Средняя частота смешанной инфекции шейки матки, обуславливаемая различными сочетаниями этих возбудителей, составляет не менее 12,5%. По данным Агуа и соавторов (1981), сочетанное инфицирование мочеполовых органов у женщин различными патогенными микроорганизмами при отсутствии *N. gonorrhoeae*, выявляется в 15% случаев цервицита и уретрита.

Хламидийная инфекция развивается, как правило, на фоне микрофлоры мочеполовых органов. В ее составе, помимо выраженных комменсалов, нередко определяются и микроорганизмы, способные к проявлению патогенного действия (Никитенко, 2002). Частота сочетаемости *C. trachomatis* с другими представителями аэробной и анаэробной флоры обычно находилась в соответствии с частотой обнаружения тех же сопутствующих микроорганизмов при воспалительных процессах другой этиологии. Однако было отмечено, что при хламидийном уретрите значительно реже определяется заражение мочеиспускательного канала рядом представителей аэробов (пигментные стафилококки,  $\alpha$ -гемолитические стрептококки, *Haemophilus vaginalis* и др.) и анаэробов (преимущественно *Bacteroides spp.*).

Условнопатогенные микроорганизмы являются одним из факторов, осложняющих течение хламидийной инфекции. Нередко именно они, а не хламидии, становятся непосредственной причиной воспалительных заболеваний мочеполовых органов человека. Этиология воспалительных заболеваний урогенитального тракта, вызванных условнопатогенными

микроорганизмами, в значительной степени определяется микробным биотопом пораженного органа или ткани. Так, воспалительные процессы уrogenитального тракта преимущественно связаны со стафилококком, грам-отрицательными аэробными бактериями и неспорообразующими анаэробами, колонизирующими эти органы. Важную роль при этом играет степень колонизации. Причинами активации условнопатогенной микрофлоры и последующего развития воспалительного процесса могут служить применение антибактериальных препаратов, нарушающих естественные взаимоотношения в микроценозе слизистой, а также снижение общего и местного иммунитета, изменение гормонального статуса (Никитенко, 2002). Этиологическая структура воспалительных заболеваний мочеполовых органов отличается динамичностью: возбудители этих процессов меняются в зависимости от разных факторов. Большое значение имеет антибактериальная терапия. Под действием антибиотиков чувствительные к ним виды уступают место более устойчивым. Так, с появлением антибиотиков, активных в отношении пенициллиноустойчивых штаммов, стафилококки в определенной мере утратили свое доминирующее значение в инфекционной патологии, уступив место грамотрицательным бактериям и неспорообразующим анаэробам, более устойчивым к широко применяемым в лечебной практике антибиотикам.

Шаповалова и соавторы (2003), с целью изучения микробного пейзажа мочеполовых органов у больных с воспалительными заболеваниями мочеполовых органов, провели развернутые бактериологические исследования у 1661 больного с урогенитальной патологией (957 мужчин и 704 женщины). Было выделено 1243 штамма условнопатогенных микроорганизмов в монокультуре (74,8% от общего числа обследованных). Наиболее часто у больных выделяли стафилококки (54,95%). Подавляющее большинство стафилококков идентифицировали как коагулазоотрицательные (*S. epidermidis* – 49,34%, *S. saprophyticus* – 44,34%). *S. aureus* встречался у 5,97% больных, а другие виды стафилококков (*S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. cohnii*) высевали только в 1,33% случаев. Среди грамотрицательных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных от больных, наибольший удельный вес приходился на *E. aerogenes* (20,83%) и *Proteus (vulgaris и mirabilis)* – 15,27%). Бактерии рода *Serratia* встречались у 4,16%, *E. cloacae* – у 4,83%, *Citrobacter* – у 2,07%, *Hafnia*, *Klebsiella* и *E. coli* – по 0,69% обследованных. Грамотрицательные неферментирующие палочки были представлены *P. aeruginosa* (4,14%). Кроме того, от 387 больных (23,29%) были выделены ассоциации двух микроорганизмов. Микробные ассоциации, включающие 3 микроорганизма, были определены у 1,88% обследованных (Шаповалова и соавт., 2003).

При урогенитальных хламидиозах могут быть выявлены и другие представители *Staphylococcus*, в том числе *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus spp. (B)*, *Escherichia coli*, являющихся в ряде случаев самостоятельными возбудителями воспалительных процессов в мочеполовых органах, а также *Acinetobacter calcoaceticus, var. anitratum* — грамотрицательная бактерия, обладающая антигенным родством с хламидиями. При урогенитальных и экстрагенитальных хламидиозах нередко наблюдают случаи сочетанного инфицирования хламидиями и агентами вирусной природы, в первую очередь цитомегаловирусом, а также энтеровирусами, аденовирусами, вирусом герпеса простого (Мавров и соавт, 1997; Мавров, 1998).

Хламидийной урогенитальной инфекции нередко сопутствует наличие микоплазм в мочеиспускательном канале, шейке матки и, реже, при восходящем процессе – в маточных трубах и брюшной полости.

*U. urealyticum* выявлялась в 42-52% случаев хламидийного уретрита у мужчин и в 39% случаев хламидийного цервицита (Шаткин, Мавров, 1983; Мавров, 1994; Мавров, 2002). Ассоциация *U. urealyticum* с *C. trachomatis* может оказаться небезразличной к организму больного. Подобное предположение правомерно и в отношении *Mycoplasma hominis*, нередко обитающей в мочеполовых органах и выявлявшейся в 5,8% случаев хламидийного цервицита, а также у 15% мужчин, больных НГУ неизвестной этиологии (Тэйлор-Робинсон, 1995; Козлюк и соавт., 2002).

При рассмотрении этиологической структуры смешанной хламидийной инфекции следует также учитывать, что при мочевых, желудочно-кишечных и генерализованных инфекциях различной природы мочевые пути и прямая кишка являются источником разнообразных патогенных микроорганизмов, которые, выделяясь с мочой и калом, могут инфицировать мочеполовые органы. Наибольшее значение для современной венерологической, а также гинекологической практики имеет смешанная хламидийная инфекция, возникающая при совместном инфицировании урогениталий хламидиями и другими наиболее распространенными патогенными агентами, передающимися половым путем (*N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *C. albicans*).

Анализ литературных данных и собственных наблюдений позволяет сделать заключение, что хламидийная урогенитальная инфекция чаще всего бывает смешанной – с различными комбинациями сопутствующих микроорганизмов, обладающих разной степенью патогенности. Хламидийная моноинфекция возникает у людей, имеющих, как правило, упорядоченную половую жизнь и инфицирующихся в результате случайного полового контакта. При отсутствии других патогенных микроорганизмов эта инфекция в среднем наблюдается у 30% больных, но варьирует в различных группах популяции. При изучении смешанных инфекций важно не только устанавливать частоту сочетанного инфицирования мочеполовых органов *C. trachomatis* и другими микроорганизмами, но также и выявлять характер взаимодействия этих агентов, которое может оказывать влияние на развитие, течение и последствия заболевания и определять соответствующие научно обоснованные меры терапии и профилактики. Раскрытие такого взаимодействия является сложной проблемой, связанной с различной природой сочетающихся микроорганизмов, требующей специальных методических разработок для осуществления экспериментального моделирования.

Наибольшую опасность представляет смешанная хламидийно-трихомонадная инфекция, которая редко диагностируется, маскируясь под диагнозом хламидиоза или трихомониаза, а также смешанные инфекции множественной этиологии. При изучении взаимодействия *C. trachomatis* и *T. vaginalis* был установлен характер взаимоотношений между этими микроорганизмами. Хламидии после поглощения трихомонадами не размножаются в организме хозяина и, претерпевая структурные изменения, быстро теряют свою жизнеспособность. Одновременно выявляются дегенеративные изменения и у трихомонад, что указывает на непродуктивность рассмотренного симбиоза *in vitro*, которая может быть и при естественной инфекции (Мавров, Шаткин, 1983; Мавров, 2002).

*C. trachomatis* является главным этиологическим агентом постгонорейного уретрита (ПГУ) у мужчин и в 50-80% случаев определяет этиологию этой формы инфекции. *C. trachomatis* является также и частым возбудителем постгонорейных воспалительных заболеваний мочеполовых органов у женщин, определяя их этиологию (по данным Vaughan-Jackson и соавторов, 1977) в 53% случаев (Мавров, 2002). Гонорея и урогенитальная хламидийная инфекция обладают сходством эпидемиологических характеристик. Гонорея имеет более

короткий инкубационный период и при манифестном проявлении, в противоположность хламидийной инфекции, подвергается этиологической диагностике практической лабораторной службой венерологических учреждений и соответствующей терапии, преимущественно пенициллином или его производными. Эти обстоятельства во многом и определяют сущность и механизмы развития постгонорейных воспалительных процессов хламидийной этиологии при наиболее частом одномоментном инфицировании мочеполовых органов гонококками и хламидиями. У больных смешанной инфекцией под влиянием пенициллинотерапии (при чувствительности инфицирующего штамма гонококка) наступает гибель гонококков, сопровождающаяся исчезновением клинических симптомов заболевания. Пенициллин не обладает инактивирующим действием на хламидии, он лишь ингибирует их размножение на определенных стадиях цикла развития. Под влиянием даже минимальных доз пенициллина, не превышающих концентрацию антибиотика в клетках слизистой оболочки мочеполовых путей при обычном лечении гонореи, наступает трансформация хламидий в персистентные формы (Мавров, 2002). После прекращения действия антибиотика происходит реверсия трансформированного микроорганизма в исходные инфекционные формы, которые продолжают свой цикл развития и проявляют свое патогенное действие.

ПГУ хламидийной этиологии у мужчин имеет те же клинические проявления, которые наблюдаются и при ПГУ другой этиологии. Больные обычно отмечают скудные выделения из мочеиспускательного канала, иногда легкий зуд в нем, реже незначительную боль в области промежности, мошонки, паховой области. Наружное отверстие канала нередко слегка гиперемировано, пастозно, края слипаются. Моча первой и второй порции чаще с примесью слизистых и слизисто-гнояных нитей. При отсутствии необходимой терапии течение болезни может принимать длительный волнообразный характер. Иногда наблюдаются рецидивы. В последних случаях, кроме уретрита, нередко возникают простатит, везикулит, эпидидимит. Реже ПГУ с самого начала протекает в виде острого или подострого воспалительного процесса с выраженными симптомами (Мавров, 2002).

### 12.1.6. Урогенитальный хламидиоз и рак

Хламидийная инфекция, как одна из возможных причин злокачественного перерождения, упоминается в научной литературе с 1936 года, когда был описан рак у больного венерической лимфогранулемой (Schachter, 1978). Связь между хламидиозом и раком может быть объяснена с биологических позиций, поскольку известно, что хронические инфекции способствуют возникновению опухолей путем влияния на хромосомы. Это было показано на примере шистосомоза и герпеса (Rosin et al., 1994; Лебединская, 2002).

#### Цервикальный рак

Рак шейки матки – один из трех наиболее часто встречающихся злокачественных новообразований у женщин. В мире в 1998 году зарегистрировано 400000 случаев, из них 12800 в США (Zenilman, 2001). Курение и онкогенные типы вируса папилломы человека (ВПЧ) являются одним из наиболее значимых факторов риска рака шейки матки (Wallin, et al. 1999; Josefsson et al. 2000). Однако только инфекцией ВПЧ невозможно объяснить эпидемиологию этой формы рака. Важную роль играют различные кофакторы, в том числе и генитальная инфекция, вызванная *C. trachomatis*. Предположение о связи между урогенитальным



хламидиозом и раком шейки матки впервые было высказано Schachter и соавторами (1982) на основе сероэпидемиологических исследований. В то время роль ВПЧ и ряда поведенческих факторов в возникновении рака шейки матки еще не была установлена. Позднее Koutsky и соавторами (1992) было обнаружено, что цервикальная интраэпителиальная неоплазия, независимо от ВПЧ статуса, связана с серологическими признаками генитальной хламидийной, гонококковой и цитомегаловирусной инфекции. Затем Lehtinen и соавторы (1996) установили, что если инфекции ВПЧ предшествует хламидийная инфекция, то риск возникновения рака шейки матки возрастает. Связь между хламидиозом и раком установлена в сравнительном исследовании 183 женщин с раком шейки матки и 293 здоровых женщин на Тайване (Hsieh et al., 1999). Однако ряд исследований в Гондурасе, США, Колумбии и Испании не подтвердили зависимости между инфекциями, передающимися половым путем (включая хламидий), и раком шейки матки (Zenilman, 2001). Finap и соавторы (2002), а также Tamim и соавторы (2002) показали, что хламидийная и папилломовирусная инфекции являются предрасполагающими факторами в возникновении рака шейки матки. Роль хламидиоза заключается в генерации хронического воспаления и раздражения иммунной системы.

Обширное сероэпидемиологическое исследование было проведено в Финляндии, Норвегии и Швеции. 530 000 женщин, чьи сыворотки, взятые в период 1973-1994 гг., хранились в банке сывороток, были прослежены на предмет возможного развития в дальнейшем рака шейки матки (Hakama et al., 2000; Anttila et al., 2001). У 128 женщин развился плоскоклеточный рак через 12-56 месяцев после того, как они сдали кровь. Для каждого из этих случаев были выбраны три контрольные сыворотки женщин, сходных по социальным и демографическим показателям, и были определены антитела к 10 различным серотипам *C. trachomatis* и онкогенным типам ВПЧ. Было также проведено определение котинина в сыворотке, как маркера курения. С помощью многофакторного анализа было показано, что антитела к серотипу G наиболее сильно были связаны с цервикальным раком (OR =6,6). Серотипы I и D также были связаны с раком. Наличие антител к нескольким серотипам увеличивало вероятность возникновения рака шейки матки. Reesinck-Peters и соавторы (2001) не нашли зависимости между степенью выраженности цервикальной неоплазии шейки матки и наличием антител к *C. trachomatis*.

В северных штатах Мексики смертность от рака шейки матки весьма высока. Guilano и соавторы (2001) провели сравнительное исследование 2436 женщин в соседних штатах Сонора (Мексика) и Аризона (США). По мексиканской стороне границы атипичные цервикальные клетки были обнаружены у 11,4%, а по американской – у 6,6%. Различия в распространении ВПЧ между штатами не были значительны. Инфекция *C. trachomatis* чаще встречалась в Мексике. Связь между раком шейки матки и *C. trachomatis* среди ВИЧ-позитивных женщин была подтверждена в результате больших исследований в Бразилии и на Филиппинах (Smith et al., 2002). В Швеции Wallin и соавторы (2002) провели популяционное исследование за 26-летний период, определив ДНК в ВПЧ и *C. trachomatis* в биоптатах у 118 женщин и 118 контрольных лиц, сходных по возрасту. У больных раком ДНК хламидий была обнаружена в 8%, а в контрольной группе – 0%. Риск развития цервикального рака у женщин с ДНК папилломовируса и хламидий – 17,1%. Причем хламидийная инфекция обнаруживалась у больных задолго до возникновения рака, а папилломовирусная – непосредственно перед заболеванием. Авторы заключили, что цервикальная инфекция *C. trachomatis* связана с последующим риском возникновения рака у женщин с предрасполагающими факторами.

Механизм, который способствует злокачественному перерождению клеток цервикального эпителия при хламидийной инфекции, связан с хроническим воспалением. Предполагается, что свободные кислородные радикалы воспалительных клеток могут повредить репарационные механизмы ДНК, тогда как воспалительные цитокины могут ослабить местный иммунологический надзор за атипичными клетками в шейке матки (Quirk, Kupinski, 2001). При инфицировании клеток HeLa, которые являются опухолевыми клетками человеческого эпителия, *S. trachomatis* вызывает разрыв N-кадгерина ( $\beta$ -катениновых межклеточных сочленений). Это может нарушить восприимчивость клеток эпителия к регуляторам клеточного цикла и вызвать их нерегулируемое размножение, что наблюдается при злокачественном перерождении (Prozialek et al., 2002).

Примечательно, что связь между урогенитальным хламидиозом и раком шейки матки прослеживается только в случае плоскоклеточной карциномы и отсутствует при аденокарциноме (Koskela et al., 2000). Это не совсем укладывается в представления о патогенезе генитальной хламидийной инфекции, поскольку мишенью для *S. trachomatis* служат именно эндоцервикальные гранулярные клетки. Однако известно, что хламидии размножаются также в метаплазированных клетках цервикальной эктопии. Хроническая хламидийная инфекция сама считается одной из причин сквамозной метаплазии цервикального эпителия (Kiviat et al. 1985; Paavonen et al. 1988).

### Овариальный рак

Рак яичника – одна из важнейших проблем онкогинекологии. Связь между серологическими маркерами хламидиоза и раком яичников не доказана в специальных эпидемиологических исследованиях (Vjorge et al. 1997). Причины этой формы рака не установлены. Известно, что непрерывные овуляции и высокая концентрация гонадотропина увеличивают вероятность овариокарциномы, а беременность, лактация и пероральные контрацептивы снижают риск её возникновения. Гормональное лечение бесплодия и подготовка к экстракорпоральному оплодотворению могут способствовать возникновению рака яичников, что было показано на больших популяционных исследованиях (Franceschi et al. 1994; Mosgaard et al. 1997; Modan et al. 1998; Venn et al. 1999). Наличие хламидийной инфекции, как признанной причины сальпингоофорита, может объяснить связь между бесплодием и овариальным раком. Гипотетическая схема представлена на рис. 12.1.

При хламидийном сальпингоофорите наблюдается повышенное содержание опухолевых маркеров СА-125 (cancer associated tumor marker) и ТАТИ (tumor associated trypsin inhibitor). Присутствие этих маркеров отражает повреждение тканей яичника и разрыв базальной мембраны овариального эпителия (Paavonen, 2001).

Bosch и Cardis (1990) изучали корреляционные связи различных видов рака и показали, что рак яичников и шейки матки имеют общие факторы риска. Исследования, которые бы изучали присутствие ДНК *S. trachomatis* и ВПЧ в доброкачественных и злокачественных опухолях яичника, не проводились. Известно, что при хламидийном сальпингоофорите наблюдается повышенное содержание опухолевых маркеров СА-125 (cancer associated tumor marker) и ТАТИ (tumor associated trypsin inhibitor). Присутствие этих маркеров отражает повреждение тканей яичника и разрыв базальной мембраны овариального эпителия (Paavonen et al. 1989; 1989a). Связь между ВЗОМТ в анамнезе и овариальным раком была показана в исследовании «случай-контроль», проведенном Risch и Howe (1995). С помощью



Рисунок 12.1. Гипотетическая связь между *C. trachomatis* и раком яичников.

многофакторного анализа авторы подсчитали, что примерно 9% всех случаев овариального рака в популяции может быть обусловлено ВЗОМТ. В другом подобном исследовании Parazzini и соавторы (1996) не нашли какой-либо связи между ВЗОМТ и овариальным раком. Эпидемиологические исследования связи между раком яичников и хламидийным сальпингофоритом проблематичны, поскольку во многих случаях сальпингофорит протекает бессимптомно. Поэтому, на основании имеющихся данных, нельзя ни подтвердить, ни опровергнуть наличие такой связи. Течение хронической персистентной хламидийной инфекции сопровождается иммунопатологическим повреждением тканей, которое способствует злокачественной трансформации (Paavonen, Lehtinen, 1994).

Развитие карциномы занимает несколько лет или десятилетий. Связь между хламидийной инфекцией и раком не может быть прямой. Само наличие такой связи пока не доказано. Молекулярные основы влияния хламидий на рак неизвестны. Некоторые компоненты патогенеза хламидийной инфекции могут укладываться в известные механизмы канцерогенеза. Так, неопластические изменения при хламидиозе могут быть результатом повреждающего действия окислов азота или результатом подавления апоптоза в инфицированных клетках (Mayer et al., 1993; Fan et al., 1998).

### 12.1.7. Психосоматические расстройства при урогенитальных хламидиозах

Известный французский венеролог А. Siboulet еще в 1960-х годах писал, что не менее половины больных, перенесших негонорейный неспецифический уретрит, страдает неврозами депрессивного типа или обнаруживает особую склонность к ним (Siboulet, 1966). «Глубоко несчастные женщины, всю свою жизнь посвятившие хроническому аднекситу или циститу, и столь же непоколебимые в своих заблуждениях мужчины, с фанатическим упорством

отстаивающие свое право на хронический уретрит. Они лечатся чаще всего от несуществующих болезней или синдромов, ошибочно истолкованных не только пациентами, но и врачами» (Тополянский, Струковская, 1986).

Это было написано в эпоху, когда этиологическая роль хламидий при воспалительных заболеваниях мочеполового тракта практически не была известна. Тем не менее в настоящее время истинный удельный вес аффективных расстройств при хроническом хламидиозе недооценивается. Стертые депрессии, характеризующиеся чувством собственной неполноценности, утратой прежних интересов и влечений, часто не учитываются венерологами и в статистику психических нарушений не попадают. Между тем диапазон психических нарушений при хроническом уретрите очень широк: от жалоб, не выступающих за рамки астеноневротического синдрома (тревожный сон, снижение работоспособности, повышенная утомляемость и раздражительность) с вегетативно-сосудистыми сдвигами (лабильный пульс, колебания артериального давления, стойкий красный дермографизм) до глубокой депрессии с суицидальными мыслями. От навязчивых и сверхценных мыслей о своем состоянии до бредовых идей.

Известно, что в результате осложнений урогенитального хламидиоза могут возникнуть различные соматические нарушения, причиняющие пациентам значительные страдания. Согласно современным данным, у более 30% больных с соматическими заболеваниями диагностируются клинически очерченные депрессивные состояния, что значительно превышает показатель их распространенности в популяции (Мосолов, 1999). В литературе имеются весьма немногочисленные данные о психопатологических нарушениях у больных с хроническими воспалительными процессами мочеполовой сферы, вызванными хламидиями (Ильин, 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Молочков, Ильин, 1998; Ревунов, 1998; Мавров 2002). У 20-70% больных хроническими мочеполовыми инфекциями различные авторы выявляют ипохондрический, тревожно-депрессивный, фобичный синдромы. Отмечено, что основными психотравмирующими факторами для их развития явились сексуальные нарушения, в том числе бесплодие, семейные конфликты, которые возникали на фоне основного заболевания (Напреенко, Бойко, 2002).

В большинстве случаев психические расстройства при воспалительных заболеваниях органов половой системы формируются по механизму психогении. Причиной развития психогений при урогенитальном хламидиозе является особая значимость для личности болезней половой системы. У большинства пациентов глубокий личностный конфликт обусловлен интимным характером переживаний по поводу негативных последствий болезни – бесплодия и сексуальных расстройств. Для многих психотравмирующим моментом выступает мысль о венерической природе их недуга (Напреенко, Бойко, 2002). Переживания усугубляются психосоциальными факторами – неблагоприятными межличностными отношениями с женой (мужем) или другим сексуальным партнером. Практически у всех таких больных имеется в прошлом трихомонадный, гонорейный или хламидийный уретрит и страх венерического заболевания после случайной половой связи.

Истинный хламидиоз, когда-либо перенесенный этими пациентами, означает наличие в анамнезе сопряженной с ним реактивной депрессии со страхом и тревогой по поводу своего состояния и возможных последствий заболевания. Сам факт заражения хламидиозом для некоторых людей оказывается страшным потрясением. Многие пациенты, перенесшие хламидиоз, сохраняют на протяжении всей последующей жизни определенную готовность



к ипохондрическим представлениям и сверхценным образованиям в урогенитальной сфере, к фиксации малейших ощущений в уретре и половых органах. Особенно большую ипохондрическую готовность обнаруживают при этом больные, которые не обращались в свое время (из страха огласки) к врачам, а лечились самостоятельно или по совету товарищей. Любое, даже ситуационно обусловленное снижение настроения, соматогенная астения или простое переутомление способствуют возникновению или усилению неприятных ощущений в области мочеполовых органов (от периодического покалывания или щекотания по ходу уретры до сильной рези при мочеиспускании).

У мужчин при простатитах, орхоэпидидимитах и других воспалительных заболеваниях мочеполовой сферы выявляются эмоциональная слабость, неустойчивость настроения, повышенная психическая и физическая утомляемость, нарушение сна, вегетососудистые дистонии. В выраженных случаях психогений может наблюдаться слабодушие (недержание эмоций), коитофобия (боязнь полового акта), ухудшение памяти, психалгии (боли, обусловленные не болезненным процессом во внутренних органах, а расстройством восприятия). При этом примерно у 20-30% больных наблюдаются сексуальные расстройства – ускоренная эякуляция, ухудшение адекватных эрекций при сохранности спонтанных эрекций, снижение полового влечения и болезненный оргазм (Мавров, 2002). При дальнейшем развитии психогении появляется подавленное настроение, общая слабость, безынициативность, склонность к ипохондрическим переживаниям. Содержание фобий выходит за пределы сферы интимных отношений и распространяется на всю сферу здоровья. Описанные выше сексуальные расстройства могут осложняться более выраженным снижением либидо, стойким ухудшением как адекватных, так и спонтанных эрекций, стертым (неярким) оргазмом. Психогении и сексуальные расстройства наступают при затяжном, часто рецидивирующем, характере воспалительных заболеваний органов половой системы. Важную роль в развитии подобных осложнений имеют акцентуированные свойства личности – склонность к задержке отрицательных эмоциональных реакций, тревожно-мнительное или депрессивное реагирование на болезнь и связанную с ней жизненную ситуацию.

Механизм развития боли при простатите и простатодинии, когда клинические симптомы простатита не подтверждаются лабораторными данными, обусловлен «уретральной гипертонией». Тревожно-мнительное отношение пациента к заболеванию сопровождается повышением адренергической стимуляции, что, в свою очередь, приводит к высокому максимальному уретральному замыкательному давлению. Это приводит к рефлюксу уретрального содержимого в периферическую зону предстательной железы и к усугублению течения хронического простатита. Таким образом, повышенный тонус адренергических рецепторов, вызванный местными или общими факторами, играет отрицательную роль в патогенезе простатита при инфицировании задней уретры *Chlamydia trachomatis*.

В случаях, когда объектом ипохондрической фиксации является уретра, возможно усиление секреции уретральных желез. Наиболее очевидным клиническим признаком депрессии при этом служит уретроррея – скудные стекловидные выделения в виде слизи с небольшой примесью эпителиальных клеток уретры, а иногда и единичными лейкоцитами. При этом многочисленные исследования различными методами, включая ПЦР и культуру клеток, не обнаруживают хламидии или какие либо другие патогенные возбудители. Иногда объектом фиксации становится нормальная флора уретры, против которой начинают выстраивать мощные схемы антибактериального и иммунотропного лечения. Больные, страдание которых не выходит за

рамки преимущественно аффективной патологии, годами лечатся по поводу «часто рецидивирующего хламидиоза», резистентного ко всем видам терапии.

Неприятные и тягостные ощущения не ограничиваются областью уретры и половых органов. Неопределенные болезненные ощущения возникают и в других органах: «сердце ноет»; «в груди покалывает»; «голову давит»; «суставы и кости ломит»; по позвоночнику «что-то вниз идет»; «в паху тянет»; «в яичках щемит»; в области предстательной железы «словно гиря подвешена» (Тур, 1929; Тополянский, Струковская, 1986). Все эти явления рассматриваются больными как результат ослабления их организма и инвалидизации вследствие хламидиоза. Всецело поглощенные определенными ощущениями, больные других жалоб не предъявляют и консультаций иных специалистов не требуют – они считают, что лечить их необходимо только от хламидиоза.

О наличии у таких больных тревожной депрессии свидетельствуют «навязчивые» (т. е. доминирующие в сознании и не поддающиеся контролю) мысли о своей мужской неполноценности, о тяжести своего состояния и неизлечимости хламидиоза, о потере социального престижа с неизбежным распадом семьи, о бесперспективности и бесцельности дальнейшего своего существования. Несоразмерность отчаяния и страха с объективными симптомами и функциональными расстройствами говорит об аффективной патологии с формированием сверхценных или бредоподобных ипохондрических представлений. Тревога и страх за свое состояние определяют почти каждый шаг, любой поступок этих «хламидийных ипохондриков», поведение которых можно охарактеризовать как «уход в болезнь с отрывом от действительности». Они читают специальную литературу и упорно копаются в своем прошлом в поисках конкретной причины заболевания. Убежденные в его органической природе, они беспрестанно размышляют на эту тему, диагностируя у себя все новые поражения уретры и предстательной железы. Они упорно ходят от врача к врачу с жалобами, характерными для заболеваний урогенитальной сферы, а подчас и разъезжают по всей стране, стремясь найти «настоящего специалиста». Они активно добиваются все новых и новых лабораторных обследований отделяемого уретры, семени и секрета предстательной железы, результатам которых они всегда не доверяют. Они проводят себе бесконечные курсы антибиотиков (вплоть до возникновения генерализованного кандидоза); вызывают у себя травматический уретрит и жалуются во всевозможные инстанции на отсутствие должного внимания к ним и неэффективность применяемой терапии. Занимаясь своими мочеполовыми органами, «они живут, постоянно созерцая свой мочеиспускательный канал», приходят в ужас от реальных или предполагаемых изменений цвета или состава мочи и очень охотно прибегают к инъекциям, катетеризациям, различного рода лекарствам и «советам людей сомнительной компетенции». Жизнь этих «невропатов» становится совершенно невыносимой и для них самих, и для окружающих (Тополянский, Струковская, 1986).

Таким образом, с точки зрения узкого специалиста, расценивающего больного с позиций сугубо органной патологии, можно говорить в этих случаях о клинической картине «неспецифического» уретрита или простатита. При анализе состояния больного в аспекте целостного организма речь идет о более или менее выраженной ипохондрической депрессии (тревожно-депрессивном или депрессивно-параноидном состоянии, специфика которого обусловлена объектом ипохондрической фиксации больного с соответствующими функциональными нарушениями). Депрессивные состояния не просто сопутствуют хламидиозу и далеко не всегда им порождаются. При хламидийном уретропростатите они часто предшествуют развитию последнего и сохраняются по его излечении.

У женщин с хроническим хламидиозом часто наблюдается психогенная цисталгия – заболевание мочевого пузыря, проявляющееся учащенным и болезненным мочеиспусканием при отсутствии пиурии, что собственно и отличает ее от инфекционного цистита. Это заболевание известно давно и нередко наблюдается во врачебной практике. Психогенная цисталгия встречается у 11-21% всех женщин, обращающихся к урологу (Гольдин, 1960). Клиническая картина (учащенное мочеиспускание, тупая боль в пояснично-крестцовой и надлобковой области, постоянное недомогание и повышенная утомляемость) не отличается от острого уретрального синдрома у женщин и хронического уретроцистита.

Известно, что цисталгия может быть следствием хронического воспалительного процесса в мочевом пузыре и других заболеваний урогенитальной сферы, в том числе и хламидийной этиологии. У многих пациентов имеются венерические заболевания в анамнезе (леченная в прошлом гонорея, но невыявленный и нелеченный хламидиоз). Выраженная цисталгия может сохраняться после излечения хламидийной инфекции при полном отсутствии воспалительных процессов в области малого таза, патологических изменений в области половых органов или органического поражения центральной нервной системы. Полное отсутствие пиурии и бактериурии и неизменная слизистая оболочка при цистоскопии у таких женщин исключает возможность вяло протекающего уретрита или остаточных явлений цистита, а данные манометрического исследования указывают на повышенную «раздражительность» мочевого пузыря. В норме емкость мочевого пузыря составляет 300-500 мл, а давление в нем – 10 мм. рт.ст. в покое и 60-80 мм. рт.ст. при мочеиспускании. В норме императивные позывы к мочеиспусканию возникают при введении более 500 мл жидкости. При цисталгии введение даже нескольких капель жидкости вызывает подъем давления в мочевом пузыре до 20 мм рт.ст. (при опорожнении – до 40-60 мм рт.ст.), а при введении 130 мл жидкости – императивные позывы к мочеиспусканию (Тополянский, Струковская, 1986). В связи с этим уместно вспомнить о концепции «психосоматического цистита», согласно которой не менее 10% больных с жалобами на расстройства мочеиспускания являются, без сомнения, жертвами собственного напряженного эмоционального состояния (Smith, 1962).

За стереотипной при формальном обследовании картиной цисталгии без морфологических изменений могут скрываться чисто психогенные механизмы. Депрессивно-ипохондрические расстройства и ипохондрическое развитие личности в связи с реальным, а подчас и воображаемым хламидиозом (с патологической фиксацией внимания на определенной области и жалобами на неприятные и тягостные ощущения в различных участках тела и, прежде всего, в половых органах). Эти состояния часто встречаются среди урогинекологических пациентов. Часто они подвергаются ятрогенным воздействиям в процессе бесчисленных обследований и курсов лечения и не получают адекватной их состоянию психотропной терапии. Этот диагноз становится основанием для назначения подобным больным массивной антибактериальной терапии (включая повторные курсы новейших антибиотиков) и спазмолитических средств, эстрогенов и кортикостероидов; им выскабливают слизистую оболочку мочевого пузыря, производят влагалищные новокаиновые блокады; бужируют, прижигают и даже резецируют уретру. Примечательно, что введение в уретру небольших объемов стерильной дистиллированной воды оказывается при этом столь же эффективным, как и другие методы лечения. После длительного периода увлечения всеми видами техницизма на сцену вновь выходит психотерапия, особенно гипнотерапия, и даже только психотерапия без назначения каких-либо медикаментов

(Smith R., 1962). Основная задача при психогенном цистите – отвлекать внимание больных от их уретры и мочевого пузыря – была еще в начале XX века сформулирована Dubois (1912).

Кажущаяся «моносимптомность» клинической картины при цисталгии определяется объектом ипохондрической фиксации больных, сосредоточившихся на акте мочеиспускания. Жалобы на расстройства мочеиспускания, активно предъявляемые врачу, как правило, не исчерпывают всего комплекса симптомов (сухость во рту, боли за грудиной и в эпигастриальной области, подергивание в области копчика, спазмы в кишечнике, тошнота). Объективно выявляются резкая потливость, приступы гипервентиляции, длительный неинфекционный субфебрилитет. Цисталгия и поллакиурия с императивными позывами к мочеиспусканию при аффективных нарушениях проявляются в комплексе висцеро-вегетативных расстройств. Возникшие первоначально или зафиксированные в результате аффекта, боль и неприятные ощущения становятся автономными и принимают характер самостоятельного нервного расстройства в виде «навязчивых пузырьных кризов», давно известных невропатологам (Бехтерев, 1907; Dejerine, Gauckler, 1912; Тополянский, Струковская, 1986).

Прямая зависимость цисталгии от тяжелых душевных переживаний в связи с перенесенным хламидиозом, особенности психического статуса больных, успех психотерапии при явной неэффективности повторных курсов антибиотиков и анальгетиков свидетельствуют о психогенном характере подобных жалоб в структуре аффективных расстройств. Поэтому заметный терапевтический эффект при назначении транквилизаторов отмечается у 30-40% больных цисталгией. Большая часть этих больных требует комбинированной терапии антидепрессантами и седативными средствами в сочетании с небольшими дозами нейролептиков, а также применения различной физиотерапии.

Психогении при хронических воспалительных процессах хламидийной этиологии часто усугубляются развитием дезадаптации брачных отношений (Кришталь, Андрух, 1996; Мавров, 2002; Напреенко, Бойко, 2002) Первые попытки половой близости после лечения носят для супругов волнующий характер, а нередко приобретают оттенок некоего испытания. Даже у здорового мужчины после длительного воздержания и при отношении к половому акту, как к экзамену, может быть ускоренная эякуляция, ухудшение адекватных эрекции. Пациент воспринимает такую «неудачу» как доказательство безуспешности лечения, наступления «грозных» осложнений и теряет веру в выздоровление. Данный патологический «порочный круг» включает в себя воспаление гениталий, психические нарушения, семейную (в том числе сексуальную) дисгармонию. Характерно, что при наличии воспалительных и психических отклонений у одного из супругов, подобные нарушения наблюдаются и у другого супруга.

Распознавание психосоматических нарушений при хламидиозе требует консультации психотерапевта или психоневролога. Но даже при полной, казалось бы, уверенности в психогенном происхождении того или иного синдрома необходимо тщательное и всестороннее лабораторное обследование больного (для исключения хламидийной и других половых инфекций) с применением самых чувствительных и специфичных тестов. Клиническое и инструментальное обследование должно объективно выявить степень морфофункциональных поражений в тазовых органах. Явно неправильное, неадекватное поведение больного на амбулаторном приеме или в отделении еще не дает права рассматривать его как «чистого невропата». Попытка лечащего врача сразу же передать такого пациента на попечение психиатра озна-



чает полную утрату контакта с больным, потерю доверия с его стороны и заведомую безуспешность всякой психотерапии, отказ от приема любых психотропных препаратов. Консультация психотерапевта для выявления и коррекции имеющихся у больного психопатологических (в первую очередь аффективных) нарушений целесообразна лишь при наличии достоверных лабораторных, эндоскопических и рентгенологических данных. Только явно психотическое состояние пациента служит основанием для перевода его в специализированный психиатрический стационар.

Психогенное происхождение симптомов не может устанавливаться лишь методом исключения (на основании только негативных данных лабораторных и инструментальных исследований). Для подобного заключения требуется также выявление психопатологических расстройств и четких психосоматических корреляций (в соответствии с известными закономерностями течения) и клинических особенностей функциональных нарушений. Особое значение приобретает анамнез больного (наличие в прошлом истинного уретрита, простатита или цистита, прямая связь страдания с психической травмой или тяжелыми переживаниями депрессивного характера). Должна настораживать лечащего врача и периодичность соматических нарушений, возникающих и исчезающих в полном соответствии с имеющимися у больного сезонными и суточными колебаниями состояния (например, выраженная боль и дизурия по утрам или в первой половине дня и отсутствие ее вечером). Показательно также появление или усиление болезненных ощущений и других функциональных нарушений на высоте аффективного напряжения, при волнении и расстройстве. О преимущественно психогенной природе синдрома свидетельствует и независимость самочувствия больного от результатов лабораторных тестов, его обращение к врачам с теми же жалобами при полном излечении имевшегося у него хламидиоза. Упорное многолетнее течение страдания, не сопровождающееся развитием органических изменений, и бесспорная резистентность его ко всем видам терапии указывают на психогенный характер синдрома.

Выявление симптомов депрессии требует профессиональной способности терпеливо выслушать больного до конца и провести обследование с величайшей деликатностью, что не легко и не всегда возможно. При первой же беседе с больным отмечается особое, сверхценное отношение его к своим патологическим ощущениям. Определенные ипохондрические установки показывают опытному врачу всю глубину аффективной захваченности больного своим состоянием. Предположение о функциональном происхождении урогенитальной симптоматики базируется на явном несоответствии жалоб больного и обнаруженным у него органическим изменениям. Определенные диагностические подозрения вызывают и активные жалобы на нестерпимую боль или крайне тягостные ощущения при заболеваниях, которые в норме, как правило, особо болезненных ощущений не дают. Болевой тестикулярный синдром встречается при полном отсутствии какого-либо органического субстрата (у молодых людей, захваченных сексуальными проблемами) и на фоне действительно существующих патологических изменений половых органов (рубцово-склеротических процессов вследствие перенесенного эпидидимита или латентных хронических воспалительных процессов). Грубое несоответствие вполне благополучной клинической картины и субъективной оценки пациентом своих патологических ощущений ложится в основу нарастающего недоверия больного к результатам объективных методов исследования. Тревога и страх больных за свое состояние, «не распознанное и не понятое» врачами, порождает неизбежные при этом конфликтные ситуации в поликлиниках и стационарах.

Одним из безусловных показаний к направлению больного на консультацию психиатра служит выявление инородных тел в мочевом пузыре и уретре, как мужчин, так и женщин. Булавки, обрезки проволоки, термометры, ручки, карандаши и пеналы для карандашей, резиновые катетеры, шпильки, восковые свечи и даже осколки стекла или гвозди попадают в уретру и мочевой пузырь не только случайно, во время мастурбации, принимающей откровенно психопатологический характер. Речь может идти о сенестопатических ипохондрических состояниях различной нозологической принадлежности (от шизофрении до церебрального атеросклероза с жалобами на непрерывный, невыносимый зуд в уретре и половых органах).

В пользу психогенного характера страдания свидетельствует эффект психотерапии. Однако положительное действие психотерапии возможно и при органических заболеваниях мочеполовых органов и само по себе еще не указывает на преимущественно или чисто психогенное происхождение синдрома. В то же время безуспешность психотерапии также не подтверждает исключительно органическую природу заболевания. Значительная часть этих больных нуждается в активной терапии психотропными средствами в связи с тяжелыми депрессивными, а иногда и депрессивно-параноидными состояниями. Доступными для психотерапии они становятся лишь при купировании ипохондрического бреда.

Психопатологические состояния у пациентов с болезнью Рейтера были выявлены в 77% (Бондаренко и соавт., 2003). Детальное изучение психопатологии позволило выделить ряд синдромов: астенический – у 34%, агрипничный – у 4%, астено-депрессивный – у 15%, тревожно-депрессивный – у 8%, тревожно-фобичный – у 8%, ипохондрический – у 7% больных. Пациентов беспокоила общая слабость, рассеянность внимания. Больные отмечали чувство внутреннего напряжения, повышенную возбудимость, раздражительность. При этом характерным признаком являлась неадекватность эмоциональных реакций на раздражители. Так, при незначительном психо-эмоциональном напряжении возникали раздражительность, несдержанность или, наоборот, резко снижалось настроение, появлялась апатия. Наблюдалась фиксация внимания на симптомах основного заболевания. У большинства больных отмечался пессимизм в отношении исхода заболевания. Было характерно ипохондрическое толкование имеющихся ощущений, которые определенно связаны с особенностями основного заболевания – полиморфностью клинических проявлений, рецидивирующим течением, устойчивостью к лечению. Одной из главных жалоб в структуре астенического синдрома явилось нарушение сна. Так, пациенты отмечали непродолжительный по времени, прерывистый, поверхностный ночной сон, с затрудненным засыпанием. Ночной сон после пробуждения не приносил полноценного чувства отдыха. Нарушения памяти в основном выражались в недостаточности функций оперативной памяти, легком сужении объемов запоминания и снижении прочности произвольного запоминания. При этом функции зрительной памяти в целом были затронуты больше, чем вербальной. Нарушения внимания были представлены в форме легкого сужения объемов произвольного запоминания и недостаточности его функций.

У одной трети пациентов с болезнью Рейтера выявлены депрессивные нарушения. Основным компонентом депрессивного синдрома явилось снижение настроения. Снижение настроения сопровождается разнообразными проявлениями эмоциональной лабильности. При этом чаще встречается сочетание депрессии с астеническим компонентом. Пациентов беспокоит общая слабость, вялость, снижение интереса к окружающей обстановке, апатия.

Примерно у 10% отмечаются тревожно-фобические нарушения. У больных возникает убежденность в неизлечимости заболевания. Продолжительное, рецидивирующее течение заболевания «подтверждает» имеющиеся переживания. Имеет место ипохондрическая интерпретация клинических симптомов.

При болезни Рейтера прослежены определенные тенденции в возможностях микросоциального функционирования в зависимости от того, в каком возрасте началось заболевание и какова его продолжительность (Бондаренко, и соавт., 2003). Так, начало заболевания в возрасте до 30 лет, в особенности в случаях, если у больного еще не сложились крепкие семейные отношения; продолжительный, рецидивирующий характер течения БР содействуют более выраженной невротизации. Инфекция становится одной из значительных причин социальной дезадаптации, которые, в свою очередь, являются мощным фактором для развития психопатологических нарушений. В случаях, если заболевание возникает в возрасте после 40 лет, при хорошей адаптации в социальной системе, число лиц с развитием неврозоподобных синдромов значительно меньше. В системе отношения к болезни у этой группы отмечается более адекватное восприятие как самого факта заболевания, так и необходимости терапии. Пациенты относились к болезни, как «к временным неприятностям, которые необходимо преодолеть». Вопрос болезни не закрывал другие жизненные интересы, болезнь не вызывала значительно изменения обычного уклада жизни.

Хламидийная мочеполовая инфекция становилась значительным психотравмирующим фактором у лиц детородного возраста, еще не имеющих детей, что вызвано информацией больных о влиянии возбудителя на репродуктивную функцию (Мавров, 2002). В отношении к болезни среди обследованных лиц было выявлено несколько тенденций. Так, с одной стороны, возникали реакции со склонностью к переоценке тяжести заболевания, выраженной тревогой, ипохондрическими, фобичными переживаниями, «отходом в болезнь». С другой стороны, отмечены депрессивные реакции с безразличием, апатией. Подобные формы реагирования оказывали содействие формированию очередных психопатологических синдромов. Кроме того, в ряде случаев реагирование на заболевание характеризовалось сознательным его игнорированием.

#### **12.1.8. Венерическая лимфогранулема**

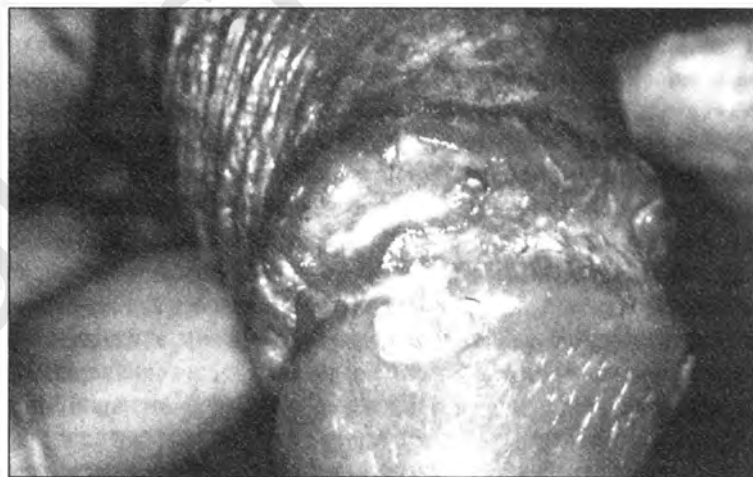
Четвертая венерическая болезнь, или хламидийная (венерическая) лимфогранулема, паховая лимфогранулема, была впервые описана J. Durand, J. Nicolas и M. Favre в 1913 году. Хламидийная природа венерической лимфогранулемы была установлена в 30-40-е годы (Findlay et al., 1938; Rake et al., 1940; 1941).

Венерическая лимфогранулема является единственной нозологической формой уrogenитальных хламидиозов, которая традиционно рассматривалась как венерическое заболевание. Спорадические случаи венерической лимфогранулемы встречаются повсеместно, но наибольшее распространение она имеет на некоторых территориях с влажным и теплым климатом (Южная и Юго-Восточная Азия, Центральная и Южная Америка). Интенсификация международных связей, проявляющаяся в последнее десятилетие, увеличивает риск возникновения и распространения венерической лимфогранулемы в различных регионах мира (Мебей, Пилинг, 2002; Mabey, Peeling, 2002). В США регистрируется примерно 350 случаев венерической лимфогранулемы в год (Lynch et al., 1999). В последнее время четвертая венерическая

болезнь на территории России и Украины стала встречаться чаще. За последние годы описано несколько случаев этого заболевания (Коляденко и соавт, 1981; Гуссейн-Заде и соавт. 1987; Ковалев и соавт, 2002).

При рассмотрении клинических проявлений и патологии, вызываемой этим микроорганизмом, следует подчеркнуть, что возбудитель венерической лимфогранулемы является наиболее вирулентным представителем хламидий, первично поражающих человека и обитающих в мочеполовых органах. Он способен размножаться в клетках различного происхождения и при естественной инфекции обладает выраженным лимфотропизмом, определяя лимфопролиферативный характер болезни (Schachter, Osoba, 1983). Возбудитель венерической лимфогранулемы, по современной классификации, относится к виду *C. trachomatis*, однако обладает значительным биологическим своеобразием. Венерическую лимфогранулему вызывают серовары L1, L2 и L3 *C. trachomatis*. Эти штаммы обладают более выраженными вирулентными свойствами на модели животных и большей инвазивностью в организме человека, чем чаще встречающиеся серовары А-К. Если серовары А-К прикрепляются главным образом к клеткам цилиндрического эпителия слизистой оболочки генитального тракта и глаз, то серовары, вызывающие венерическую лимфогранулему, инфицируют моноциты и макрофаги, проходят через эпителиальную поверхность в региональные лимфатические узлы и могут вызывать диссеминирующую инфекцию.

В клиническом течении венерической лимфогранулемы обычно выделяют три стадии, соответствующие появлению первых признаков инфекции, поражению регионарных лимфатических узлов и последующим проявлениям болезни. Инкубационный период обычно имеет продолжительность в пределах 30 дней (Viravan, et al. 1996). Первичные поражения у мужчин часто возникают на головке полового члена (рис. 12.2), реже в мочеиспускательном канале или на коже паховой области, у женщин – во влагалище или на половых губах, реже на шейке матки. Они могут иметь вид папул, пустул, поверхностной язвочки, эрозии или проявляться признаками неспецифического воспаления мочеиспускательного канала.



**Рисунок 12.2.** Первичное поражение при венерической лимфогранулеме в виде язвы с неровными краями в области венечной борозды полового члена (Mabey, Peeling, 2002).



Первичное поражение может локализоваться на языке, в прямой кишке, на пальцах и т. п. Эти проявления часто кратковременны, могут не привлечь внимания инфицированных лиц, которые обычно обращаются за медицинской помощью при второй стадии болезни. Первичное поражение может самопроизвольно разрешиться, наблюдается не всегда и может оставаться незамеченным пациентом. У половины больных бубоны развиваются без предшествующих изъязвлений (Viravan, et al. 1996).

Через несколько дней или недель наступает вторая стадия болезни. Возникает регионарный лимфаденит или лимфаденопатия, чаще односторонняя (рис. 12.3).

Нередко появляется множественное поражение узлов, топография которых зависит от локализации начальной инфекции. У мужчин обычно сначала поражаются паховые лимфатические узлы, у женщин (при первичном поражении влагалища) – чаще забрюшинные лимфатические узлы, увеличение которых долго ими не ощущается. Аденопатия выше или ниже паховой связки наблюдается в 10-20% случаев (Schachter, Osoba, 1983). При бубонной форме узлы увеличиваются, становятся болезненными, особенно при развитии периаденита. В результате воспалительного процесса в них могут возникать абсцессы, расплавление ткани, нередко определяемые по флюктуации, или, наоборот, уплотнение. Часто наблюдается самопроизвольное вскрытие бубона с последующей ремиссией или образованием фистулы. Остро протекающие формы болезни сопровождаются повышением температуры тела, головной болью, недомоганием, общим токсикозом. В ряде случаев воспалительный процесс протекает вяло, по типу хронической лимфаденопатии, на протяжении многих месяцев и лет, иногда периодически обостряясь.

При экстрагенитальном заражении аденопатия возникает за пределами паховой области. Описан случай венерической лимфогранулемы с вовлечением шейных лимфоузлов после заражения во время орального секса (Thorsteinsson et al., 1976). Описано профессиональное заражение сотрудников лаборатории, у которых развилась пневмония после случайной ингаляции штаммов LI и L2 *C. trachomatis*, вызывающих венерическую



**Рисунок 12.3.** Левосторонний паховый бубон и язва полового члена при венерической лимфогранулемы (вторая стадия) (Mabeу, Peeling, 2002).

лимфогранулему. Заболевание сопровождалось аденопатией в области средостения и в надключичной области (Bernstein et al., 1984). Попадание возбудителя в глаз может вызывать фолликулярный конъюнктивит, часто сопровождающийся лимфоаденопатией в предушной области. У многих пациентов с венерической лимфогранулемой наблюдаются признаки общего недомогания: подъем температуры, боль в мышцах и головная боль.

Вовлечение аноректальной области на ранней стадии наблюдается у женщин и мужчин-гомосексуалистов. Симптоматически заболевание характеризуется как острый геморрагический проктит. Пациенты жалуются на боль в прямой кишке и кровотечения, часто сопровождающиеся признаками системного заболевания (повышение температуры, потливость и потеря веса). При ректоскопии обнаруживается гранулярный или язвенный проктит (Greaves A.B. 1963; Quinn et al., 1981; Bauwens et al., 1995).

Без соответствующего лечения болезнь прогрессирует, наступает ее третья стадия, при которой развиваются тяжелые деструктивные изменения не только в лимфатических узлах, но и в окружающих тканях и органах. У женщин наиболее часто поражаются проксимальные отделы влагалища и прямой кишки. В результате образуются ректальные или ректовагинальные фистулы, возникают стриктуры, рубцовые изменения тканей, повреждение нижних отделов пищеварительного аппарата, непроходимость прямой кишки (Paragrigoriadis, Rennie, 1999). У мужчин чаще наблюдаются фистулы полового члена, прямой кишки. У мужчин и женщин возможна деформация половых органов, слоновость или злокачественная трансформация (Ковалев и соавт., 2002). Для третьей стадии болезни (генито-аноректальный синдром) характерна генерализация инфекции, приводящая к серьезным поражениям центральной нервной системы (менингит), сердца (эндо- и миокардит), легких (пневмония), кожи (узловатая и многоформная эритемы), глаз и других органов. Хроническое воспаление, вызванное *C. trachomatis*, часто приводит к образованию рубцов как в глазах, так и в области гениталий.

Дифференциальный диагноз проводится с другими заболеваниями, сопровождающимися язвезвлениями в области гениталий: шанкroidом, герпесом, сифилисом и донованозом (паховая гранулема). Реже сходные проявления может вызывать травма, невенерические инфекции (например, кожный лейшманиоз) и эритема, связанная с приемом лекарств. При паховой аденопатии дифференциальный диагноз проводится с шанкroidом, герпесом и сифилисом, хотя обычно при этих заболеваниях имеется генитальная язва или упоминание о генитальной язве в анамнезе (Htun et al., 1999). Односторонняя паховая или бедренная лимфоаденопатия требует внимательного исследования на предмет септического поражения в области конечности, включая стопу. Хроническая полость в паху может быть вызвана туберкулезом поясничного отдела позвоночника, а в эндемичных областях у пациента с признаками острого заболевания и паховой лимфоаденопатией необходимо рассмотреть вероятность бубонной чумы.

При генерализованной лимфоаденопатии требуется дифференциация с более широким спектром заболеваний, включая ВИЧ-инфекцию и лимфому, для исключения которых нужно тщательно пропальпировать шейную и подмышечную области, а также область внутреннего надмыщелка плечевой кости. При венерической лимфогранулеме, особенно в случаях длительного ее течения, наблюдаются характерные нарушения количественного содержания глобулинов в сыворотке крови больных. Обычно повышается концентрация  $\gamma$ -глобулина и иммуноглобулина А. Появляются нехарактерные для сыворотки криоглобулины (Lassus et al., 1970).

### 12.1.9. Трахома

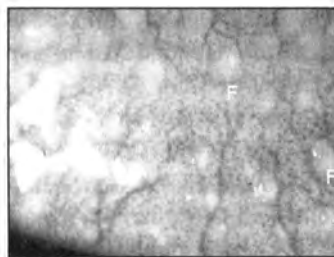
Трахома известна с глубокой древности и упоминается в древнекитайских рукописях. В египетских папирусах, датируемых 1500 годом до нашей эры, описаны энтропион и трихиаз, приводится 95 прописей лечения трахомы, включая минералы, содержащие свинец (галенит) и медь (малахит). Сохранились щипцы для выдергивания ресниц при трихиазе. Древнегреческие врачи Гиппократ и Гален изучали трахому в Египте и сделали подробные описания на основе современных им анатомических знаний. Трахома была широко распространена в Европе во времена крестовых походов и войн Наполеона в Африке, когда ее называли «военной, или египетской офтальмией».

Современная история изучения трахомы в значительной степени есть история изучения *Chlamydiales* (см. раздел 1. Исторический обзор изучения хламидий). Достаточно вспомнить, что *Chlamydia trachomatis* была впервые выделена Feifan в куриных эмбрионах именно от больных трахомой (Wang, 1999).

В клиническом течении трахомы условно различают четыре стадии. При длительном течении заболевания возможно сочетание симптомов разных стадий и переход одной в другую (Зайцева, 1976; Thylefors et al., 1987; West, Taylor, 1990).

Для первой стадии характерно развитие воспалительных явлений в конъюнктиве разной выраженности с инфильтрацией подслизистой ткани, разрастанием папиллярных тел и появлением фолликулов. Во второй стадии наблюдается перерождение и распад фолликулов, сохраняется воспалительная инфильтрация и наступает начало рубцевания. Третья стадия характеризуется преобладанием процессов рубцевания. Четвертая стадия – законченный процесс рубцевания без воспалительных явлений – последствия трахомы (Золотарева, 1964; Зайцева, 1976).

Первая стадия трахомы имеет разную продолжительность (от нескольких месяцев до ряда лет). Начало трахомы может быть незаметным, особенно у детей, и выявляется при случайном или профилактическом осмотре. У детей возможно и самопроизвольное излечение без образования рубцов в связи с более легким, чем у взрослых, течением процесса. Чаще имеет место острое начало трахомы. Характерны жалобы на незначительное отделяемое, ощущение инородного тела и жара в глазах. В начальной стадии трахомы обнаруживается гиперемия и инфильтрация переходных складок, разрастание сосочков и появление мутно-серых возвышений – фолликулов (рис. 12.4).



**Рисунок 12.4.** Трахоматозное воспаление конъюнктивы века (первая стадия – фолликулярный конъюнктивит).

Единичные фолликулы в конъюнктиве верхнего века (F) – белесоватые, круглые образования примерно 0,5 мм в диаметре.

Фолликулы расположены беспорядочно в глубине инфильтрированной ткани. Затем гиперемия и инфильтрация распространяются на конъюнктиву хряща с появлением в ней небольших глубоких серовато-красных фолликулов. Одновременно увеличивается инфильтрация и число фолликулов в переходной складке и в хряще. Фолликулы тесно прилегают друг к другу, некоторые сливаются.

Вследствие распространения инфильтрации на область сухожилия мышцы-леватора и мышцы Мюллера возникает птоз (*ptosis trachomatosa*). Этому способствует дальнейшее утолщение и неровность хряща. При выворачивании век переходная складка выступает складчатым, бугристым валиком, усеянным фолликулами. Разрастание сосочковых тел, особенно в верхних отделах хряща, придает конъюнктиве своеобразную бархатистость. Часто в процесс вовлекается полулунная складка, которая становится утолщенной, усеянной крупными выступающими фолликулами. При развитой форме трахомы может вовлекаться слезистая глазного яблока. Конъюнктивa вблизи верхней переходной складки утолщается, и появляются крупные фолликулы, расположенные параллельными рядами. В других случаях в конъюнктиве глаза наблюдается только диффузная инфильтрация в свете щелевой лампы. Соотношение элементов трахоматозного процесса может быть с преобладанием гипертрофии сосочковых тел – папиллярная форма, либо с преимущественным высыпанием фолликулов – фолликулярная, зернистая или смешанная – с наличием тех и других элементов. Отделяемое может быть значительным, особенно при цветущей трахоме с развитием папиллярных тел.

Особенности клинических проявлений в разных отделах конъюнктивы связаны с ее морфологическим строением. Обильная аденоидная ткань в переходных складках создает лучшие условия для развития воспаления, появления фолликулов и инфильтрации ткани. В области хряща, с которым тесно спаяна конъюнктивa, развитие фолликулов затруднено, они малы и находятся в глубине. В слезистой глазного яблока, из-за отсутствия развитой ретикулярной ткани, значительной инфильтрации и развития фолликулов не наблюдается.

Для второй стадии характерно замещение воспалительной инфильтрации и фолликулов рубцовой соединительной тканью. При развитой форме трахомы фолликулы приобретают тусклый цвет, расплывчатые границы, увеличиваются и сливаются, особенно в области верхнего края хряща век (рис. 12.5).

Максимальной выраженности эти изменения достигают при студенистой трахоме, когда фолликулы сливаются в сплошную массу. Перерождение характерно и для воспалительной инфильтрации подслизистой ткани. С распадом фолликулов легко отходят перерожденные массы, а на их месте появляются рубчики. При студенистой форме особенно резко выражен дегенеративный процесс. Однако в этом периоде еще интенсивна инфильтрация, гипертрофия сосочков и высыпание свежих фолликулов.

Постепенное уменьшение воспалительных явлений, инфильтрации и замещение фолликулов рубцовой тканью характерно для третьей стадии трахомы. Эта стадия наиболее длительная, сопровождающаяся осложнениями со стороны век, слезных путей и роговицы. Наряду с рубцовыми изменениями, могут быть признаки воспалительной инфильтрации и появление небольшого числа свежих фолликулов (рис. 12.6).

В четвертой стадии трахомы есть только рубцы слезистой оболочки. Вначале рубцы в виде белесоватых полосок и точек появляются в переходной складке и на слезистой верхнего края хряща, затем распространяются по всему хрящу и оказываются особенно выраженными



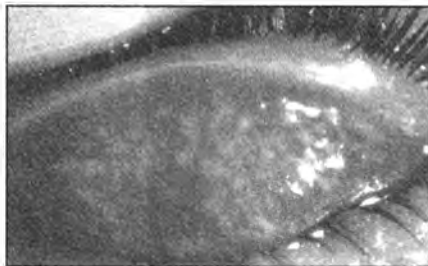


Рисунок 12.5.

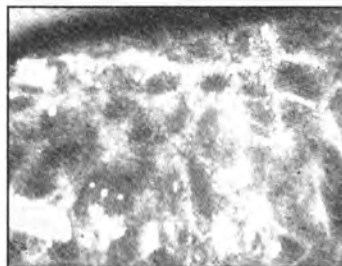


Рисунок 12.6.

**Рисунок 12.5.** Трахоматозное воспаление конъюнктивы века (вторая стадия – диффузный конъюнктивит).

Фолликулы расположены в глубине инфильтрированной ткани. Гиперемия и инфильтрация распространяются на конъюнктиву хряща с появлением в ней глубоких серовато-красных фолликулов. Фолликулы тесно прилегают друг к другу, некоторые сливаются.

**Рисунок 12.6.** Трахоматозное воспаление конъюнктивы века (третья стадия – рубцовый конъюнктивит).

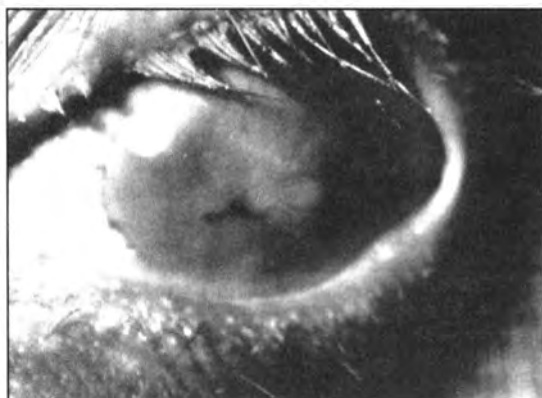
Постепенное уменьшение воспалительных явлений, инфильтрации и замещение фолликулов рубцовой тканью характерно для третьей стадии трахомы. Наряду с рубцовыми изменениями имеются признаки воспалительной инфильтрации.

в *sulcus subtarsalis* — параллельно ресничному краю, отступив от него на 2-3 мм, в виде сплошной белой полосы. Рубцы могут быть разной степени выраженности — от нежных, трудно распознаваемых невооруженным глазом, до грубого рубцевания со сморщиванием слизистой, уменьшением емкости конъюнктивального мешка, образованием сращений между веками и глазным яблоком (*Sympblepharon posterius*). Рубцевание слизистой и хряща часто вызывает его искривление с выпуклостью кнаружи, углублением с внутренней стороны, соответственно месту интенсивного рубцевания, и изменением конфигурации век. Все это, а также блефароспазм, сопутствующий поражению роговицы, является причиной одного из тяжелых последствий трахомы — заворота век, при котором ресничный край полностью или частично заворачивается к глазу.

Заворот век часто сочетается с трихиазом (*trichiasis*) — неправильным положением ресниц, обращенных к глазу, вследствие распространения трахоматозного процесса на край века и корни ресниц. Из-за рубцевания нарушается положение волосяных мешочков, сокращается или исчезает интермаргинальное пространство, сглаживается заднее ребро и возникает дополнительный рост ресниц (рис. 12.7). Выводные протоки мейбомиевых желез растягиваются, частично закупориваются, что способствует воспалению хряща, его утолщению, бугристости. Трихиаз вызывает и поддерживает воспаление роговицы, ее изъязвление.

Из-за рубцевания нарушается положение волосяных мешочков, сокращается или исчезает интермаргинальное пространство, сглаживается заднее ребро и возникает дополнительный рост ресниц. Выводные протоки мейбомиевых желез растягиваются, частично закупориваются, что способствует воспалению хряща, его утолщению, бугристости.

Иногда в исходе трахомы вследствие грубых трофических нарушений, рубцевания конъюнктивы, гибели железистого аппарата и закрытия выводных протоков слезных желез, развивается ксероз (*xerosis*), высыхание слизистой или роговицы. С высыханием конъюнктивы на ее поверхности, вначале на уровне раскрытой глазной щели, появляются



**Рисунок 12.7.** Трихиаз (*trichiasis*) – неправильное положение ресниц, обращенных к глазу, вследствие распространения трахоматозного процесса на край века и корни ресниц.

отдельные матово-белые сухие бляшки (ороговевший эпителий). Далее они распространяются на слизистую глаза и хряща, предшествуя высыханию всей конъюнктивы. Затем наступает высыхание роговицы, ее помутнение, захватывающее постепенно все слои. Возможно полное высыхание глаза – ксерофтальм (*xerophthalmus*) с потерей зрения из-за ороговения эпителия конъюнктивы и роговицы.

Клиническая картина трахомы отличается чрезвычайным разнообразием, в зависимости от степени проявления инфильтрации, высыпания фолликулов, развития папиллярной гипертрофии, осложнений и последствий. Это определяет разное по тяжести течение болезни: легкое, среднее и тяжелое. Большое значение в этом имеет общее состояние организма больного, ибо установлено, что многие заболевания (малярия, сифилис, скрофулез, туберкулез, глистные инвазии, гипо- и авитаминозы, инфекционные болезни) так же, как и наслаивающиеся конъюнктивиты, ухудшают и обостряют течение трахомы. Трахома отличается длительностью течения (на протяжении многих лет) из-за возможных обострений, рецидивов, осложнений и тяжелых последствий. Однако наблюдаются случаи с относительно коротким периодом заболевания, без осложнений, и даже «стертые формы», когда при некоторых признаках трахомы не обнаруживают типичных фолликулярных изменений конъюнктивы или поражения роговицы.

Односторонняя трахома встречается редко. Чаще вначале заболевает один, а затем второй глаз. Нередко односторонность заболевания отвергается осмотром щелевой лампой с выявлением менее выраженных изменений «здорового» глаза.

Характерным для клинической картины трахомы является трахоматозный паннус (*pannus trachomatosus*) – поверхностное сосудистое трахоматозное разлитое воспаление роговицы (*Keratitis superficialis diffusa vasculosa*). Основой его является трахоматозная инфильтрация роговицы. Сначала становится мутным, отечным верхний лимб. На границе с ним, под эпителием и боуеновой оболочкой, появляются серые поверхностные инфильтраты, которые, сливаясь, образуют диффузное помутнение роговицы. В него врастают поверхностные анастомозирующие между собой конъюнктивальные сосуды. Поверхность паннозной роговицы становится шероховатой, как бы истыканной мелкими округлыми углублениями. Это – «глазки Бонне»

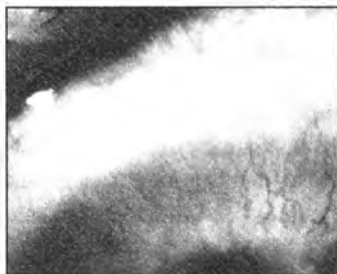


Рисунок 12.8. Трахоматозное воспаление конъюнктивы в области лимба.

и «ямки Герберта» в виде плоских чашечек с прозрачным или полупрозрачным дном, расположенные в двух внутренних зонах лимба, величиной от 0,25 до 1 мм (рис. 12.8).

Мелкие округлые углубления – «глазки Бонне» и «ямки Герберта» в виде плоских чашечек с прозрачным или полупрозрачным дном, расположенные в двух внутренних зонах лимба, величиной от 0,25 до 1 мм ( $\leq$ ). Сосуды резко наполнены и видны до конечных ветвей капиллярной сети. Край лимба на границе с прозрачной роговицей слегка приподнят, белого цвета из-за инфильтрации, резко виден.

Могут наблюдаться окруженные сосудами мелкие фолликулы, которые, очевидно, предшествуют «глазкам» — стадии дегенерации и рубцевания фолликула. Но до этих изменений, в начале появления фолликулов, в конъюнктиве обнаруживают отечность и мутность лимба, не позволяющие видеть его детали. Сосуды резко наполнены и видны до конечных ветвей капиллярной сети. Край лимба на границе с прозрачной роговицей слегка приподнят, белого цвета из-за инфильтрации, резко виден. Далее, в измененном лимбе, в зоне концевых сосудов, могут появляться фолликулы – маленькие, круглые, желтоватые, типа студенистых образований, впоследствии окруженные сосудами.

Различают тонкий паннус (*pannus tenuis*) – незначительное развитие инфильтратов и сосудов в роговице; сосудистый паннус (*pannus vasculosus*), когда большое количество сосудов пронизывает нерезко помутневшую роговицу; мясистый паннус (*pannus crassus*) со значительной инфильтрацией роговицы, еще большим числом сосудов, напоминающих грануляционную ткань. Возможны папилломатозные разрастания на роговице, называемые саркоматозным паннусом (*pannus sarcomatosus*). Паннусу обычно сопутствует блефароспазм, слезотечение, светобоязнь, вторичный ирит, понижение зрения. Своеобразным видом паннуса является истинная трахома роговицы (*trachoma corneae*), проявляющаяся развитием фолликулов вблизи лимба на фоне паннозных изменений.

Течение паннуса может осложниться возникновением язвы на границе со здоровой тканью или в центре роговицы. В первом случае появляется глубокий, быстро распадающийся инфильтрат, заживающий грубым, сильно васкуляризованным рубцом. Во втором – гнойно-инфильтрированная язва в центре роговицы, вне связи с паннусом, вызванная патогенной флорой, для развития которой создаются благоприятные условия. Эти язвы могут распространяться в глубину, иногда осложняясь перфорацией роговицы. В результате образуется грубое центральное помутнение.

Начало паннуса отмечается появлением сероватых нитей на границе лимба и роговицы, по которым в нее проникают сосудистые петли. Им предшествует сероватая точечная

инфильтрация. В поверхностных слоях паренхимы, иногда в эпителии, отмечается развитие сосудистой сети и ее связь с такой же поверхностной сетью конъюнктивы. Извилистые сосуды на уровне лимба образуют изгибы вместе с сосудистыми петлями, выходящими из глубоких частей конъюнктивы. Проникая в роговицу, они распространяются к центру и на уровне своего окончания распадаются, анастомозируют друг с другом, образуя сосудистую сеть. В ней и впереди нее в прозрачной роговице наблюдаются сероватые помутнения – зоны поверхностной инфильтрации.

У 20% больных бывает поверхностный бессосудистый кератит (*keratitis superficialis avasculosa*, Бюззака). Описанные изменения обнаруживают при исследовании бинокулярной лупой с боковым освещением, используя методику обратной офтальмоскопии с фокусировкой лупы на область лимба. При этом в прелимбальной области видна радиарная исчерченность двух видов: бесцветная (запустевшие сосуды) и темная (налитые кровью сосуды). В свете щелевой лампы можно увидеть скрытый паннус, не распознаваемый при обычном исследовании.

Описанные изменения важны для диагностики начального периода трахомы и подтверждают раннее участие роговицы в трахоматозном процессе. До биомикроскопического исследования считалось, что паннус является осложнением трахомы, и при поголовных осмотрах он обнаруживался у 6-10% больных. В настоящее время с помощью щелевой лампы установлено, что паннус является ранним проявлением трахомы, одним из первых ее признаков. Особенно часто развивается паннус в регрессивном периоде трахомы, в частности, при ее последствиях (искривлении хряща, завороте, трихиазе и др.) и этим отягощает течение процесса. В исходе паннуса остаются стойкие помутнения роговицы вследствие грубых рубцовых изменений, возможно также и изменение ее формы, частичное или полное выпячивание (*Kerectasiae panno*) с резким снижением зрения вследствие неправильного астигматизма.

Трахома сопровождается и другими осложнениями конъюнктивы и слезных органов. Осложнения со стороны конъюнктивы (*trachoma superinfectum*) возникают с присоединением нагнаивающегося вирусного или бактериального конъюнктивита. При этом создаются благоприятные условия для внедрения и развития *C. trachomatis* в тканях, возникновения язв роговицы, отягощения трахоматозного процесса, его рецидивов и распространения трахомы среди окружающих. Осложнения со стороны слезных органов проявляются заболеванием слезоотводящих путей (каналикулит, дакриоцистит). Нарушение слезоотведения и постоянное выделение гноя в конъюнктивальный мешок вызывают упорные конъюнктивиты, отрицательно влияющие на течение трахоматозного процесса.

## 12.2. ПНЕВМОНИЯ, ВЫЗВАННАЯ *CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA*

Хламидии (*Chlamydia trachomatis*, *Chlamydoghylla pneumoniae*, *Chlamydoghylla psittaci*) могут вызывать поражения респираторного тракта человека как изолированно, так и в ассоциации с вирусами, микоплазмами, пневмококками (Лобзин и соавт., 1996; Казанцев, 2000; Позняк и соавт., 2002; Мавров, 2002).

Из всех представителей *Chlamydiales*, *C. pneumoniae* имеет наибольшее значение в этиологии и патогенезе респираторных заболеваний (у взрослых и детей после 1 года). История изучения пневмонии, вызванной *C. pneumoniae*, начинается с 50-х годов прошлого века, когда в скандинавских странах были описаны вспышки респираторного «орнитоза» в школах



и воинских частях, без контакта с птицами. В 1978 году у 2% студентов в Финляндии была обнаружена пневмония при рентгенологическом исследовании без выраженных клинических проявлений. По данным реакции связывания комплемента был диагностирован хламидиоз. Орнитоз (единственная на тот момент известная форма хламидийной пневмонии) был исключен в результате тщательного эпидемиологического анализа. Ни в одном случае контакт с птицами, как источником орнитоза, установить не удалось (Fryden et al., 1989; Grayston et al., 1989). В 1980 году эти образцы сывороток были исследованы с использованием микроиммунофлюоресценции. Антитела реагировали в МИФ со штаммом *C. trachomatis* TW-183, выделенным из конъюнктивы на Тайване в 1965 году. Штамм, вызывающий пневмонию, получил название TWAR-183 (Taiwan acute respiratory). Аналогичный штамм IOL-207 (Institute of Ophthalmology) был выделен от больного в Иране в 1967 году. Связь данных штаммов с инфекцией дыхательных путей была доказана культуральными методами. Эти штаммы были объединены в новый вид – *C. pneumoniae*, который по антигенным характеристикам и биологическим свойствам был ближе к *C. psittaci*, чем к *C. trachomatis* (Saikku et al., 1985; Kauppinen et al., 1995; Kuo, et al. 1995). В настоящее время общепризнанно, что *C. pneumoniae* является этиологическим агентом от 3,4% до 43% инфекционных пневмоний, в зависимости от пола, возраста и места жительства (Gaydos, et al., 1994; Fang et al., 1990; Lieberman et al., 1996; Lieberman, et al. 1998; Kauppinen et al., 1995). Периодические подъемы и спады заболеваемости наблюдаются с интервалом примерно в 10-11 лет (Karvonen et al., 1993).

Респираторные поражения, вызываемые *C. pneumoniae*, в 70% случаев протекают субъективно бессимптомно. Продолжительность инкубационного периода не известна, но, исходя из периодичности эпидемических вспышек, можно предположить, что он составляет несколько недель. Бессимптомное носительство может продолжаться до года и более, хотя наблюдаются случаи острой инфекции без предшествующих продромальных проявлений (первично-латентное), а также и после исчезновения всех клинических и рентгенологических изменений (вторично-латентное) (Kleemola et al., 1988). Длительная персистенция хламидий может обусловить появление рецидивов и обострений хронического астматического бронхита, бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких. Культуральным методом хламидии могут быть выделены из носоглоточных смывов даже через год и более после исчезновения клинических проявлений острого заболевания. При этом серологические реакции с хламидийными антигенами могут быть отрицательными (Hammerschlag et al., 1992; Kauppinen et al., 1995).

Пневмония, вызванная *C. pneumoniae*, обычно протекает в легкой форме (Blasi, 1996). Однако *C. pneumoniae* в ассоциациях с бактериальной микрофлорой может вызывать тяжелые формы бронхопневмоний, особенно при влиянии провоцирующих факторов (профессиональная вредность, переохлаждение, переутомление, вторичный иммунодефицит) (Lieberman, et al. 1996). Могут наблюдаться случаи с тяжелым и упорным течением болезни. Для пневмоний, вызванных *C. pneumoniae*, нет патогномоничных симптомов или признаков. Клиническая картина зависит от возраста пациента. Пневмония при первичном инфицировании более характерна для молодых лиц, а пневмония в результате реинфекции чаще встречается среди пожилых людей. Обычно пневмония при первичном инфицировании развивается до 40 лет, начиная с 7-летнего возраста (Позняк и соавт., 2002). Пол пациентов имеет некоторое прогностическое значение, так как установлено, что чаще болеют мужчины (58-89%). Типично постепенное нарастание симптомов, но в некоторых случаях возможно также острое начало.

Пневмонии могут предшествовать симптомы острого поражения верхних дыхательных путей (фарингит с осиплостью голоса). Интервал между возникновением катаральных явлений и вовлечением в воспалительный процесс легких составляет 1-4 недели (Hammerschlag et al., 1992; Hammerschlag, 2000). Симптоматика поражений верхних дыхательных путей может спонтанно исчезнуть до развития симптомов поражения нижележащих отделов дыхательного тракта. Температура повышается незначительно или может оставаться нормальной. У некоторых пациентов одновременно с пневмонией может развиваться синусит или отит. У 10% больных отмечается головная боль, у 38% – изменения сознания. При аускультации выявлялись пневмонические хрипы в 2/3 случаев (Kauppinen et al., 1995). При лабораторных исследованиях у 80% больных повышается СО<sub>2</sub>, но количество лейкоцитов часто остается нормальным. Сердечный ритм не нарушается. Частота сердечных сокращений соответствует температуре тела. Мокрота, отделяемая при пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, обычно скудная и негнойная, хотя иногда встречались и гнойные образцы (при смешанной инфекции с *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* и вирусом). У таких пациентов количество мокроты увеличено, наблюдается лейкоцитоз.

Клиническая картина часто смазывается в результате антибактериальной терапии на догоспитальном этапе. У лиц, получавших антибиотики, которые действуют на хламидии (тетрациклины, фторхинолоны, макролиды), отмечается тенденция к лейкопении и более низкий уровень С-реактивного белка, чем у неполучавших. Антибактериальная терапия не влияет на СО<sub>2</sub> и температуру тела. В клинической практике большое значение имеют пневмонии смешанной этиологии с участием *S. pneumoniae*. При интенсивном диагностическом поиске среди больных пневмониями другой этиологии доля *S. pneumoniae* среди микробов-ассоциантов может достигать 66% (Позняк и соавт., 2002). Наиболее часто *S. pneumoniae* ассоциируется с *S. pneumoniae*, респираторно-синтициальным вирусом, аденовирусами. Клиническая картина этих случаев отличается от чистой инфекции *S. pneumoniae*. Микст-инфекция характеризуется более выраженной тяжестью заболевания, частым развитием осложнений и даже возможностью летального исхода. Признаками присоединившейся бактериальной инфекции являются гнойная мокрота, острое развитие симптоматики поражения нижних дыхательных путей, тяжелое состояние, требующее госпитализации, высокий лейкоцитоз. В таких случаях хламидийная инфекция верхних дыхательных путей может способствовать колонизации слизистой оболочки другими бактериями (*S. pneumoniae*, *S. aureus* и др.). Эффект паралича ресничек эпителиальных клеток, вызываемый *S. pneumoniae*, способствует внедрению новых патогенов и предрасполагает к развитию у пациентов тяжелых пневмококковых пневмоний. Из-за большой частоты микст-инфекции, особенно в период эпидемии, рекомендуется назначать для лечения пневмоний антибиотики, активные в отношении всех микробов-ассоциантов, в том числе и *S. pneumoniae* (Гарашенко, Богомильский, 1999).

Рентгенологическая картина легких при пневмониях, вызванных *S. pneumoniae*, варьирует от нормы до признаков выраженного интерстициального воспаления, с вовлечением всех долей легких. Нельзя выделить признаки, специфичные только для *S. pneumoniae*. Однако некоторые клиничко-лабораторные признаки могут помочь при постановке специфического этиологического диагноза. Интерстициальная инфильтрация диагностирована у 37% пациентов с реинфекцией, в то время как у 40% с первичным хламидийным инфицированием была обнаружена лишь альвеолярная инфильтрация. В 51% всех случаев отмечалось вовлечение

в воспалительный процесс обоих легких. Также характерны локальные односторонние повреждения – единичные субсегментарные повреждения одной доли. Более выраженные, двусторонние поражения характерны для тяжелого заболевания. Как и при всех остальных пневмониях, инфильтраты локализованы преимущественно в нижних долях легких. Плевральный выпот при пневмонии, вызванной *C. pneumoniae*, отмечается в 20-25% случаев (Kauppinen et al., 1995; Позняк и соавт., 2002).

### 12.3. ЗООНОЗНЫЕ ХЛАМИДИОЗЫ

#### 12.3.1. Заболевания, вызванные *Chlamydothyla psittaci*

Наиболее изученным из хламидийных зоонозных инфекций человека является орнитоз (пситтакоз) – инфекционная болезнь, вызываемая *C. psittaci*. Резервуаром инфекции являются дикие и домашние птицы. В человеческой популяции орнитоз проявляется в виде спорадической заболеваемости или небольшими эпидемическими вспышками. В этиологической структуре пневмоний в настоящее время удельный вес орнитоза составляет 3-4% (Позняк и соавт., 2002). Эпидемические вспышки заболевания часто носят профессиональный характер и возникают в птицеводческих хозяйствах и зоопарках. Спорадические случаи заболеваний возникают у любителей экзотических птиц, голубоводов, охотников. Увеличение торговли декоративными птицами в последние годы ассоциируется с подъемом заболеваемости хламидийной пневмонией (Moroney et al., 1998; Gosebell et al., 1999).

Общепринятая классификация пситтакоза основана на характере течения и локализации поражений (Казанцев, 1973, Гранитов, 2000). Острый пситтакоз: типичная пневмония (легкая, средней тяжести, тяжелая); атипичные формы (менингопневмония; пситтакозный менингит); бессимптомная форма. Хронический пситтакоз: хроническая пситтакозная пневмония; хронический пситтакоз без поражения легких. Постпситтакозная неспецифическая хроническая пневмония. При аэрогенном пути инфицирования органы дыхания всегда вовлекаются в патологический процесс, поэтому выделение традиционных клинических вариантов течения заболевания (гриппоподобный, пневмониеподобный, тифоподобный и менингеальный), по мнению некоторых авторов, не вполне оправданно (Гранитов, 2000; Позняк и соавт., 2002).

Инкубационный период длится 7-14 дней, но может растягиваться до 1 месяца (Eugster, 1980). Пневмоническая форма орнитоза начинается остро, с повышения температуры до 38-39°C. Характерны головная боль, озноб, потливость, миалгии и артралгии, бессонница, заторможенность (или возбуждение), тошнота. На 2-4-й день болезни возникают сухой или со скудной слизистой мокротой кашель, боли в груди. При исследовании легких перкуторные изменения довольно скудные. Лишь при локализации очага воспаления ближе к периферии легких или при его массивности отчетливо слышно притупление перкуторного звука. Аускультативно определяются жесткое дыхание, рассеянные сухие хрипы и на ограниченном участке влажные мелкопузырчатые хрипы. Выявляются признаки пневмонии. Пневмония односторонняя, чаще в нижних долях. Она носит интерстициальный, реже – очаговый или субдолевой характер (Wainright et al., 1987). Поражение сердечно-сосудистой системы проявляется глухостью сердечных тонов, брадикардией (тахикардия расценивается как неблагоприятный признак). Артериальное давление снижается. Со стороны

Таблица 12.5.

## Клинические проявления орнитоза (Гранитов, 2000)

Период болезни, локализация поражений	Клинические проявления	Продолжительность
<i>Заражение респираторным путем</i>		
<i>Инкубационный период:</i> первичная локализация и репродукция возбудителя в ретикулоэндотелиальных клетках и эпителии нижних дыхательных путей	Отсутствуют	1–3 недели
<i>Начало болезни:</i> генерализация возбудителя, токсические и иммунопатологические реакции	Острое начало, лихорадка, развитие воспалительных изменений в легких, токсическое поражение ЦНС, сердечно-сосудистой системы, общая интоксикация, обнаружение возбудителя в крови и мокроте	5–7 дней
<i>Развитие болезни:</i> бактериемия и вторичная локализация возбудителя в паренхиматозных органах (печени и селезенке)	Развитие клинических симптомов острого периода болезни, обнаружение возбудителя в крови, в мокроте, в смывах из зева	7–10 дней
<i>Разрешение болезни:</i> уменьшение выраженности инфекционного процесса, развитие иммунных процессов	Уменьшение выраженности клинических проявлений, улучшение общего состояния; выявление специфических антител	1–2 недели
<i>Исход:</i> постепенное выздоровление	Слабовыраженные изменения в легких, сердечно-сосудистой системе, астения	1–2 месяца
<i>Рецидив болезни:</i> вторичная генерализация с менее выраженной общей и местной (в легких) реакциями	Повторение в более слабой степени клинических симптомов острого периода, выздоровление	4–5 дней
<i>Осложнения:</i> токсический миокардит, пневмосклероз, астеновегетативный синдром, тромбозы, гепатит, аборт у беременных, поражение внутренних органов	Рецидивы болезни без развития стойкого иммунитета	
<i>Латентная форма инфекции:</i> первично-латентная форма, вторично-латентная форма (носительство)	Инфицирование не вызывает типичного проявления болезни, нарастание специфических антител. Возможно проявление патологического процесса в легких. Стойко высокие титры антител. После перенесенной типичной острой формы болезни возбудитель длительное время остается в ткани органов (легкие, печень, селезенка). При снижении защитных сил организма наступает обострение инфекции	До 3 лет

желудочно-кишечного тракта отмечаются снижение аппетита, иногда полная анорексия, запор или понос. Язык утолщен, обложен серым налетом, края языка чистые, видны отпечатки зубов. У большинства больных наблюдается увеличение печени и селезенки. В крови определяется лейкопения или нормальное количество лейкоцитов, анэозинофилия; СОЭ обычно повышена. Течение и клинические проявления орнитоза показаны в табл. 12.5 (Гранитов, 2000).

Атипичные формы орнитоза протекают по типу менингопневмоний, пситтакозного менингита и пситтакозной инфекции без поражения легких. В первом случае у больных, наряду



с пневмонией, выражены признаки поражения ЦНС в виде резкой головной боли, рвоты, ригидности затылочных мышц, положительных симптомов Кернига, Брудзинского. При менингеальной форме отмечаются лишь менингеальные симптомы и интоксикация. Пситтакозный менингит обычно серозный. В цереброспинальной жидкости определяются небольшой цитоз, умеренное увеличение количества белка. Известны случаи пситтакозного менингоэнцефалита, при котором менингеальным явлениям сопутствуют очаговые симптомы, парезы и параличи (Vanrompay et al., 1995). Все эти формы встречаются крайне редко. Пситтакоз без поражения легких протекает с умеренной лихорадкой, болями в горле, мышечными болями, увеличением печени и селезенки. Наблюдается у 3-5% больных. Бессимптомная (субклиническая) форма острого пситтакоза обнаруживается лишь во время эпидемиологических вспышек в очаге инфекции при лабораторном обследовании. Хронические формы пситтакоза развиваются у 10% больных. Болезнь протекает в виде хронической пневмонии с симптомами бронхита или без пневмонии с интоксикацией, поражением различных органов и систем, астенизацией. Болезнь может длиться 3-5 лет и более. В некоторых случаях после перенесения острой пситтакозной пневмонии развивается постпситтакозная неспецифическая хроническая пневмония. При лечении достаточными дозами антибиотиков, активных в отношении хламидий, прогноз благоприятный. До эры антибактериальной терапии около 20% случаев заканчивалось летально (Grimes, 1994).

### 12.3.2. Заболевания, вызванные *Chlamydomypha felis*

В 1942 году Baker наблюдал несколько случаев атипичной пневмонии у людей после контакта с кошками, больными хламидиозом (Baker, 1944). В сыворотке крови больных людей были обнаружены антитела против возбудителя кошачьей хламидийной пневмонии (современное название *Chlamydomypha felis*). Позднее Schachter и соавторы описали случай острого фолликулярного конъюнктивита у владельца нескольких инфицированных хламидиозом кошек. Вначале заболел один из его котов, у которого развился конъюнктивит и ринит. Затем заболел его хозяин. Идентичный штамм хламидий был выделен как от этого пациента, так и от его кошек. Этим штаммом, пассированным в куриных эмбрионах, удалось вызвать экспериментальное заражение у здорового кота (Schachter et al., 1969). Хламидиоз, переданный человеку от кошек, может вызвать системную генерализованную инфекцию с эндокардитом и гломерулонефритом (Regan et al., 1978). Недавно Hartley и соавторы выделили *C. felis* от человека, больного конъюнктивитом, и от его кота. Проведенный молекулярно-генетический анализ показал полную идентичность этих двух изолятов. *C. felis* наиболее чувствительна к препаратам тетрациклинового ряда.

### 12.3.3. Заболевания, вызванные *Chlamydomypha abortus*

В литературе имеется несколько сообщений об абортах у женщин в результате зоонозного хламидиоза. Описаны также пневмонии в результате заражения от абортировавших овец (Mare, 1994). Одно из первых таких описаний – работа Giroud и Jadin (1954), изучавших аборт у скотоводов в бельгийском Конго. Одно из последних – аборт у жены фермера, разводившего овец в штате Монтана (США) (Jorgensen, 1997) и аборт у женщины, работавшей на ферме по разведению коз в швейцарских Альпах (Pospischil et al., 2002). Аборт,

как правило, происходят в сроке 14-36 недель и сопровождаются лихорадкой и общими явлениями. После аборта может развиваться пневмония. При инфекции *C. abortus* у людей описаны пневмонии и системные поражения со смертельным исходом в результате заражения от овец, коз и крупного рогатого скота (Barnes, Brainerd, 1964; Page, Smith, 1974; Villemonteix et al., 1990). Клиническая картина напоминает течение атипичного пситтакоза.

### ГЛАВА 13. ЛЕЧЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ (раздел написан совместно с Назарным А.Е.)

Лечение больных хламидиозами основано на общих принципах комплексной и индивидуальной терапии при инфекционных болезнях. Больным назначают этиотропную, патогенетическую и симптоматическую терапию. Выбор средств во многом зависит от патогенеза и развития осложнений заболевания. При назначении индивидуальной терапии используют средства комплексного лечения, которые необходимы конкретному больному в зависимости от локализации воспалительного процесса, характера патологических изменений, возникших в течение болезни, и общего состояния организма.

Хламидиоз – заболевание, при котором могут поражаться различные органы и ткани. Инфекция не ограничивается слизистой мочеполовых органов. Хламидии способны инфицировать моноциты крови и размножаться в них. Хламидии могут также инфицировать Т-лимфоциты и осуществлять в них продуктивный цикл развития. При этом функционирование клетки нарушается, что может быть одним из механизмов развития иммунодефицита при хламидийной инфекции. Обладая тропностью к эпителию, хламидии способны поражать и мезенхимальные клеточные элементы – гладкомышечные клетки и эндотелий сосудов.

Таким образом, хламидиоз следует рассматривать как системное заболевание и соответствующим образом подходить к этиотропной и патогенетической терапии, даже если клинические проявления ограничиваются локальными симптомами со стороны слизистой оболочки. Поэтому лечение хламидийной инфекции, в особенности хронической, осложненной – это очень трудная задача, которая под силу только специализированным лечебным учреждениям с солидной лабораторной и клинической базой. Для лечения больных хламидиозом нужны не только теоретические знания, а и клинический опыт. Надо не просто убрать хламидии из организма, но и ликвидировать последствия инфекции, помочь конкретному больному со всеми его проблемами.

В современной медицине четко проявляется «алгоритмизация» действий врача. В результате постоянного анализа и отбора постепенно формируется группа методов лечения, которые в данный момент являются наиболее эффективными, безопасными и экономичными. Наиболее оптимальные в настоящий момент методы лечения получили название стандартов. Диагностические и лечебные стандарты помогают решать экономические и правовые проблемы, связанные с оказанием медицинской помощи (в частности, вопросы страховой компенсации затрат). Как справедливо отмечает Аковбян: «В обычных условиях стандарты позволяют оказать лечебно-диагностическую помощь на уровне самых высоких достижений мировой науки, затрачивая при этом минимум средств. В критических ситуациях автоматизм действия врача часто является единственно правильной стратегией поведения, которая помогает сохранить жизнь пациента» (Аковбян, 2002). Однако применение стандартов не должно ограничивать врача в принятии решений. Он должен иметь возможность учитывать особенности конкретного случая,

свой клинический опыт при назначении лечения. Кроме того, стандарты не должны служить «прикрытием» неправильных действий врача в «нестандартных» ситуациях, когда он должен сам принять решение, а не слепо следовать стандартам.

Лечение хламидийной инфекции во многих странах регламентировано соответствующими нормативными документами государственных органов здравоохранения и рекомендациями неправительственных организаций, объединяющих соответствующих специалистов. Примерами таких документов являются:

- European guidelines for management of *Chlamydial* infection. International Journal of STD and AIDS, 12(Suppl.3): 30-34.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. MMWR, 2002, 51(No. RR-6): 32-36.
- Clinical Effectiveness Guideline for the Management of *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infection. Clinical Effectiveness Group. Association for Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases. UK, 2000.
- National Guideline for the Management of *Lymphogranuloma Venereum* (LGV). Clinical Effectiveness Group (Association for Genitourinary Medicine and the Medical Society for the Study of Venereal Diseases). UK, 2000.
- Диагностика, лечение и профилактика заболеваний, передаваемых половым путем. Методические материалы. Под ред. К.К. Борисенко. М., Ассоциация САНАМ, 1998. – 188 с.
- Методические материалы по диагностике и лечению наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путем. Ред.: Серов В.Н., Кубанова А.А., Российская Ассоциация акушеров-гинекологов. – М. – 2001.
- Препараты для лечения урогенитального хламидиоза. В кн: Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система), Вып. 2, ГОЭТАР МЕДИЦИНА, М. – 2001. – С. 491-492.
- Методики лікування і профілактики інфекцій, які передаються статевим шляхом. Сост. І.І. Мавров, Г.І. Мавров, Л.Д. Калюжна, В.Г. Коляденко та ін. Харків: ФАКТ. – 2001. – 55 с.

При разработке национальных стандартов лечения ИППП использованы рекомендации ВОЗ, США, Европейского сообщества. Предлагаемые методы лечения прошли все клинические испытания, необходимые с позиций доказательной медицины (включая рандомизированные многоцентровые исследования), однако их применение должно учитывать национальный опыт и особенности местного фармацевтического рынка. В любом стандарте лечения и диагностике необходимо учитывать затраты, которые общество или сам больной несет в связи с заболеванием. Фармакоэкономика является вторым по важности фактором после оценки эффективности лечения. Высокая эффективность, доступная цена, низкая токсичность и хорошая переносимость, а также медленное развитие устойчивости возбудителя – вот свойства идеального препарата. Ни один из препаратов для лечения хламидиоза не отвечает всем этим требованиям в самой высокой степени. Однако это не значит, что невозможно подобрать оптимальный препарат и схему лечения конкретному больному. Когда врач рассматривает препараты с равным действием и начинает отдавать предпочтение одному препарату перед другим, он должен учитывать весь комплекс как отрицательных, так и положительных свойств, которые и определяют выбор в данной ситуации.

В России стандарты этиотропного лечения урогенитального хламидиоза описаны в Федеральном руководстве по использованию лекарственных средств (Вып. 2, раздел 10.11, с. 491-492).

#### **Доксициклин (*doxycycline*)**

Дозы и применение. Внутрь 100 мг каждые 12 ч в течение 7-10 дней при неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве основного препарата. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов в течение 14-21 сут.

#### **Тетрациклин (*tetracycline*)**

Дозы и применение. Внутрь 500 мг каждые 6 ч в течение 7-10 дней при неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве альтернативного препарата. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов в течение 14-21 сут.

#### **Азитромицин (*azithromycin*)**

Дозы и применение. Внутрь однократно 1 г при неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве основного препарата. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза по 1 г 1 раз в неделю в течение 3 нед.; курсовая доза 3 г.

#### **Эритромицин (*erythromycin*)**

Дозы и применение. При неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве основного препарата взрослым и детям старше 8 лет (с массой тела 45 кг и более) внутрь 500 мг каждые 6 ч в течение 10 дней. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов в течение 14-21 сут. Детям до 8 лет (при массе тела менее 45 кг) 50 мг/кг каждые 6 ч в течение 10-14 дней.

#### **Спирамицин (*spiramycin*)**

Дозы и применение. При неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве альтернативного препарата внутрь 3000 000 МЕ 3 раза в сутки в течение 10 дней. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов 14-21 сут.

#### **Рокситромицин (*roxithromycin*)**

Дозы и применение. При неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве альтернативного препарата внутрь 150 мг каждые 12 ч в течение 10 дней. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов в течение 14-21 сут.

#### **Офлоксацин (*ofloxacin*)**

Дозы и применение. При неосложненном хламидиозе нижних отделов мочеполовой системы в качестве альтернативного препарата внутрь 400 мг каждые 12 ч в течение 7-10 дней. При хламидиозе верхних отделов мочеполовой системы, органов малого таза и других органов 14-21 сут.



В Украине лечение урогенитальной хламидийной инфекции, передающейся половым путем, регламентируется документом «Методики лікування і профілактики інфекцій, які передаються статевим шляхом», который был утвержден Министерством здравоохранения и Академией медицинских наук Украины в 2001 году (Мауров, 2001). Ниже приводится раздел, посвященный лечению хламидиоза.

*Chlamydia trachomatis* – облигатный внутриклеточный паразит, которому присуща устойчивость ко многим антибиотикам. Хламидиоз в настоящее время является самой распространенной половой инфекцией. По некоторым оценкам, 12-15% всего населения инфицировано хламидиями. Приблизительно в 60% случаев инфекция явного беспокойства не приносит, пока не начнутся осложнения в виде воспаления органов малого таза, внематочной беременности, бесплодия, простатита, эпидидимита или артрита. Лечение хламидийной инфекции, в особенности хронической, осложненной – это непростая задача, которая по силам только специализированным лечебным учреждениям. Лечение больных хламидиозом в частных кабинетах должно быть ограничено.

При мочеполовом хламидиозе применяют этиотропную, патогенетическую и симптоматическую терапию. Результаты лечения зависят не только от своевременности установления диагноза заболевания, но и от интенсивности и достаточной продолжительности терапии. Выбор средств терапии определяется наличием осложнений. Используют те средства, которые необходимы конкретному больному, в зависимости от локализации воспалительного процесса, характера патологических изменений и общего состояния организма. Наибольшее значение в этиотропной терапии урогенитальной хламидийной инфекции имеют антибиотики тетрациклинового ряда, макролиды, фторхинолоны. Курс лечения длится 14-21 день (при простатитах и болезни Рейтера – до 1 месяца и больше). При необходимости курсы лечения повторяют.

Болезнь Рейтера – хроническое заболевание, склонное к рецидивам, которое характеризуется сочетанным поражением мочеполовых органов (уретрит, простатит, вульвовагинит), суставов (реактивный артрит), глаз (конъюнктивит, увеит, ирит), а также нередко кожи и слизистой оболочки (баланит, кератодермия, эрозии полости рта).

Лечебные мероприятия при болезни Рейтера можно условно разделить на 3 основных направления:

*Антибактериальная терапия;*

*Противовоспалительная терапия суставного процесса;*

*Реабилитация.*

Антибактериальная терапия хламидийной и/или микоплазменной инфекции проводится препаратами, описанными в соответствующих разделах. При болезни Рейтера применение этих препаратов должно подчиняться следующим принципам:

- максимальные суточные дозы;
- продолжительность терапии 4-6 недель (определяется индивидуально для каждого больного);
- преимущественно внутривенное введение лекарственных препаратов.

Рекомендуется назначение иммуномодуляторов (тималин, левамизол), индукторов интерферона (циклоферон, неовир), ультрафиолетового облучения крови, внутривенной и надвенозной квантовой терапии, а также адаптогенов. Для улучшения проникновения антибиотика в зону воспаления используются протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, вобензим).

Совместно с курсом противобактериальной терапии необходимо применение противогрибковых препаратов, гепатопротекторов, антигистаминных препаратов, транквилизаторов и поливитаминов.

Для подавления воспалительной активности суставного процесса в основном используются препараты следующих трех групп:

- нестероидные противовоспалительные препараты;
- кортикостероиды (глюкокортикоиды);
- базисные препараты и цитостатики.

К группе нестероидных противовоспалительных препаратов относят индометацин, ибупрофен, диклофенак, пироксикам, кетопрофен и др. При лечении препараты этой группы назначаются преимущественно в виде свечей или в таблетках. При значительной выраженности воспалительного процесса, в особенности в острой стадии, возможно применение инъекционных форм. С целью предупреждения резистентности рекомендуется каждые 10 сут. изменять применяемые препараты. Глюкокортикоиды (преднизолон, триамцинолон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон и др.) допустимо применять в острой стадии и фазе обострения короткими курсами на протяжении 5-7 дней, с постепенным снижением дозы и переходом на нестероидные противовоспалительные средства. При этом должны строго учитываться противопоказания к стероидной терапии. Базисные препараты и цитостатики применяются при затяжных и хронических формах болезни Рейтера, при недостаточной эффективности вышеперечисленных методов лечения. К ним относятся хинолоновые производные – далагил, плаквенил, Д-пеницилламин, соли золота, метотрексат и др. Назначаются физиотерапевтические процедуры на пораженные суставы. Используется фонофорез протеолитических ферментов и кортикостероидов, ультравысокие частоты, магнитное поле, инфракрасный лазер, а также согревающие компрессы с мазями обезболивающего действия. Реабилитационные мероприятия должны быть направлены на восстановление функции опорно-двигательного аппарата. Лечебную физкультуру назначают на самых ранних этапах заболевания, и ее объем постепенно увеличивают по мере стихания воспалительного процесса в суставах. При мышечных атрофиях проводится лечебный массаж. Больным показано санаторно-курортное лечение после снятия воспалительного суставного синдрома (радоновые, сероводородные ванны, грязелечение).

При лечении большими дозами антибиотиков широкого спектра действия необходимо учитывать возможность возникновения дисбактериоза и кандидоза и назначать надлежащее лечение. Больным, которые продолжительное время получают высокие дозы антибиотиков широкого спектра действия (тетрациклины, хинолоны, макролиды), рекомендован прием эссенциале-Н в дозе 300-600 мг 3 раза в день, начиная за 1 неделю и заканчивая через 1 неделю после антибиотикотерапии.

При противопоказаниях к применению тетрациклинов, фторхинолонов (беременные, кормящие, новорожденные, дети до 14 лет) или при развитии побочных явлений назначают макролиды. Приводятся приблизительные разовые и курсовые дозы антибактериальных средств для лечения хламидиоза.

#### **Тетрациклины:**

*Тетрациклин* 2-2,5 г в сут. – 14-21 день, необходимость принимать препарат 4 раза в сут. и плохая переносимость ограничивает его применение.

*Доксициклин (вибрамицин, доксибене, юнидокс)* – 0,2-0,3 г в сут. – 14-21 день, внутривенное введение повышает эффективность, лучше воспринимается больными.

#### **Фторхинолоны:**

*Ципрофлоксацин (ципринол), офлоксацин (таривид, заноцин), пефлоксацин (пеллацин, абактал)* – 0,2-0,5 г. внутрь или в/в два раза в сут. – 10-14 дней.

Фторхинолоны, которые выводятся преимущественно с мочой, могут назначаться продолжительными курсами: *нофлоксацин (нолицин, уробацид)* в суточной дозе 0,8 г могут приниматься больными до 5-8 недель и больше при хронических простатитах и аднекситах.

#### **Макролиды:**

*Эритромицин* – 2,0-2,5 г в сут. – 14-21 день, необходимость принимать препарат 4 раза в сут., побочные реакции со стороны желудочно-кишечного тракта ограничивает его применение.

*Азитромицин (сумамед)* – 0,5-1,0 г/сут.;

*джозамицин (вильпрофен)* – 1,2-1,5 г /сут.;

*klarитромицин (фромилд, клацид)* – 0,5-1,0 г/сут.;

*рокситромицин (рулид)* – 0,3-0,45 г/сут.;

*спирамицин (ровамицин)* – 6-9 млн. ЕД/сут.;

*мидекамицин (макропен)* – 1,2-1,6 г/сут.

#### **Антибиотики разных фармакологических групп:**

*Рифампицин* – 0,9-1,2 г в сут. на протяжении 3-5 недель.

*Клиндамицин (далацин)* – внутривенно или перорально 0,6 г каждые 8 часов, курс лечения – 10-14 дней.

Терапия включает также коррекцию иммунной системы, физиотерапевтическое и местное лечение, борьбу с сопутствующими заболеваниями, конгестивными явлениями в тазовых органах, здоровый образ жизни, соответствующую диету (с запретом спиртных напитков и пряностей).

С учетом обсуждения и согласования, рекомендуемые средства лечения хламидиоза и методики их применения фактически отражают информацию, которая «опаздывает» на

5–7 лет. За это время появляются новые препараты, активные в отношении хламидий. Накапливаются результаты новых клинических испытаний при лечении различных форм хламидиозов. В данном разделе освещены вопросы лечения хламидийных инфекций с учетом самых последних данных.

### 13.1. ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ

При хламидийной инфекции антибактериальная терапия является обязательным и главным компонентом лечения. На нынешнем этапе развития медицины это, безусловно, так, какое бы значение отдельные научные авторитеты ни придавали иммунотропной, местной и другой патогенетической терапии при хламидиозе. Воздействие на защитные силы организма, в частности, на состояние иммунной системы, является важным компонентом лечения хламидийной инфекции, в особенности хронической, осложненной. Но без адекватной, достаточной антибактериальной терапии нельзя добиться элиминации возбудителя и вылечить хламидиоз. Другое дело, что антибактериальная терапия должна быть рациональной, обоснованной, учитывать все отрицательные последствия и побочные эффекты, а также возможность персистенции возбудителя (Кисина, 1998; Глазкова, Акилов, 1999; Мавров, 2001).

Этиотропная терапия хламидиозов имеет специфические особенности, обусловленные биологическими свойствами возбудителя. Obligатный внутриклеточный паразитизм хламидий требует применения больших доз антибиотиков и продолжительного срока лечения. При лечении хламидийной инфекции приходится сталкиваться со многими проблемами. Это высокая частота рецидивов (до 40%), наличие резистентных форм хламидий к существующим препаратам, снижение иммунитета и необходимость применения высоких доз антибиотиков. Сложности, возникающие при лечении больных хламидийной инфекцией, обусловлены следующими факторами:

- Высокая распространенность хламидиоза. По некоторым оценкам, 15% всего населения инфицировано хламидиями.
- Как правило, малосимптомное течение вначале, и лишь потом наступает аднексит, простатит, эпидидимит или артрит.
- Внутриклеточный характер паразитирования хламидий со склонностью к персистенции. Персистенция возможна не только в эпителиальных клетках – основных мишенях для хламидий, – но и в эндотелии сосудов, в макрофагах, клетках соединительной ткани.
- Частое сочетание хламидиоза с другой инфекцией – микоплазмами, трихомонадами, условнопатогенной бактериальной флорой.
- Высокая частота экстрагенитальной патологии у больных хламидиозом, которая нуждается в тщательной диагностике и лечении.
- Необходимость тщательного подбора антибактериальных препаратов, применения высоких доз, обязательное подключение патогенетической терапии, в том числе и физических методов, стимуляция защитных сил организма.

Поскольку хламидиоз – бактериальная инфекция, то основой ее терапии являются антибиотики. Однако их эффективность со временем снижается. Это связано с тем, что хламидии приобретают устойчивость к антибиотикам. Причем эти резистентные штаммы могут вызывать



заболевания у других людей, а факторы резистентности могут передаваться от одних штаммов к другим. И хотя пока неизвестны представители *Chlamydiales*, устойчивые ко всем доступным антибиотикам, но количество резистентных штаммов растет, и длительно применяемые антибиотики постепенно теряют свою эффективность. Безрецептурная продажа является синонимом бесконтрольного применения антибиотиков и прямой причиной роста устойчивости к ним бактерий, в том числе и хламидий (Jones et al., 1990).

Основные ошибки в области терапии хламидиоза связаны с предрассудками и неверными представлениями в отношении антибиотиков вообще и их действия на возбудитель и макроорганизм. «Мифы», которые сложились вокруг антибактериальной химиотерапии, тиражируются в печати и годами передаются от врача к врачу. Наиболее распространенные заблуждения таковы (Страчунский, 1999; Мавров, Нагорный, 2002):

- Все антибиотики сильно угнетают иммунитет, поэтому их длительное применение весьма опасно. Между тем это не соответствует действительности. Доказано, что макролиды, в частности кларитромицин, джозамицин и спирамицин обладают иммуномодулирующими свойствами и способны стимулировать определенные звенья иммунной системы.
- Все антибиотики токсичны. На самом деле относительно незначительной токсичностью из антибиотиков, действующих на хламидии, обладают только тетрациклины и фторхинолоны.
- Все антибиотики вызывают аллергию. Аллергии к антибиотикам **ВООБЩЕ** не существует, так как к ним относятся разные по структуре вещества. Пациенту в большинстве случаев можно подобрать другой антибактериальный препарат.
- Антибиотики всегда следует назначать вместе с противогрибковыми и антигистаминными препаратами. Однако доказано, что последние не предотвращают развития сенсibilизации, они лишь ослабляют проявления аллергической реакции, воздействуя на ее последнюю патофизиологическую фазу. Необоснованное применение антигистаминных и противогрибковых препаратов совместно с антибиотиками ведет к полипрагмазии, излишней нагрузке на организм и необоснованным затратам.

Для лечения хламидийной инфекции применяют антибиотики тетрациклинового ряда, макролиды и фторхинолоны. Рифампицины, также проявляющие высокую антихламидийную активность, оценивают как антибиотики глубокого резерва вследствие необходимого сохранения их в запасе для лечения туберкулеза. Бета-лактамы подавляют рост хламидий *in vitro*, однако вызывают L-подобную трансформацию и способствуют развитию персистентной инфекции. Поэтому они не рекомендованы для лечения хламидийной инфекции, за исключением отдельных случаев (например, лечение беременных, не переносящих макролиды, амоксициллином).

Один препарат, каким бы эффективным он ни был, не решит всех проблем лечения хламидиоза. В арсенале врача должны быть антибиотики, имеющие разный механизм действия. В каждой из фармакологических групп, действующих на хламидии, появляются новые субстанции, которые более эффективны и безопасны, чем предыдущие. Подбор антибиотиков и других средств для лечения конкретного больного осуществляется на основании многих факторов, и здесь не может быть полостью готовых и законченных схем. Предлагаемые ниже методики лишь помогают врачу сделать правильный выбор. Оценка противохламидийных

препаратов является трудной задачей. Нередко данные различных авторов варьируют в довольно широких пределах. Это происходит потому, что контингент больных, подвергаемых лечению, заметно отличается (давность заболевания, клинические формы болезни, неадекватное лечение в анамнезе). Большое значение имеют различия в качестве препаратов, содержащих данную субстанцию.

### 13.1.1. Тетрациклины

Тетрациклины являются одними из первых антибиотиков, поскольку были открыты в середине 1940-х годов. В основе химического строения тетрациклинов лежит конденсированная 4-циклическая химическая структура – тетрациклин (рис. 13.1).

Первый из антибиотиков этой группы – хлортетрациклин – был выделен из культуральной жидкости *Streptomyces aureofaciens*. В дальнейшем окситетрациклин был выделен из *S. rimosus*. Другие тетрациклины были получены как природные молекулы из различных видов стрептомицет (*S. aureofaciens*, *S. rimosus* и *S. viridofaciens*). С целью улучшения водорастворимости, для лучшей всасываемости и возможности парентерального применения были получены полусинтетические аналоги природных тетрациклинов – метациклин, доксициклин и миноциклин (Chopra et al., 1992; Hlavka et al., 1992) (табл. 13.1).

Тетрациклина гидрохлорид отличается от тетрациклина-основания лучшей растворимостью в воде. Метациклин и доксициклин являются полусинтетическими производными тетрациклина. Доксициклин используют в виде двух солей – гидрохлорида и моногидрата. В капсулах используют доксициклина гидрохлорид или гиклат, в то время как порошок для приготовления других пероральных форм представляет собой моногидрат доксициклина. Существенных различий в их действующем начале нет. Однако между представителями группы тетрациклинов имеются фармакодинамические и фармакокинетические различия (Машковский, 1993; Finch, 1997; Страчунский и соавт., 2000; Гомберг, Соловьев, 2001). Показатели всасывания доксициклина превосходят таковые у других тетрациклинов. Биодоступность доксициклина под влиянием пищи не меняется, а у тетрациклина снижается в 2 раза (Страчунский и соавт., 2000). Максимальные концентрации препаратов в сыворотке крови достигаются через 1-3 часа после приема внутрь.

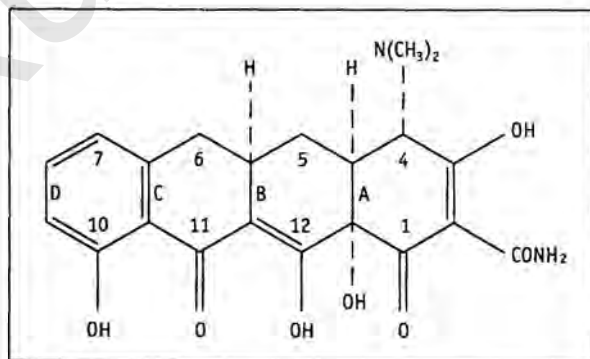


Рисунок 13.1. Формула 6-деокси-6-диметилтетрациклина – структурной основы всех тетрациклинов (Mitscher, 1978)

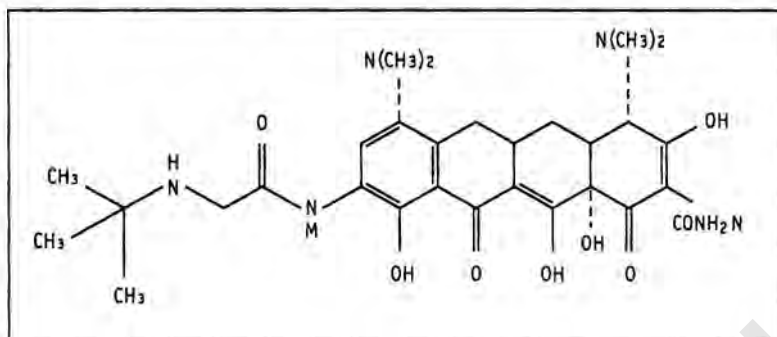
Таблица 13.1

## Основные представители класса тетрациклинов

Химическое название	Непатентованное название	Оригинальное торговое название	Год открытия	Путь введения
7-Chlortetracycline	Chlortetracycline	Aureomycin	1948	Пероральный
5-Hydroxytetracycline	Oxytetracycline	Terramycin	1948	Пероральный и парентеральный
+Tetracycline	Tetracycline	Achromycin	1953	Пероральный
6-Demethyl-7-chlortetracycline	Demethylchlortetracycline	Declomycin	1957	Пероральный
2-N-Pyrrolidino-methyltetracycline	Rolitetracycline	Reverin	1958	Пероральный
2-N-Lysinomethyltetracycline	Limecycline	Tetralysal	1961	Пероральный и парентеральный
N-Methylol-7-chlortetracycline	Clomocycline	Megaclor	1963	Пероральный
6-Methylene-5-hydroxytetracycline	Methacycline	Randomycin	1965	Пероральный
6-Deoxy-5-hydroxytetracycline	Doxycycline	Vibramycin	1967	Пероральный и парентеральный
7-Demethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline	Minocycline	Minocin	1972	Пероральный и парентеральный
9-(t-butylglycylamido)-minocycline	Tertiary-butylglycylamido-minocycline	Tigilcycline	1993	Клинические испытания

Последнее поколение тетрациклинов – это глицилциклины, содержащие 9-глициламидную группу (рис. 13.2). Они были открыты в 1993 году, запатентованы компанией Lederle Laboratories (современное название – American Home Products) (Barden et al., 1994). Клиническое применение глицилциклинов (тигилциклин) началось в 1999 году (Johnson, 2000; Chopra, Roberts, 2001).

Все тетрациклины хорошо проникают в органы и ткани – печень, селезенку, предстательную железу, а также в биологические жидкости: желчь (концентрация в 5–20 раз выше, чем в крови), синовиальную жидкость. Доксциклин создает более высокие тканевые концентрации, чем тетрациклин. Препараты тетрациклинового ряда плохо проникают в спинномозговую жидкость – 10–20% от уровня в сыворотке (Страчунский и соавт., 2000). После приема тетрациклина гидрохлорида внутрь до 66% принятой дозы всасывается, 65% связывается с белками плазмы. Метациклин, по сравнению с тетрациклином, лучше всасывается после приема внутрь и дольше сохраняется в крови (Машковский, 1993). Доксциклина моногидрат также хорошо всасывается. Прием пищи или молока существенно не сказывается на биодоступности этого антибиотика. Максимальный уровень концентрации – 2,6–3,0 мкг/мл – достигается через 2 ч. В течение суток концентрация снижается вдвое – до 1,5 мкг/мл. Биодоступность доксициклина моногидрата может достигать до 95%. Терапевтическая концентрация при многократном приеме удерживается на постоянном уровне, независимо от изменения биологических



**Рисунок 13.2.** Тигилциклин (9-*t*-бутилглициламиноциклин) – представитель глицилциклинов – нового поколения тетрациклинов

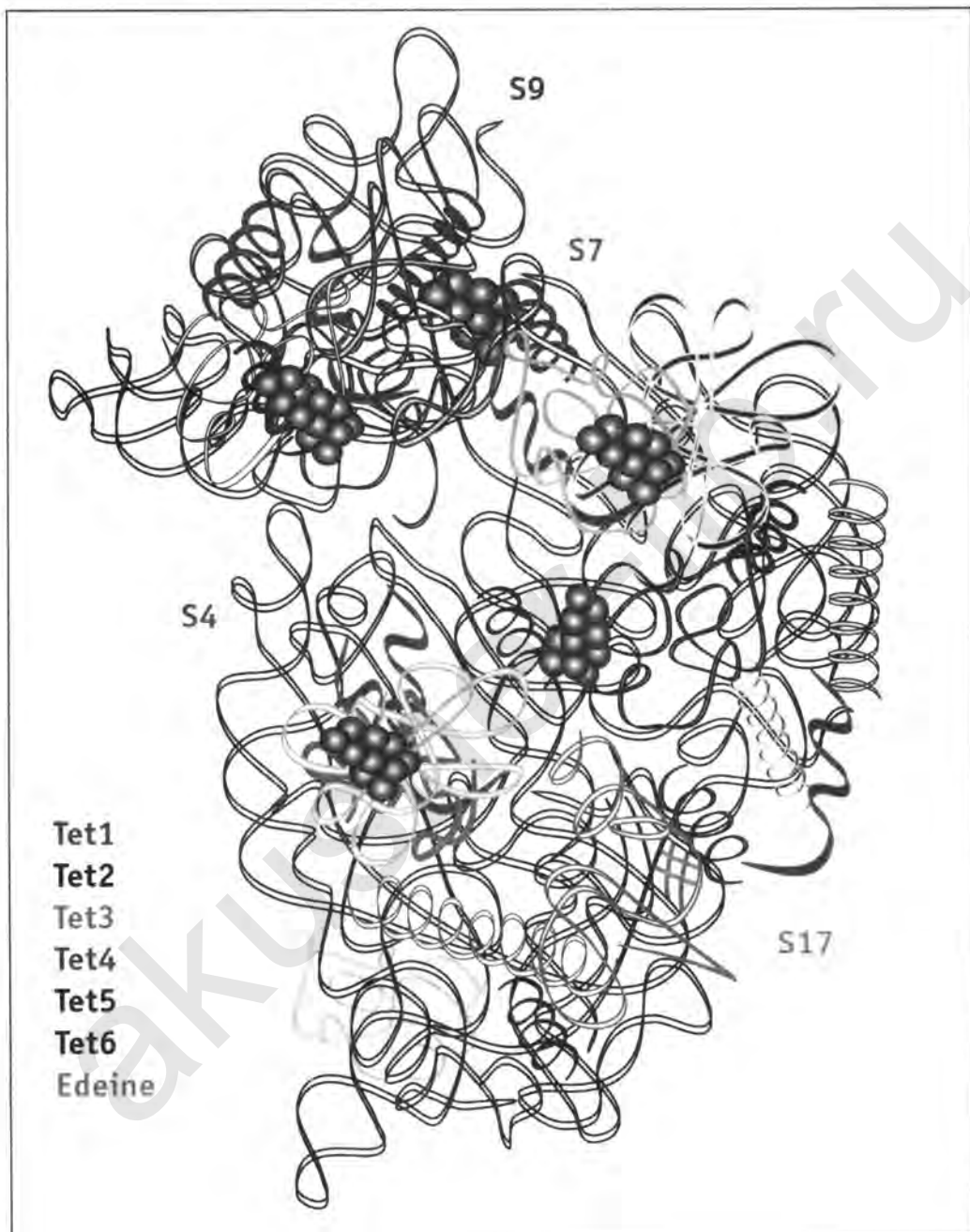
условий (бодрствование, сон, прием пищи, физическая активность). Благодаря своим липофильным свойствам, препарат хорошо проникает в органы и ткани, в частности, в органы малого таза у женщин и в предстательную железу. Выводится доксициклин в неметаболизированном виде с мочой – 35-60% и в измененном виде с калом – 20-60%. (Машковский, 1993).

Механизм антибактериального действия тетрациклинов идентичен для всех представителей этой группы. Они взаимодействуют с 30S-субъединицами бактериальных рибосом и блокируют присоединения аминоацильной тРНК к рибосоме в области акцепторного сайта А. В результате происходит нарушение встраивания новых аминокислот в полипептидную цепь, и синтез белка в бактериальной клетке нарушается (Schnappinger, Hillen, 1996; Chopra, Roberts, 2001; Pioletti et al., 2001) (рис. 13.3 и 13.4).

Чтобы оказать действие при хламидийной инфекции, тетрациклины должны сначала проникнуть внутрь эукариотной клетки-хозяина, а затем внутрь хламидийной клетки. Внутриклеточное расположение хламидий затрудняет проникновение тетрациклинов в мишень. Этим объясняется необходимость повышенных доз при лечении хламидийных инфекций. Тетрациклины пересекают клеточные мембраны благодаря слабым липофильным свойствам их молекул. Наружную мембрану хламидий они, вероятно, пересекают через *Omp*-каналы порин. Это происходит благодаря тому, что тетрациклины способны образовывать хелатные комплексы с ионами металлов. Предполагается, что положительно заряженный комплекс тетрациклина с магнием проникает через наружную мембрану и накапливается в периплазматическом пространстве. Затем этот комплекс распадается, и нейтральная липофильная молекула тетрациклина проникает через билипидный слой внутренней цитоплазматической мембраны. Этот процесс энергозависимый и происходит благодаря градиенту pH (Levy, 1984; Schnappinger, Hillen, 1996; Chopra, Roberts, 2001). В цитоплазме хламидийной клетки вновь образуется хелатный комплекс, поскольку там выше pH и концентрация двухвалентных ионов магния, чем вне бактериальной клетки. Предполагается, что в виде комплекса с катионом магния тетрациклин связывается с рибосомами. Связь тетрациклина с рибосомами обратимая, чем и объясняется его бактериостатическое, а не бактерицидное действие.

Ряд тонких исследований с использованием рентгеноструктурного анализа и химических меток позволил установить места связывания и характер взаимодействия тетрациклинов с 30S-субъединицей рибосом. Это рибосомальный белок 7S, а также основания – гуанин в позиции





**Рисунок 13.3.** Пространственная структура 30S рибосомной субъединицы, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 3,2 А. Показаны места связывания молекул тетрациклина (Tet1-Tet6) с 30S-субъединицей рибосомы – Tet1-Tet6, а также рибосомальные белки, взаимодействующие с тетрациклином и эдеином (S4, S7, S9 и S17) (Pioletti et al., 2001).

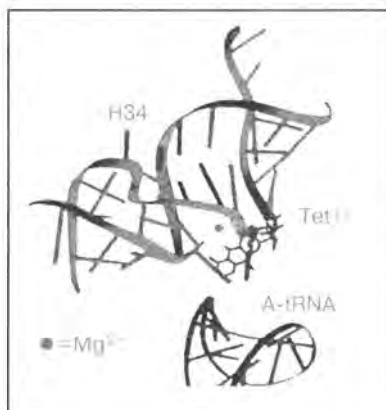
693 (G693), аденин в позиции 892 (A892), урацил в позиции 1052 (U1052), цитозин в позиции 1054 (C1054), а также G1300 и G1338. Трехмерная структура 30S- субъединицы рибосом образует «карманы», связывающие молекулы тетрациклина (Moazed, Noller, 1987; Chopra et al., 1992; Oehler, et al., 1997). Pioletti и соавторы (2001) с помощью рентгеноструктурного анализа определили места связывания тетрациклина с 30S-субъединицей рибосомы – Tet1-6. (Pioletti et al., 2001) (рис. 13.3; табл. 13.2). Однако не все места связывания определяют антибактериальное действие тетрациклина (Schnappinger, Hillen, 1996). Известно, что таковым является связывающий сайт Tet-1, который локализован в «кармане», образованном нуклеотидными остатками 1054–1056 и 1196–1200 петли H34, а также остатками 964–967 петли H31. Основания 1196 и 1054 выступают из петли H34 по направлению к А-сайту связывания транспортной РНК и формируют «зажим», который удерживает молекулу тетрациклина с помощью гидрофобных взаимодействий. После связывания тетрациклина расстояние между основаниями 1196 и 1054 увеличивается, что препятствует присоединению транспортной РНК и останавливает синтез белка в микробной клетке (рис. 13.4).

Таблица 13.2

**Места связывания тетрациклина 30S-субъединицей рибосомы бактерий на основании данных рентгеноструктурного анализа и биохимических исследований (Pioletti et al., 2001)**

Лиганд	Относительный размер*	Локализация в структуре 30S – субъединицы по данным рентгеноструктурного анализа	Биохимические данные
Tet-2	1,0	A964-G966 (H31), G1053, C1054 (H34), A1196-G1198 (H34)	Усиленная реактивность U1052 и U1054 (Moazed and Noller, 1987); мутация G1058C, вызывающая резистентность к тетрациклину (Ross et al., 1998); подавление перекрестного связывания C967 & 1400 (Noah et al., 1999)
Tet-2	0,7	Lys85, Val192-Leu96 and Leu188 (S4)	—
Tet-3	0,65	C1162-G1164 (H40), G1172-G1174 (H40)	—
Tet-4	0,53	G942, G942 (H29), C1342, G1343 (H29), A1349-U1351 (H43), Gln124 (S9)	Перекрестное связывание G1338 (Oehler et al., 1997)
Tet-5	0,41	U244-G247 (H11), G894-G896 (H27)	Защита против химической модификации A892 (Moazed and Noller, 1987); снижение перекрестного связывания U244 & 894 (Noah et al., 1999); Перекрестное связывание к G890 (Oehler et al., 1997)
Tet-6	0,41	A937-A938 (H28/H29), C1378-U1380 (H28), Arg4, Arg5 (S7), Arg120 (S9)	Фотохимическое перекрестное связывание: S7 (Goldman et al., 1983); подавление перекрестного связывания 967 & 1400 (Noah et al., 1999)

\* – Размер относительно Tet-1



**Рисунок 13.4.** Пространственная структура участка связывания Tet1 с 30S-рибосомной субъединицей, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 3,2 А

Тетрациклин является прокариотным антибиотиком и не оказывает выраженного влияния на эукариоты. Тем не менее он в незначительной степени подавляет синтез белка в эукариотной клетке, поддерживаемый 80S-рибосомами (van den Bogert, Kroon, 1981). Однако этот эффект не проявляется при применении терапевтических доз, поскольку тетрациклин не аккумулируется в клетках млекопитающих (Franklin, 1966). Тетрациклин подавляет синтез белка в митохондриях, воздействуя на 70S-рибосомы в этих органеллах. Этим объясняется слабое антипротозойное действие тетрациклина на *P. falciparum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Leishmania major*, *Trichomonas vaginalis*, *Toxoplasma gondii* (Edlind, 1991; Bunnag et al., 1996; Pukrittayakamee et al., 1996).

Резистентность к тетрациклинам следует учитывать при лечении хламидийных инфекций. До середины 1950-х годов большинство патогенных и комменсальных бактерий были чувствительны к тетрациклину (Levy, 1984). Hughes и Datta (1983) провели исследование 433 штаммов *Enterobacteriaceae*, которые были собраны с 1917 по 1954 год – то есть в доантибиотическую эру. Из них резистентными к тетрациклину оказалось 2% штаммов. Dancer и соавторы охарактеризовали свойства колибацеллярных бактерий, «законсервированных» в арктических льдах Гренландии десятки тысяч лет назад. Авторы не обнаружили штаммов, устойчивых к тетрациклину. Эти данные свидетельствуют, что феномен резистентности в эволюционном смысле является новым и связан с массовым неконтролируемым применением антибиотиков для лечения самых различных заболеваний. Показательный пример. В Норвегии с населением чуть более 4 миллионов человек только для лечения людей (исключая антибиотики, применяемые в сельском хозяйстве) в 1996 году было назначено 35 тонн (!) антибиотиков, из них 32 тонны – перорально (Grave et al., 1999). Широкое применение антибиотиков, имеющих значение в медицине, для лечения и профилактики болезней животных, а также добавление тетрациклинов и фторхинолонов в корм скоту и птице в качестве «стимуляторов роста» усиливает проблему селекции устойчивых возбудителей инфекций человека. Массовое появление устойчивых возбудителей болезней животных обуславливает передачу генетических факторов резистентности антропофильным микроорганизмам, поскольку они существуют в общих экосистемах и могут обмениваться генетическим материалом (Swann, 1969; Gustafson, 1991; Witte, 1998; Molbak et al., 1999; Fey et al., 2000).

Тетрациклины наиболее часто применяются для лечения хламидийных инфекций у людей и животных. Появление устойчивых к тетрациклину хламидий представляет большую опасность, поскольку для лечения хламидиозов, вызванных даже чувствительными штаммами, требуются высокие дозы тетрациклинов. Устойчивость *Chlamydia* к препаратам тетрациклинового ряда известна, однако существенного клинического значения она пока не имеет. До настоящего времени известно 9 документированных случаев выделения хламидий, устойчивых к тетрациклину и его дериватам от больных людей. В 1990 году Jones и соавторы выделили 5 штаммов *C. trachomatis*, имеющих повышенную устойчивость к тетрациклину, доксициклину, эритромицину, сульфаметоксазолу и клиндамицину. Штаммы были получены от больных, у которых лечение было неэффективным. (Jones et al., 1990). Следующий штамм *C. trachomatis*, устойчивый к тетрациклину, но чувствительный к эритромицину, азитромицину и офлоксацину, был выделен во Франции в 1997 году (Lefevre, Lepargneur, 1998). Somanі и соавторы (2000) изолировали три урогенитальных штамма *C. trachomatis*, устойчивых к доксициклину, азитромицину и офлоксацину.

Lenart и соавторы (2001) выделили от домашних свиней (*Sus scrofa*) в штате Небраска (США) хламидии с выраженной устойчивостью к тетрациклину. *Chlamydia suis* R19 и R27 свободно росли в культуре клеток с концентрацией тетрациклина 4 мкг/мл. Чувствительный штамм *Chlamydia suis* S45 и серовар L2 (LGV-434) *Chlamydia trachomatis* не росли при концентрации тетрациклина 0,1 мкг/мл. Штаммы *C. suis* R19 и R27 очень близки к *C. trachomatis* по своим биологическим характеристикам – морфологии включений, которые они образуют в инфицированных клетках, динамике роста, антигенным характеристикам. Однако они имеют определенные генетические различия, что заставило выделить их в отдельный вид рода *Chlamydia* (Everett, 2000; Bush, Everett, 2001). Было показано, что устойчивый к тетрациклину штамм *C. suis* R19 и чувствительный *C. trachomatis* L2 могут инфицировать одну и ту же клетку и осуществлять продуктивный цикл развития в одном включении (Lenart et al., 2001). Если различные штаммы хламидий развиваются в одной цитоплазматической вакуоли, это создает условия для обмена генами, включая и те, которые обуславливают резистентность к антибиотикам. У хламидий известны фаги и плазмиды, посредством которых могут передаваться гены от одной особи к другой (Hatt et al., 1988; Liu et al., 2000; Karunakaran et al., 2002; Everson et al., 2002).

У бактерий *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* разнообразие генов плазмидной устойчивости к тетрациклину впервые было доказано на молекулярном уровне в 1980 году (Mendez et al., 1980). Гены *tet* и *otr*, обуславливающие устойчивость к тетрациклину и окситетрациклину, распространены среди различных бактерий. Нуклеотидная последовательность многих из них расшифрована. Уже известно более двух десятков этих генов (McMurry, Levy, 2000). Большинство из них обеспечивает устойчивость бактерий путем кодирования эффлюксных белков. Это гены *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(31)*, а также *otr(B)*, *tcr3*, *tetP(A)*, *tet(V)*, *tet(Y)*. Имеются гены, обеспечивающие защиту рибосом – *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *otr(A)*, *tetP(B)*. Ген *tet(X)* кодирует фермент, разрушающий тетрациклин, а механизм устойчивости, обусловленный генами *tet(U)*, *otr(C)*, неизвестен (Chopra, Roberts, 2001). Гены устойчивости к тетрациклину имеют высокую степень гомологии у грамотрицательных бактерий (*TetA* к *TetE*, *TetG*, *TetH*), поэтому можно предположить наличие некоторых из них у хламидий (Tauch et al., 2000; Aminov et al., 2002). Aminov и соавторы (2002) на основании филогенетического



анализа *Tet*-генов бактерий разработали полимеразную цепную реакцию ПЦР для выявления генов устойчивости к тетрациклину. Было показано, что гены резистентности к тетрациклину из кишечника животных попадают во внешнюю среду вместе с бактериями, которые продолжают размножаться в сточных водах и в естественных водоемах. Разработка ПЦР, позволяющая выявлять не только хламидии, но и гены устойчивости хламидий к антибиотикам у конкретного больного, имеет большую перспективу. Это позволит не только диагностировать инфекцию, но сразу же подбирать наиболее оптимальное лечение из нескольких возможных вариантов.

В большинстве случаев устойчивость к тетрацикламам связана с энергозависимым эффлюксным насосом и удлинением рибосомного G-подобного белка (Roberts, 1996). Эффлюкс-белки осуществляют активный транспорт катион-тетрациклинового комплекса из клетки путем замены катиона ( $Mg^{2+}$ ) на протон ( $H^+$ ). Нуклеотидная последовательность генов, кодирующих эффлюксные белки, расшифрована. Поэтому предполагаемая первичная структура Tet-белков установлена. С помощью направленного мутагенеза с включением остатков цистеина и последующего химического анализа удалось установить структурные взаимоотношения между TetA и внутренней цитоплазматической мембраной у *Escherichia coli* (Kimura et al., 1997; Kubo et al., 2000; Tamura et al., 2001) (рис. 13.5). Эффлюксные белки осуществляют защиту от тетрациклина, но не от миноциклина (Fluit et al., 2001).

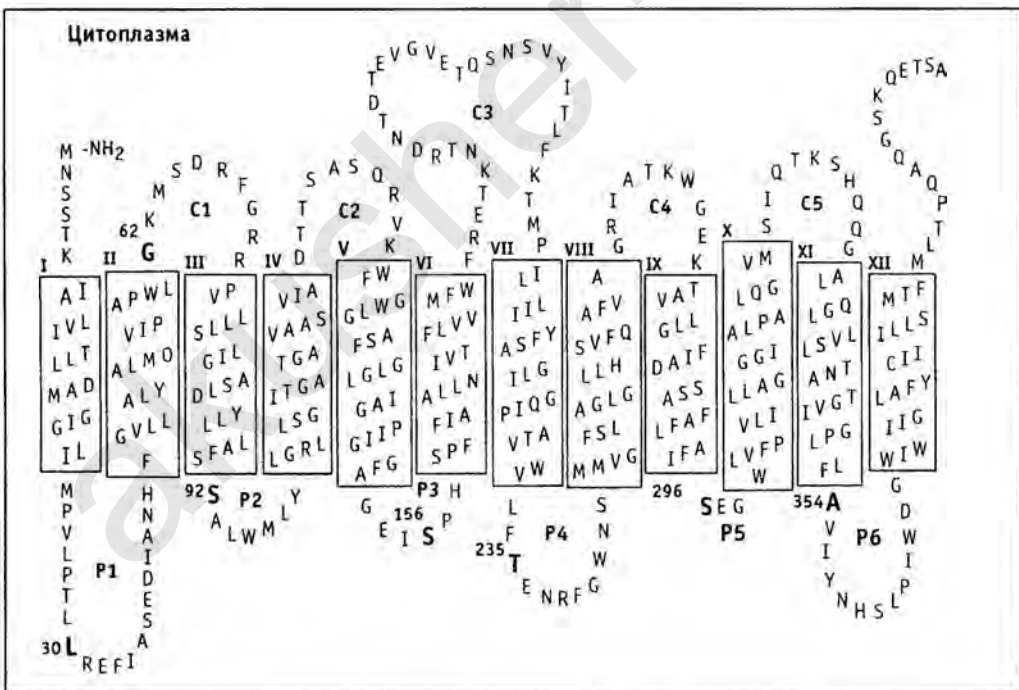


Рисунок 13.5. Модель трансмембранной топологии TetA(B) *Escherichia coli*, установленная с помощью направленного мутагенеза с включением остатков цистеина и последующего химического анализа. Аминокислотные остатки полипептидной цепи, которые подвергались мутациям включением цистеина, помечены жирным шрифтом (Kimura et al., 1997; Kubo et al., 2000).

G-подобный белок таким образом взаимодействует с рибосомами, что они становятся способными осуществлять синтез белка в присутствии тетрациклинов. Детерминанты TetM, TetO, TetB(P), TetQ, TetS, TetT, TetW, OtrA обуславливают устойчивость к тетрациклину, доксициклину и миноциклину (Levy et al., 1999; Roberts, 1996; Schnappinger, Hillen, 1996; Taylor, Chau, 1996). Ген *TetX* кодирует фермент, который инактивирует тетрациклин методом окисления. Он встречается очень редко, и клиническое значение его невелико.

Устойчивость хламидий к антибиотикам может быть связана со способностью проникновения субстанции в клетку-хозяина. Концентрации во внеклеточной среде и внутри эукариотной клетки могут сильно различаться. У хламидий отмечена гетеротипическая резистентность, что означает, что в пуле хламидий присутствуют как устойчивые, так и чувствительные особи. Механизм, ответственный за гетеротипическую резистентность хламидий, не установлен. Множественная устойчивость к доксициклину, азитромицину и офлоксацину, которая описана в ряде клинических исследований, может иметь фенотипический характер или быть связана с эффлюксными белками, которые «выводят» антибиотик из включения и из хламидийной клетки. Увеличение активного выброса антибиотиков за счет повышения уровня экспрессии эффлюксных белков также может приводить к формированию устойчивости к антибактериальным агентам. Мисюрина и соавторы (2001) исследовали уровни транскрипции генов эффлюксного белка (*YgeD*) и богатого цистеином белка оболочки (CRP) относительно 16S-РНК в устойчивых к доксициклину клинических изолятах *C. trachomatis*. Было показано, что уровень транскрипции гена *CRP* в лабораторном штамме, чувствительном к доксициклину, примерно в 10 раз выше, чем в клиническом изоляте, устойчивом к доксициклину. При исследовании транскрипции гена *YgeD* обнаружено, что при созревании лабораторного штамма ее уровень снижается не менее чем в пять раз (Мисюрина и соавт., 2001).

Резистентность хламидий к антибиотикам часто остается невыявленной, поскольку выделение возбудителя в клинической практике не проводится, а тем более определение чувствительности *in vitro*, что довольно трудоемко. В отличие от других бактериальных инфекций, соответствующий мониторинг не проводится. Можно только предполагать, какое значение имеют резистентные штаммы хламидий для рецидивирующей и персистентной хламидийной инфекции. Данные последних исследований свидетельствуют, что это значение велико. У многих пациентов удается исключить реинфекцию, у них нет выраженных нарушений иммунного статуса, и они получили достаточный объем лечения. Однако хламидии у них продолжают обнаруживать, в том числе с помощью чувствительных и специфичных методов амплификации нуклеиновых кислот. Dean и соавторы (1998) описали 7 женщин, у которых на протяжении нескольких лет обнаруживался один и тот же серовар хламидий, несмотря на многочисленные курсы лечения. Генотипирование по *omp1* подтвердило идентичность первоначальных и последующих изолятов хламидий.

В большинстве случаев тетрациклиновые антибиотики имеют низкие (т.е. благоприятные) показатели минимальной подавляющей концентрации (МПК) в отношении *Chlamydia trachomatis*. Хлортетрациклин, окситетрациклин – примерно 0,06 мкг/мл; метациклин – примерно 0,05 мкг/мл; доксициклин, миноциклин – примерно 0,03 мкг/мл (Ridgway, 1997; Smilack, 1999; Гомберг, Соловьев, 2001; Suchland et al., 2003). В связи с общностью механизма действия и противомикробного эффекта антибиотики тетрациклиновой группы вызывают перекрестную устойчивость. Микроорганизмы, устойчивые к одному из тетрациклинов, устойчивы и к другим антибиотикам этой группы, за исключением миноциклина (Белоусов

и соавт., 1993). Активность миноциклина и режимы дозирования при лечении хламидийной инфекции сходны с доксициклином. Однако он существенно дороже доксициклина. На начало 2003 года препараты миноциклина в Украине не зарегистрированы.

Из-за сочетания эффективности и дешевизны синтетические производные тетрациклинов стали основным средством лечения больных мочеполовым хламидиозом. Доксициклин рекомендован в суточной дозе 0,2-0,3 г в течение 7-14 дней при неосложненных уретритах и цервицитах (Gunnar et al., 1977; Johannisson et al., 1980; Борисенко, 1998; Мавров и соавт., 2001; Centers for Disease Control, Prevention, 2002; Stary, 2001).

Для лечения хламидиоза применялись и другие представители тетрациклинового ряда. Лимециклин по 0,3 г два раза в сутки назначался для лечения мужчин с хламидийным уретритом и их половых партнеров. Успех лечения составил 86-90% (Lassus et al., 1979). При сравнительном изучении тетрациклина (0,25 г, 4 раза в сутки, 7 дней) и миноциклина (0,05 г, 2 раза в сутки, 7 дней) последний оказался эффективнее в 2 раза (Oriel, Ridgway, 1983; Sanders et al., 1986). Kovacs и соавторы (1989) назначали миноциклин первый день 0,1 г два раза, а затем – 0,1 г однократно в течение 9 дней 52 женщинам с хламидийным цервицитом. Аналогичная группа из 46 женщин получала доксициклин по той же схеме. У всех больных наступило клиническое и микробиологическое излечение. Мавров (2001) приводит результаты лечения доксициклина моногидратом 67 больных мочеполовым хламидиозом. Из них мужчин – 23, женщин – 44. Под наблюдением находились пациенты с различными клиническими проявлениями заболевания: уретропростатит – 20; цистит – 8; эндоцервицит – 14; воспаление придатков – 12; вульвовагинит – 9; конъюнктивит – 4. Больные переносили лечение хорошо. В единичных случаях отмечался такой побочный эффект, как неприятные ощущения и чувство тяжести в области желудка. При лечении доксициклина моногидратом, по сравнению с тетрациклином и эритромицином, быстрее купировались основные клинические проявления заболевания, в большем количестве случаев было достигнуто микробиологическое излечение (Мавров, 2001).

Наиболее выраженный клинический и микробиологический эффект тетрациклины дают при лечении свежих, неосложненных хламидийных уретритов и цервицитов, особенно при их остром или подостром течении, у не лечившихся ранее половых партнеров, а также при смешанных воспалительных процессах хламидийно-бактериальной этиологии. При назначении тетрациклина по 0,5 г 4 раза в день или доксициклина по 0,1 г 2-3 раза в день достигается концентрация в крови, превышающая минимальную ингибирующую концентрацию в отношении хламидий (табл. 13.3).

Для лечения хламидиоза дозы тетрациклинов должны быть близки к максимальным. В ранних исследованиях Oriel и соавторы (1977), а также Bruce и соавторы (1981) указывали на неэффективность тетрациклина в дозе 1 г/сут в течение 14 дней при лечении больных хламидийными уретритами и цервицитами. Handsfield и соавторы (1976) и Багдасаров (1982) считали оптимальной дозу тетрациклина – 2 г/сут. В отношении продолжительности курса лечения имеются разные мнения. Сокращение сроков лечения до 1 недели, особенно при суточной дозе препарата менее 2 г, приводит к значительной частоте ранних рецидивов и опасно с позиций индуцирования резистентности к антибиотикам у инфицирующего штамма хламидий. При хламидийных уретропростатитах и орхозпидидимитах Bruce и соавторы (1981) рекомендовали тетрациклин 2 г/сут в течение 28 суток, а Dimitrov и соавторы (1984) назначали тетрациклин тремя курсами 2 г/сут по 10 дней с десятидневным перерывом. Но и при максимальных дозах, и при наиболее продолжительных курсах антибиотикотерапии,

Таблица 13.3.

## Дозы тетрациклинов при лечении хламидийной инфекции

Субстанции	Суточные дозы (максимальные)	Курс лечения	Примечание
Тетрациклин (основание) Тетрациклина гидрохлорид Окситетрациклина дигидрат	2–2,5 г	10–20 дней и более	Плохо переносится
Метациклина гидрохлорид	1,2–1,5 г		
Доксициклина гидрохлорид (гиклат) моногидрат	0,2–0,3 г		При тяжелых осложненных инфекциях лучше вводить внутривенно
Миноциклин			

наряду с выраженным клиническим эффектом, у 5-15% больных также не удавалось элиминировать возбудителя, что приводило к последующим рецидивам или возникновению персистентной хламидийной инфекции (Мавров, 2002). В подобных случаях рекомендуют через 7-14 дней провести курс этиотропной терапии антибиотиками другой группы, активными в отношении хламидий.

Риск побочных действий и рецидивов заболевания при приеме тетрациклинов относительно высок. Помимо этого, тетрациклины противопоказаны при беременности.

Тетрациклиновые антибиотики обычно хорошо переносятся, однако при приеме доз, необходимых для излечения от хламидиоза, могут вызывать побочные явления со стороны различных органов и систем. Со стороны ЖКТ – понижение аппетита, диспепсия, тошнота, рвота, диарея. В результате длительного применения высоких доз может развиваться глоссит, стоматит, эзофагит, гастрит, проктит, панкреатит. Со стороны ЦНС – головокружение, неустойчивость, повышение внутричерепного давления. Могут наблюдаться аллергические реакции – кожные реакции (токсикодермии), отек Квинке, крапивница. Из других побочных эффектов встречаются поражения печени и почек, пигментация кожи, слизистой оболочки и зубов. Препараты тетрациклина повышают чувствительность кожи к действию солнечных лучей (фотосенсибилизация). При длительном применении могут возникать осложнения, обусловленные развитием кандидоза и дисбактериоза (Мавров и соавт., 2002).

Благодаря своим особым фармакокинетическим свойствам метациклин и доксициклин переносятся гораздо лучше, чем тетрациклин. Еще более редки побочные эффекты при приеме доксициклина моногидрата. Нейтральная реакция доксициклина моногидрата исключает возникновение эзофагитов, встречающихся при применении других форм доксициклина. Частота развития побочных реакций при приеме доксициклина составляет 4-5% (Мавров, 2001; Гомберг, Соловьев, 2001).

Тетрациклиновые антибиотики противопоказаны при повышенной чувствительности к препаратам этого ряда. С осторожностью их следует принимать при заболеваниях почек, печени и лейкопении. Тетрациклины легко проникают через плацентарный барьер. Вследствие возможного образования нерастворимых комплексов тетрациклинов с кальцием и отложения их в костях, эмали и дентине зубов препараты этой группы противопоказаны беременным, кормящим и детям до 8 лет.



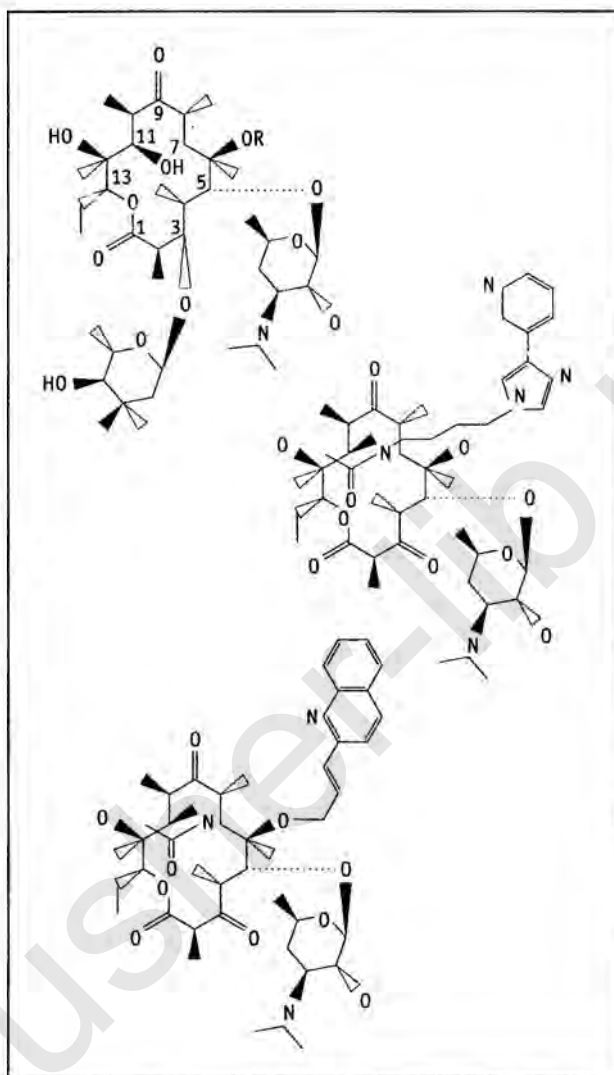
Тетрациклины образуют нерастворимые комплексы с ионами кальция, железа и других тяжелых металлов. Поэтому не следует принимать эти антибиотики одновременно с продуктами питания или лекарственными препаратами, содержащими соли алюминия, висмута, кальция и магния, а также с препаратами железа. Перечисленные выше вещества, а также гидрокарбонат натрия снижают всасывание тетрациклинов и их концентрацию в крови. В связи с этим между приемами вышеперечисленных препаратов и тетрациклинами нужно соблюдать интервалы в 1-3 часа. Тетрациклиновые антибиотики уменьшают эффективность пероральных контрацептивов (при приеме препаратов этого ряда следует использовать другие методы контрацепции), увеличивают риск маточных кровотечений. Совместный прием метациклина и витаминов группы А может приводить к повышению внутричерепного давления. Барбитураты, карбамазепин, гидантоины, алкоголь ускоряют метаболизм и снижают концентрацию доксициклина в плазме, что приводит к соответствующему снижению противомикробного эффекта. Доксициклин потенцирует эффект непрямых коагулянтов (Коваленко, Викторов, 2000).

### 13.1.2. Макролиды

Макролиды – естественные продукты вторичного метаболизма актиномицетов, основу структуры которых составляет макроциклическое лактонное кольцо, в котором атомы водорода в позициях 3 и 5 заменены на нейтральные или аминсахара (Bryskier et al., 1993). Эритромицин А – первый макролид, полученный в 1952 году. Кларитромицин (6-метокси – производное эритромицина) – представитель следующего поколения макролидов. Телитромицин и АВТ-773 – представители последнего поколения макролидов – кетолидов. Кетолиды характеризуются тем, что к третьему атому углерода в лактонном кольце (позиция С3) вместо углеводного остатка кладинозы (как у эритромицина и кларитромицина) присоединена кетонная группа. Кетолиды содержат в позиции С11 и С12 карбамат, который у телитромицина «продлен» за счет алкил-арильной группы. Это удлинение молекулы позволяет телитромицину дополнительно взаимодействовать с доменом II 23S-рибосомальной РНК (рис. 13.6).

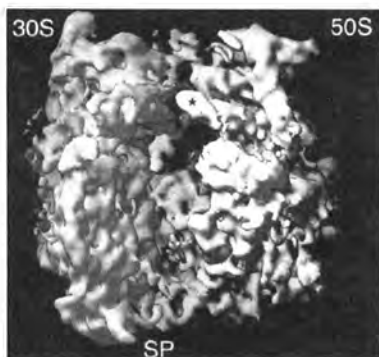
Макролиды тормозят синтез белка в клетках чувствительных микроорганизмов за счет связывания с каталитическим пептидил-трансферазным центром 50S-субъединицы рибосомы (рис. 13.7). (Gale et al., 1981; Mayei et al., 1993; Vanuffel, Cocito, 1996).

Действие эритромицина и других 14-членных макролидов проявляется на ранних стадиях синтеза белка, когда антибиотик блокирует рост пептидной цепочки, вызывая преждевременную диссоциацию пептидил-ТРНК и рибосомы (Menninger, 1995). Антимикробное действие дополняется подавлением сборки новых больших рибосомных субъединиц, что ведет к нарушению функций рибосом в микробной клетке (Champney, Tober, 1999). Механизм действия 16-членных макролидов точно не охарактеризован, однако известно, что они связываются с той же областью 50S-субъединицы рибосомы, что и 14-членные макролиды, и подавляют формирование пептидных связей (Vazquez, 1979; Vester, Douthwaite, 2001). Место связывания макролидов находится в основании глубокой «расщелины» на поверхности рибосомы, через которую происходит доступ пептидов к выводному каналу большой субъединицы рибосомы (Ban et al., 1999; Cate et al., 1999). Это место расположено близко от аминацильного и пептидильного концов транспортной РНК, которые располагаются таким образом, что катализируют образование пептидных связей. Место образования пептидных



**Рисунок 13.6.** Химическая структура макролидов, основу которой составляет макроциклическое лактонное кольцо, содержащее 14-16 атомов углерода

связей – пептидил-трансферазный центр – связан с центральной петлей домена V 23S-рибосомальной РНК (Noller, 1984; Cundliffe, 1990). Макролидные антибиотики также взаимодействуют со «шпилькой» 35 в домене II (B) (рис. 13.8). Одновременное взаимодействие небольшой молекулы эритромицина с доменами II и V 23S-рРНК возможно, если рибосомальная РНК сложена таким образом, что шпилька 35 и пептидил-трансферазная петля, которые отдалены друг от друга в нуклеотидной последовательности, расположены в пространстве близко друг от друга. Пространственная близость этих двух участков рибосомальной РНК показана с помощью криоэлектронной микроскопии (Mueller et al., 2000).

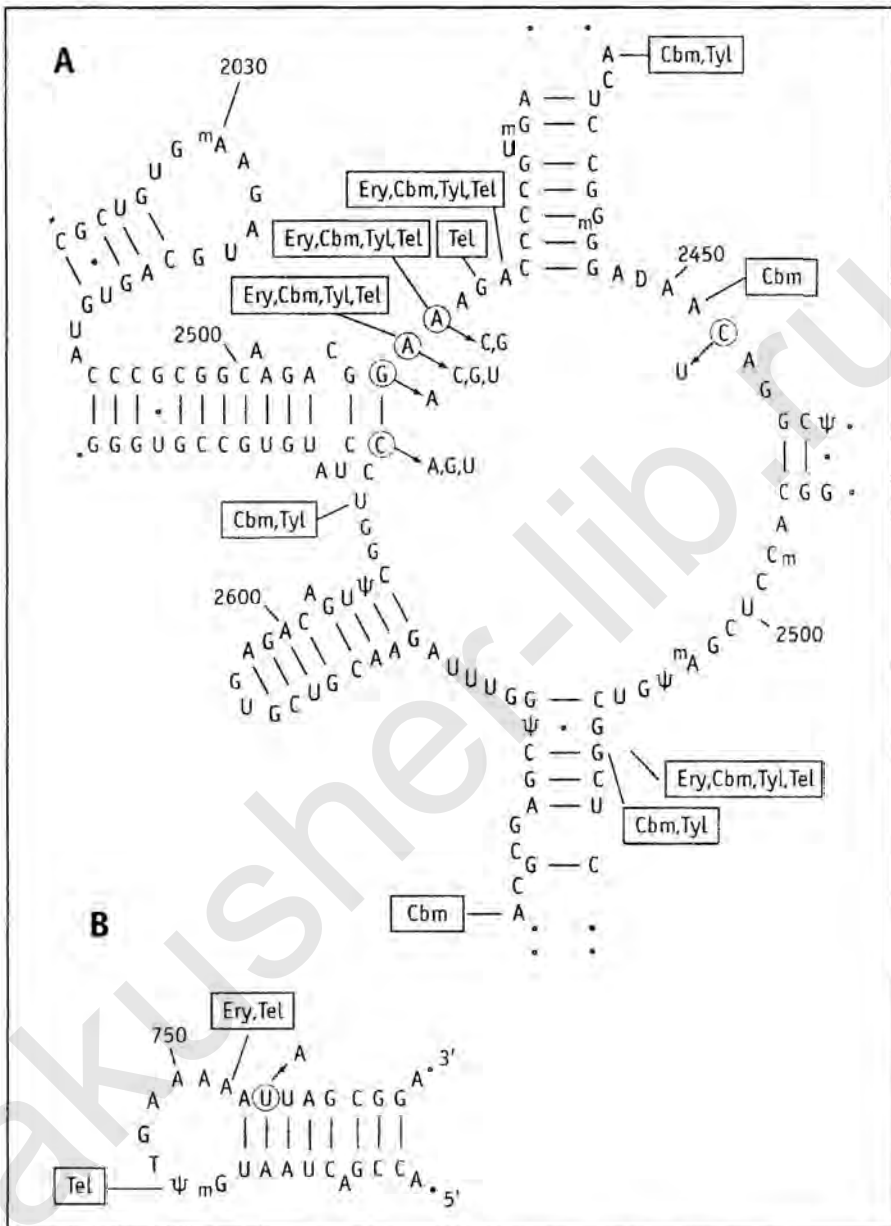


**Рисунок 13.7.** Структура 70S-рибосомы *Thermus thermophilus*, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа (электронная плотность при разрешении 7,8 Å) (Cate et al., 1999).

Количество атомов углерода в макролактонном кольце и расположение остатков сахаров вокруг кольца определяет то, каким образом макролид взаимодействует с рибосомальным MLSB-сайтом. Наличие дисахаридного углеводного остатка в C5-положении лактонного кольца определяет связывание с пептидил-трансферазным центром и подавление пептидил-трансферазной активности. Макролиды, содержащие в C5-положении моносахарид, такой как эритромицин, кларитромицин и миуцинамицин, не обладают прямым ингибирующим действием на пептидил-трансферазный центр (Gale et al., 1981; Nissen et al. 2000; Poulsen et al., 2000; Schlunzen., et al. 2001). Два остатка микаминозы и микарозы, присоединенные к C5, а также остаток миценозы, присоединенный к C14, в макролактонном кольце тилозина, ориентируют молекулу таким образом, что происходит взаимодействие с пептидил-трансферазным центром рибосомной РНК. Места связывания – аденин в позиции 2058 (A2058), урацил в позиции 2506 (U2506), гуанин в позиции 748 (G748) и аденин в позиции 752 (A752) (Liu, Douthwaite, 2002) (рис. 13.9).

Возрастание интереса к макролидам в венерологии произошло в 80-90-х годах, после осознания роли хламидий и микоплазм в этиологии воспалительных заболеваний половых органов. Были созданы новые макролидные антибиотики с улучшенными по сравнению с эритромицином фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, а также более благоприятным профилем безопасности. В настоящее время группа макролидов насчитывает более десяти различных субстанций, которые в зависимости от числа атомов углерода в лактонном кольце делятся на 3 группы: 14-членные макролиды: эритромицин, олеандомицин, рокситромицин, диритромицин, кларитромицин, флуритромицин; 15-членные: азитромицин; 16-членные: спирамицин, джозамицин, мидекамицин, миокамицин, рокитамидин, тилозин, карбомицин (Steigbigel, 1995).

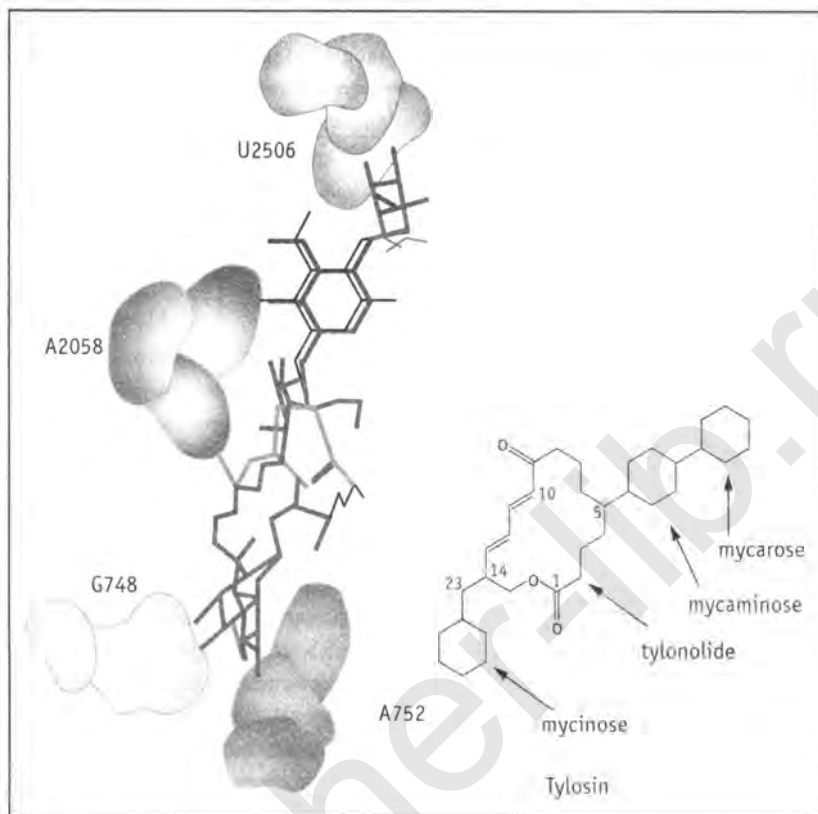
Структурные особенности предопределяют различия в фармакокинетике и антибактериальной активности макролидов, а также в их переносимости и лекарственном взаимодействии. После приема внутрь макролиды частично разрушаются под действием соляной кислоты желудка. В наибольшей степени это касается эритромицина и олеандомицина. Повышенную устойчивость к кислоте имеют джозамицин и кларитромицин. Существенное влияние на биодоступность макролидов может оказывать пища. Пища замедляет скорость абсорбции рокситромицина и азитромицина, не влияя на ее объем (Страчунский и соавт., 2000).



**Рисунок 13.8.** Вторичная структура пептидил-трансферазного центра в домене V 23S-рибосомальной РНК (А) и в «шпильке» 35 в домене II (В) (Vester, Douthwaite, 2001).

Указаны нуклеотиды, с которыми взаимодействуют макролидные антибиотики. Нуклеотиды, замена которых происходит в результате мутаций, заключены в круг. Стрелки указывают на характер замены нуклеотидов, что ведет к устойчивости к макролидам. Приведенные данные соответствуют вторичной структуре рРНК *E. coli*. Эта структура консервативна и одинакова у всех бактерий (Gutell et al., 1994). Сокращения: Ery – эритромицин, Tel – телитромицин, Cbm – карбомицин, Tyl – тилозин. Эритромицин и кларитромицин взаимодействуют с одинаковыми сайтами рРНК.





**Рисунок 13.9.** Пространственная модель взаимодействия 16-членного макролидного антибиотика тилозина с пептидил-трансферазным центром 23S-рибосомной РНК *Streptomyces fradiae* (Poulsen et al., 2000; Hansen et al., 2002; Liu, Douthwaite, 2002).

Два остатка микаминозы и микарозы, присоединенные к С5, а также остаток миценозы, присоединенный к С14, в макролактонном кольце тилозина, ориентируют молекулу таким образом, что происходит взаимодействие с пептидил-трансферазным центром рибосомной РНК. Места связывания: аденин в позиции 2058 (A2058), урацил в позиции 2506 (U2506), гуанин в позиции 748 (G748) и аденин в позиции 752 (A752).

Пиковые концентрации макролидов в сыворотке крови при приеме внутрь и величины, отражающие площадь под фармакокинетической кривой, зависят от вида препарата и дозы (табл. 13.4).

По способности проходить через различные гистогематические барьеры (за исключением гематоэнцефалического) макролиды превосходят  $\beta$ -лактамы и аминогликозиды. С повышением дозы антибиотика его биодоступность увеличивается. Наиболее высокие сывороточные концентрации отмечаются при приеме рокситромицина, что можно связывать с его относительно низким тканевым аффинитетом. Самые низкие концентрации в крови характерны для азитромицина, что теоретически может создавать проблемы при инфекциях, сопровождающихся бактериемией. Джозамицин является оптимальным в этом направлении, создавая достаточные концентрации и в сыворотке крови, и в тканях. Он хорошо распределяется в организме, проникая во многие органы, ткани и среды.

Таблица 13.4

## Сравнительная фармакокинетика макролидов (Steigbigel, 1995; Bergan, 1995)

Препарат	доза, мг	$T_{max}$ , ч	$C_{max}$ , мг/л	AUC, мг/(ч*л)	$T_{1/2}$ , ч
Азитромицин	500	2-3	0,4	6,7	35-54
Кларитромицин	500	2-3	1,7-1,8	15,9	5
Эритромицин (основание)	500	1-5	1,9-3,8	5,8-11,2	1,5-2,5
Джозамицин	1000	1	3,8	7,9	1,5-2,5
Рокситромицин	150	1-3	5,4-7,9	53,0-81	10,5
Спирамицин	3000	2-3	1,6-2,8	13,6	6-12

Примечание.  $T_{max}$  – время достижения максимальной концентрации в крови,  $C_{max}$  – величина максимальной концентрации, AUC – площадь под фармакокинетической кривой,  $T_{1/2}$  – период полувыведения.

Макролиды метаболизируются в печени при участии цитохрома P-450 (изоформа CYP3A4) с образованием как неактивных метаболитов, так и соединений, обладающих антибактериальными свойствами (например, 14-гидроксикларитромицин). Метаболиты выделяются преимущественно с желчью и далее с фекалиями. Почечная экскреция составляет 5-10%. Период полувыведения варьирует от 1,5 часов (эритромицин, джозамицин) до 65 часов (диритромицин). При нарушении функции почек период полувыведения не изменяется, поэтому коррекции режимов дозирования не требуется. При циррозе печени может значительно увеличиваться период полувыведения эритромицина и джозамицина (Коваленко, Викторов, 2000; Страчунский и соавт., 2000).

Макролиды имеют большое значение в этиотропной терапии бактериальных инфекций, передаваемых половым путем. Макролиды являются препаратами выбора при лечении детей, беременных и кормящих женщин, а также супругов, планирующих беременность. Для чувствительных штаммов *C. trachomatis* минимальная ингибирующая концентрация эритромицина составляет 0,06 мкг/мл (табл. 13.5).

Эритромицин в течение длительного времени применялся в качестве альтернативы тетрациклинам, однако этот препарат в рекомендованной дозе 2 г в сутки 7-10 дней часто плохо переносится больными. Эритромицина стеарат в дозе 500 мг два раза в день в течение 10 дней имеет лучшую переносимость. Клинический эффект при лечении эритромицином хламидийных уретритов и цервицитов – около 80% (Ridgway, 1997).

В 80-е годы были получены аналоги эритромицина, обладающие мощным антибактериальным действием в сочетании с хорошей биодоступностью и переносимостью. Свойства рокситромицина, азитромицина, джозамицина, китазомицина и кларитромицина, позволяющие излечивать бактериальные инфекции относительно малыми дозами и короткими курсами, позволили говорить о новой эре в применении макролидов (Wise, 1989). Благодаря антимикробному спектру и особенностям распределения, макролиды рассматриваются как антибиотики, практически идеально подходящие для лечения инфекций, передающихся половым путем. Макролиды обладают высокой активностью *in vitro* против *C. trachomatis* и находят широкое применение при хламидиозе половых путей, как у женщин, так и у мужчин. Джозамицин, спирамицин и кларитромицин рассматриваются как препараты выбора для лечения хламидийных инфекций

Таблица 13.5

Активность макролидов против хламидий и микоплазм *in vitro*  
(минимальная подавляющая концентрация мкг/мл) (Steigbigel, 1995; Ridgway, 1995;  
Leclerg, Counvalin, 1995; Gialdroni et al., 1995; Bai et al., 1995)

Препарат	<i>C. trachomatis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
Эритромицин	0,06	>32	0,12–2,0
Рокситромицин	0,03	8 — >64	0,06–1,0
Кларитромицин	0,007	8–64	0,025–1,0
Азитромицин	0,125	2–16	0,12–1,0
Джозамицин	0,015–0,06	0,02–0,5	0,15–0,3
Мидекамицин	0,06	0,008–0,12	0,03–0,25
Спирамицин	0,5	4–32	4 — >16

у беременных и детей. В контролируемых исследованиях, проведенных у пациентов с негонорейными уретритами и цервицитами (возбудители – *C. trachomatis*, *U. urealyticum*), выявлена высокая эффективность эритромицина, спирамицина, кларитромицина, рокситромицина и азитромицина (Мавров и соавт. 1999; Мавров, Мальцева. 2001). В Украине макролиды применяются при гонорее, поскольку большинство штаммов, циркулирующих на территории Украины, сохранили чувствительность к макролидам (Мавров, Нагорный, 2002; Чинов, 2002).

Важным этапом в этиотропном лечении хламидийных инфекций явилось применение макролида CP-62,993, или азитромицина (9-деокси-9а-метил-9а-аза-9а-гомоэритромицин). Первая публикация о клиническом применении этого макролида появилась в 1988 году (Dokic, 1988). Результаты микробиологических и клинических исследований показали широкий антибактериальный спектр, низкую токсичность, хорошую биодоступность и переносимость азитромицина. В начале 1990-х годов этот препарат превосходил все существовавшие в то время макролиды и считался родоначальником новой группы антибиотиков, получивших название азалиды (Bright, 1988). Первые клинические испытания азитромицина при лечении урогенитальных хламидиозов подтвердили его эффективность (Steingrimsson et al., 1990; Ridgway, 1996). Последующие многочисленные испытания азитромицина при лечении генитального хламидиоза показали, что его микробиологическая и клиническая эффективность не выше, чем у доксициклина и эритромицина в рекомендуемых дозах. Преимуществом его перед этими препаратами является лишь удобство в применении. Недостатком – более высокая стоимость (Lau, Qureshi, 2002).

Азитромицин способен накапливаться внутри клеток и медленно выводится из организма (Bryskier et al., 1993). Он практически не метаболизируется в организме, его период полувыведения составляет 35 ч (Березняков, 2001; Сидоренко, 2002). Азитромицин способен диффундировать из сосудистого русла в межклеточное пространство, в клетки и в фагосомы, где находятся хламидии. Терапевтическая концентрация в середине клетки сохраняется на протяжении 10–14 сут. Концентрация препарата в фагоцитах в десятки раз превышает таковую в крови (тканевонаправленная фармакокинетика).

Однократный прием 1 г азитромицина может быть эффективным при лечении свежего неосложненного хламидийного цервицита или уретрита. Средние показатели клинической излеченности мужчин с хламидийным уретритом при использовании 1 г азитромицина однократно составляют 81% (Stamm и соавт., 1995). Однако, по данным этих авторов, у ряда пациентов через 5 недель снова были обнаружены хламидии. Таким образом, в дозе 1 г однократно азитромицин не ликвидирует, а лишь подавляет хламидийную инфекцию. Thorpe и соавторы (1996) провели многоцентровое исследование, назначив 347 больным неосложненным хламидиозом 1 г азитромицина однократно. Микробиологическое излечение было достигнуто в 97%, а клинический эффект в 86%. Наличие сопутствующей инфекции *U. urealyticum* и патогенной бактериальной флоры существенно снижает клиническую эффективность (<45%) лечения хламидиоза азитромицином, не влияя существенно на микробиологическую эффективность (Stamm et al., 1995). Однократное лечение 1 г азитромицина неосложненной генитальной инфекции *C. trachomatis* рекомендовано ВОЗ и входит в рекомендации по лечению во многих странах.

Отношение к однократным методам лечения хламидиоза не однозначно. Во многих случаях наблюдаются клинические и микробиологические рецидивы. Большинство случаев, которые попадают в поле зрения врача – это хронический и осложненный хламидиоз. Однократной дозы азитромицина или какого-либо другого препарата недостаточно для стабильного эффекта. Поэтому многие авторы рекомендуют многократный прием азитромицина: в первый раз – 1 г, затем ежедневно по 500 мг в течение 3-6 дней, а иногда и более, в зависимости от клинической формы и тяжести течения хламидиоза (Ridgway 2000; Мавров и соавт., 2001; Мавров, Нагорный, 2002) (табл. 13.6).

Имеются предварительные сообщения о пероральном приеме азитромицина (500 мг в первый день, 250 мг 1 раз в день в течение 6 последующих дней) для лечения воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ). Микробиологическая и клиническая излеченность пациентов, инфицированных *C. trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae*, была достигнута в 100 и 96,7% случаев соответственно (Ridgway, 2000). Имеется опыт применения внутривенного азитромицина при восходящей инфекции половых путей, вызванных *Chlamydia trachomatis*

Таблица 13.6.

## Дозы макролидов при лечении больных хламидийной инфекцией

Препараты	Суточные дозы	Курс лечения	Примечание
Эритромицин	2–2,5 г	14–21 день	Плохо переносится при приеме внутрь
Азитромицин	0,5–1,0 г	3–7 дней	Принимаются внутрь
Дицитромицин		10–15 дней	
Кларитромицин			
Мидекамицин	0,8 г		
Джозамицин	1,0–1,5 г		
Китазомицин	1,6–2,0 г		
Рокситромицин	0,6 г		
Спирамицин	6–9 млн. МО		Внутрь и внутривенно
Телитромицин	0,6–0,8 г		Проводятся испытания



(воспалительные заболевания органов малого таза), по схеме: 500 мг 1 раз в день внутривенно два-три дня, с последующим переходом на пероральный прием по 250 мг 5-6 дней (Schonfeld, Kirst, 2002).

Неоднозначными оказались результаты применения однократной дозы 1 г азитромицина для лечения трахомы в рамках программы B03 SAFE по предотвращению слепоты. Mabey и Fraser-Hurt (2002) опубликовали результаты метаанализа 15 исследований (всего 8678 участников), где нанесение тетрациклиновой мази сравнивали с назначением внутрь азитромицина. Количество тяжелых форм трахомы удалось снизить, однако однократный прием 1 г азитромицина не позволял излечивать трахому (Mabey, Fraser-Hurt, 2002). При хроническом, осложненном процессе рекомендованы альтернативные схемы применения азитромицина. Например, предложено 500 мг/сут 4 дня в месяц на протяжении 3 месяцев (Giurcanapu, 2002) или по 1 г 1 раз в неделю, то есть на 1-й, 7-й и 14-й день (всего 3 г на курс лечения) (Чеботарев, Левшин, 2001). Эффективность такой терапии, по данным авторов, составляет 97%. При неосложненной инфекции с неустановленным сроком заражения *Chlamydia trachomatis* курсовая доза составляет от 3 до 5 г (один раз на 3,5,7-й день) или 1 г раз в неделю на протяжении 2 недель (Иванов и соавт., 2001; Ivanov D. et al., 2002). При персистентной инфекции курсовая доза может составлять 12 г в случае хронических везикулопростатитов (Иванов, 2002). Доза, направленная на подавление *Chlamydia pneumoniae*, составляет 0,5-1 г один раз в неделю на протяжении 3-18 месяцев для профилактики атеросклероза (Сидоренко, 2002).

Механизм резистентности к азитромицину, как и у всех макролидов, может формироваться за счет *erm*-гена, который кодирует метилазу. Этот фермент обеспечивает способность микроорганизма блокировать место связывания макролидов на 16S-рибосомной РНК микробной клетки за счет присоединения  $\text{CH}_3$ -группы (Сидоренко, 2002). Второй механизм, обусловленный *mef*-геном, который кодирует эффлюксный белок. Этот белок играет роль «насоса», который «выкачивает» азитромицин из клетки. Микроорганизмы, которые имеют эффлюксный насос, также резистентны к 14-членным макролидам (эритромицин, рокситромицин, кларитромицин), но сохраняют чувствительность к 16-членным (спирамицин, джозамицин, мидекамицин) и линкозамидам (Иванов, Ломоносов, 2002, Сидоренко, 2002).

Среди побочных эффектов при приеме азитромицина чаще всего отмечают диарею, связанную с активацией двигательных рецепторов, а не с дисбактериозом. Среди других побочных реакций при применении азитромицина следует отметить транзиторное повышение активности печеночных ферментов и аллергические кожные проявления. Препарат не взаимодействует с системой цитохрома P450, поэтому его можно применять в комбинации с другими антимикробными средствами (Иванов, Ломоносов, 2002).

Спирамицин – антибиотик, относящийся к группе макролидов, обладает высокой активностью в отношении хламидий [минимальная ингибирующая концентрация (МИК) – 0,025-2,0 мкг/мл] (Orfila et al., 1993). Структура спирамицина представлена макроциклическим лактонным кольцом с 16 атомами углерода, соединенным с тремя сахарами: фуозамином, мукаминозой и мукарозой. Механизм действия спирамицина связан с ингибированием синтеза белка бактериальной клетки на уровне рибосом за счет связывания с 50S-субъединицей и диссоциацией между рибосомами и транспортной РНК (Descotes, 1993).

Спирамицин обладает высоким показателем биодоступности (33%) и хорошим проникновением в ткани и жидкости организма (66%), исключая спинномозговую жидкость.

Связывание с белками плазмы у препарата слабое и не превышает 10%. Препарат концентрируется внутриклеточно и характеризуется хорошими показателями переносимости: низкой частотой желудочно-кишечных расстройств, отсутствием ототоксичности, нейросенсорных нарушений, он также не влияет на сердечный ритм. Спирамицин отличается тропностью к эпителию мочевыводящих путей и других тканей тазовых органов, быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта. Пик его концентрации в крови наблюдается через 1,5-3 часа после приема средней терапевтической дозы. Средняя концентрация спирамицина в различных тканях, определяемая через 3 часа и 48 часов после приема дозы 3 МЕ, составляет соответственно 31 мг/л и 20 мг/л. Быстрое проникновение внутрь клетки обуславливают хороший эффект спирамицина при внутриклеточных инфекциях, вызванных чувствительными к нему микроорганизмами. Особенно интенсивно он накапливается в макрофагах и полиморфноядерных лейкоцитах. Эти клетки участвуют в доставке антибиотика в очаг воспаления и обеспечивают синергизм между природной лизирующей функцией фагоцитов и активностью антибиотика в клетках.

В отличие от других макролидов, спирамицин в меньшей степени метаболизируется в организме. Основной путь элиминации антибиотика — печеночный, что подтверждается определением высоких концентраций в желчи. Он в незначительной мере выводится почками — суточная экскреция составляет от 4 до 20%. Период полувыведения составляет 6,2-7,7 часа. Спирамицин практически не взаимодействует с другими лекарственными препаратами, тогда как эритромицин путем угнетения системы ферментов Р-450 ведет к клинически значимому замедлению метаболизма теофиллина, циклоспорина и ряда других препаратов. Спирамицин не сочетается с препаратами, содержащими дегидратированные алкалоиды спорыньи (Descotes, 1993; Коваленко, Викторов, 2000).

При лечении хламидийной инфекции спирамицин показал активность, сравнимую с доксициклином (Dylewski et al., 1993). Мавров и соавторы (1999, 2001) изучали клиническую эффективность спирамицина (ровамицина) у больных свежим и хроническим генитальным хламидиозом. Под наблюдением находились 78 больных, из них у 31 был свежий неосложненный хламидиоз (с давностью заболевания до 2 месяцев), у 47 — хроническая инфекция (давность заболевания от 6 месяцев до 5 лет). Средний возраст пациентов составил 32 года; мужчин было 44, женщин — 34. При свежих неосложненных формах урогенитального хламидиоза спирамицин назначался перорально в суточной дозе 9 000 000 ЕД (по 3 000 000 ЕД 3 раза в день) в течение 10-12 суток. Лечение хронического, в том числе и осложненного, хламидиоза проводилось комплексно — спирамицин по 1 500 000 ЕД внутривенно, капельно каждые 12 часов и перорально по 3 000 000 ЕД 2 раза в сутки (в перерывах между инфузиями). С целью коррекции иммунного статуса и улучшения проникновения антибиотика в зону воспаления назначали иммуномодуляторы (тимоген, левамизол), индукторы интерферона (циклоферон, неовир), протеолитические ферменты (вобензим), пациенты также получали симптоматическое лечение, физиотерапию, противогрибковые препараты, витамины. У 5 пациентов (6,4%) отмечались побочные явления в виде тошноты и болей в желудке, которые не потребовали отмены препарата. При проведении троекратного контроля с помощью ПИФ и ПЦР (через 1, 2 и 3 месяца) у 2 (7%) из 31 больного свежим хламидиозом были вновь обнаружены хламидии. При контрольном обследовании 47 больных хроническим хламидиозом у 5 из них (11%) была обнаружена *C. trachomatis*. В клинических и биохимических исследованиях крови до лечения и после лечения патологических изменений

обнаружено не было. (Мавров, Мальцева, 2003). Таким образом, спирамицин показал высокую эффективность при лечении урогенитального хламидиоза.

Получены хорошие результаты при лечении рокситромицином мужчин с хламидийным уретритом. Применение рокситромицина (150 мг 2-3 раза в день в течение 10 дней) эффективно при неосложненном хламидиозе (van der Willigen et al., 1986; Lassus, Seppala, 1987; Ridgway, 1998). Длительный прием рокситромицина предотвращает окклюзию периферических артерий у пациентов с персистентной инфекцией *C. pneumoniae* (Wiesli et al., 2002)

Кларитромицин является активным макролидом, который хорошо накапливается в тканях (Patel et al., 1996; Rodvold et al., 1997). Потеекаев и Потеекаев (1998) сообщили о небольшом клиническом испытании кларитромицина при лечении урогенитального хламидиоза. Кларитромицин (клацид) назначался в течение 10 дней в суточной дозе 500 мг на фоне индуктора интерферона (неовир). Авторы получили хороший клинический эффект, подтвержденный лабораторным контролем. Из 26 наблюдавшихся ими больных излечение было достигнуто у 24 (92,3%). У 2 больных, получивших ранее неоднократные курсы разнообразной антибиотикотерапии, при повторных иммуногистохимических и культуральных исследованиях вновь были обнаружены хламидии (Потеекаев, Потеекаев, 1998).

В исследовании, проведенном в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины, кларитромицин был назначен 62 больным неосложненным хламидиозом с давностью заболевания до 6 месяцев. Кларитромицин (фромилд) применялся перорально в качестве монотерапии по 500 мг два раза в сутки с продолжительностью лечения 14 суток. С целью коррекции иммунного статуса и улучшения проникновения антибиотика в зону воспаления назначали иммуномодуляторы (тимоген, левамизол), индукторы интерферона (циклоферон, неовир). Пациенты также получали физиотерапию (лазер, АУФОК, магнитотерапию, СМВ-терапию, фонофорез). По показаниям назначались противогрибковые препараты и зубиотики. У 4 пациентов (6,5%) отмечались побочные явления в виде тошноты и болей в желудке. Положительный клинический эффект был достигнут в 93% случаев. Микробиологический эффект был достигнут в 98% (Мавров, 2001).

Одним из наиболее активных макролидов является джозамицин. Он обладает высокой активностью против *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis et genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*. Джозамицин накапливается в лимфатических узлах, органах малого таза (включая предстательную железу) (Schramm, et al., 1988). При воспалении проницаемость препарата в соответствующий очаг увеличивается. В отличие от других макролидов, джозамицин хорошо проникает как внутрь клеток, так и создает высокие сывороточные концентрации, что имеет значение при лечении системных инфекций, вызванных внутриклеточными паразитами, которые передаются половым путем (*Chlamydia*, *Treponema*) (Li et al., 1997; Skinner, Kalfer, 1998). Джозамицин способен проникать внутрь фагоцитарных клеток – макрофагов, фибробластов, полиморфноядерных гранулоцитов и с ними транспортироваться в воспалительный очаг (Labro, Babin-Chevaue, 1989; Ridgway, 1997; Labro, 2000). Проникая в моноциты, джозамицин подавляет продукцию провоспалительных цитокинов IL-4 и IL-5, оказывая прямое противовоспалительное действие в очаге инфекции (Tei et al., 1997).

Согласно большинству исследований, джозамицин является эффективным антибиотиком для лечения урогенитальных инфекций. Назначение джозамицина по 500 мг 2-3 раза в день *per os* в течение 10-15 дней обеспечивает более чем в 95% клиническое выздоровление и в более чем 98% – микробиологическое выздоровление. Совокупность полученных данных

позволяет считать джозамицин оптимальным препаратом для лечения урогенитальных инфекций (Colombo et al., 1998; Скрипкин, Пашинян, 1999; Александров и соавт., 2000; Потеекаев и соавт., 2000; Шупенько и соавт., 2000; Мавров, 2001; Якубович и соавт., 2001; Мавров, Нагорный, 2002; Мавров и соавт., 2002).

Потеекаев и соавторы (2000) представили результаты применения монотерапии джозамицином (вильпрафеном) у 42 больных урогенитальным хламидиозом. Джозамицин назначался 35 больным по 1000 мг в сутки в течение 12 дней; 7 больным – по 1500 мг в сутки в течение 10 дней. В результате лечения был получен положительный клинический эффект, подтвержденный лабораторно. Из 42 больных излечение было достигнуто у 41 (97,6%). В группе лиц, получавших джозамицин в суточной дозе 1500 мг в течение 10 дней, эффективность лечения составила 100%. Показано, что джозамицин является эффективным противохламидийным средством, позволяющим добиться успеха при лечении больных с хроническими формами урогенитального хламидиоза, в том числе и тех, у которых предшествующее лечение другими препаратами было неэффективным (Потеекаев и соавт., 2000).

Мавров и Нагорный (2002) изучили эффективность и переносимость лечения 26 больных урогенитальным хламидиозом назначением джозамицина (вильпрафена) в сочетании с эхинацином и силибинином (легалоном). Средний возраст пациентов составил 32 года; мужчин было 12, женщин – 14. Давность заболевания от 5 месяцев до 2 лет. У мужчин был подострый уретрит, уретро-простатит; у женщин – цервицит и аднексит. Лабораторная диагностика хламидиоза проводилась с помощью реакции прямой иммунофлуоресценции (ПИФ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). В сомнительных случаях проводилось диагностическое выделение хламидий в культуре клеток L-929. Джозамицин назначался в сочетании с эхинацином и легалоном (Madaus) в течение 20 дней: при массе тела до 60 кг – вильпрафен по одной таблетке (500 мг) два раза в день, эхинацин по 1 таблетке (88,5 мг) три раза в день, легалон по 1 капсуле (140 мг) или по две капсулы (70 мг) два раза в день; при массе тела свыше 60 кг – джозамицин по одной таблетке (500 мг) три раза в день, эхинацин по 1 таблетке (88,5 мг) четыре раза в день, легалон по 1 капсуле (140 мг) или по две капсулы (70 мг) три раза в день. В течение всего курса лечения препараты отличались хорошей переносимостью без побочных явлений. Клинический эффект (полное разрешение клинических проявлений – боли, зуда, выделений из гениталий) наблюдался у 23 (88,5±6,2%) больных. Клинические проявления сохранялись у 3 пациентов (2 женщин и 1 мужчины). Интенсивность их существенно ослабела. Микробиологический эффект лечения отмечен у 24 (92,3±5,2%) больных. У двух мужчин были вновь обнаружены хламидии всеми методами. Больные отрицали половые связи после лечения. У одного из них сохранялись клинические проявления. Таким образом, комплексное лечение больных хламидиозом двадцатидневным курсом джозамицина в сочетании с эхинацином и легалоном показало высокую эффективность. Биохимический контроль показателей функции печени не выявил существенных отклонений в результате применения большой курсовой дозы джозамицина в сочетании с эхинацином и легалоном (Мавров, Нагорный, 2002). Приведенные данные свидетельствуют об эффективности препарата джозамицин в лечении хламидийной инфекции. Особенностью данного исследования было то, что применялась более высокая курсовая доза джозамицина, в отличие от рекомендаций других авторов (Калининченко и соавт., 2000; Хамидуллин, 2000). Кроме того, джозамицин был впервые применен для лечения хламидиоза в сочетании с иммуномодулирующими и гепатопротективными



препаратами растительного происхождения, что, по мнению авторов, позволило улучшить переносимость и фармакологическое действие препарата. Данный лечебный комплекс обоснован имеющимися сведениями о патогенезе хламидиоза и о важности функции печени в метаболизме и элиминации макролидов.

Из всех макролидов джозамицин обладает наименьшим тератогенным эффектом (Czeizel, et al., 2000). Поэтому джозамицин рекомендован для лечения беременных женщин, больных хламидиозом (Handsfield, 1995; Ridgway, 1995). Юцковский и соавторы (2002) назначали джозамицин беременным в сроке от 24 до 32 недель со смешанной хламидийно-уреаплазменной инфекцией. Джозамицин (вильпрафен) давали по 500 мг 2 раза в день № 10 или по 750 мг 2 раза в день №7. Все наблюдаемые 47 женщин отметили хорошую переносимость терапии, при этом побочные эффекты не наблюдались. Этиологическая эффективность лечения зарегистрирована у 43 пациенток, 4 потребовалось проведение дальнейшей терапии. Таким образом, успех лечения в данном исследовании составил  $91,5 \pm 4,1\%$ . Если учитывать сложность лечения беременных в третьем триместре и осторожность при применении больших доз, то результаты этого предварительного исследования можно считать вполне позитивными (Юцковский и соавт., 2002).

Калинченко и соавторы (2000) применили джозамицин при лечении 30 пациентов с мужским бесплодием, обусловленным хламидийной инфекцией в сочетании с микоплазменной и бактериальной инфекцией различного генеза. Было показано отсутствие токсического действия джозамицина на сперматогенез и эффективность при подавлении генитальных инфекций. Назначался вильпрафен в дозе 500 мг 2-3 раза в сутки в течение 14 дней. Выраженных побочных явлений не отмечалось, у 2 пациентов наблюдалась аллергическая реакция на 10-й день приема препарата в виде точечных папулезных высыпаний. При повторном проведении диагностики уретральной флоры с помощью ПЦР, положительный результат лечения был отмечен у 25 ( $83,3 \pm 6,8\%$ ) пациентов. У 5 пациентов с неполным клиническим эффектом была резистентность сопутствующей флоры к макролидам. После проведенного лечения у 20% пациентов сохранялась астеноспермия (Калинченко и соавт., 2000).

Эффективность телитромицина (Ketek®) – первого представителя кетолидов – нового макролидного класса антибиотиков, была изучена при хламидийной инфекции. В молекуле эритронолида А углеводный остаток 3-L-галактозы удален, а гидроксильный радикал окислен до 3-кетогруппы (отсюда – кетолиды). Такая модификация позволяет избежать резистентности к макролидам, вызванной метилированием 23S-rPHK, и улучшает устойчивость в кислой среде желудка. C11-C12 карбамат-кетолиды способны преодолеть механизмы эффлюкса и гидролиза и имеют дополнительные места связывания с рибосомой и подавления синтеза белка в бактериальной клетке, по сравнению с эритромицином А. Замещение боковых цепочек у C11-C12 карбамат-кетолидов улучшает активность против хламидий *in vitro* и *in vivo*, по сравнению с кларитромицином, способствует проникновению в ткани и клетки, улучшает переносимость (Denis et al., 1999; Bryskier, 2000; Ackermann, Rodloff, 2003).

Телитромицин обладает высокой активностью против различных патогенных бактерий, включая грамположительные аэробы *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, грамотрицательные палочки *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, внутриклеточные патогены – *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydophila pneumoniae*, а также *Mycoplasma hominis* и *genitalium* (Bebear et al., 1997; Barry et al., 1998). В отличие от многих других макролидов, телитромицин не индуцирует MLSB-резистентность и сохраняет активность по отношению ко многим бактериям, резистентным к эритромицину А, а также имеющим

множественную устойчивость (Pankuch, et al., 1998). В отличие от других макролидов, кетолиды лишь в незначительной степени снижают свою активность в результате метилирования аминокислотных остатков, активность их против устойчивых штаммов различных бактерий в 16-250 раз выше, чем кларитромицина (Liu, Douthwaite, 2002). Кетолиды значительно более активно, чем другие макролиды, концентрируются в полиморфноядерных нейтрофилах, которые доставляют их к месту воспаления (Vazifeh et al., 1997; 1998; 2002; Ackermann, Rodloff, 2003).

Телитромицин показал высокую активность против *S. pneumoniae* при лечении пневмоний (Hammerschlag et al., 2001; Miyashita et al., 2001). Кроме телитромицина, имеются другие кетолиды (ABT 773), высокоактивные (*in vitro*) против многих штаммов *S. pneumoniae*. Минимальная ингибирующая концентрация составляет 0,03-0,15 мкг/мл, что вдвое активнее рокситромицина и азитромицина (Roblin, Hammerschlag, 1998; Gustafsson et al., 2000; Stringl et al., 2000).

Резистентность к макролидам имеет все большее клиническое значение. Известно три вида устойчивости бактерий к макролидам. Механизм резистентности к макролидам может быть связан с метилированием рРНК, наличием специальных эффлюксных белков и ферментативной инактивацией антибиотика (Ross et al., 1999; Kataja et al., 1999; Weisblum, 1998). Описан также вид резистентности к макролидам, связанный с мутациями рибосомальных протеинов L4 и L22 (Tait-Kamradt et al., 2000). Устойчивость к макролидам и кетолидам может быть связана с экспрессией коротких пептидов, что, в частности, обнаружено у *E. coli*. Однако клиническое значение этого вида резистентности пока не ясно (Tripathi et al., 1998).

Механизм обусловлен посттранскрипционной модификацией 23S-рРНК, осуществляется ферментом аденин-N6-метилтрансферазой. В результате присоединения метильной группы изменяется сайт связывания MLSB-антибиотиков (macrolide-lincosamide-streptogramin B). Гены, кодирующие метилазы, носят название *erm* (erythromycin ribosome methylation). Вскоре после начала применения эритромицина, в 1950-х годах появились сообщения об устойчивости патогенных бактерий к этому антибиотику (Leclercq, Courvalin, 1991). Штаммы, резистентные к эритромицину, часто также обладают устойчивостью к линкозамину и стрептограмину B – MLSB-резистентность. Впервые этот феномен был описан у стафилококков (*Staphylococcus aureus*), которые подвергались воздействию низких концентраций эритромицина (Weisblum, Demohn, 1969). Низкие концентрации эритромицина приводят к экспрессии у бактерий фермента метилтрансферазы (*ErmC*), который присоединяет  $\text{CH}_3$ -группу к шестому атому азота аденозина в позиции 2058 (A2058) 23S-рибосомальной РНК бактерий (нумерация дана по *Escherichia coli*) (Lai, Weisblum, 1971; Skinner et al., 1983). Идентифицировано множество *erm*-генов, кодирующих метилтрансферазы и обуславливающих устойчивость к эритромицину. Все они метилируют аденозин в позиции 2058 (Weisblum, 1995; Roberts et al., 1999). MLSB-резистентность может быть генетической и фенотипической. Фенотипическая, или индуцированная, MLSB-резистентность прямо не связана с классом *erm*-гена, а определяется регуляторным участком структурного гена метилазы (Lodder et al., 1996; 1997; Beyer, Pepper, 1998; Schwarz et al., 1998; Werckenthin et al., 1999). При фенотипической устойчивости развивается резистентность ко всем MLSB-антибиотикам. Генетическая устойчивость, определяемая классом *erm*-гена, проявляется в отношении к 14-членным и 15-членным макролидам, тогда как 16-членные макролиды сохраняют свою активность (Weisblum, 1995; 1998; 1999).

Выявлены и другие механизмы устойчивости к макролидам, связанные с изменением структуры рибосомальной РНК. Это происходит в результате точечных мутаций, вызывающих замену нуклеотида в 23S-рибосомальной РНК (Sigmund et al., 1984; Vester, Garrett, 1987) (табл. 13.7).

Таблица 13.7

## Мутации 23S-рибосомальной РНК бактерий, вызывающие устойчивость к макролидам

Позиция в 23S-рРНК (соответствующая <i>E. coli</i> )	Микроорганизмы	Нуклеотиды		Устойчивость к антибиотикам	Авторы, год
		Дикие типы	Мутанты		
754	<i>Escherichia coli</i>	U	A	Эритромицин, телитромицин	Xiong et al., 1999
2057	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Propionibacter</i> spp.	G	A	Эритромицин, линкозамин	Douthwaite, 1992 Etayebi et al., 1985 Harris et al., 1989 Ross et al., 1997
2032	<i>Helicobacter pylori</i>	A+G	G+A	Эритромицин, кларитромицин, азитромицин	Hulten et al., 1997
2058	<i>Brachyspira hyodysenteria</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium kansasii</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Propionibacter</i> spp. <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptomyces ambifaciens</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Treponema pallidum</i>	A	G, U	Эритромицин, кларитромицин, азитромицин, тилозин, линкозамин, стрептогамин В	Burman et al., 1998 Debets-Ossenkopp et al., 1998 Douthwaite, 1992 Harris et al., 1989 Karlsson et al., 1999 Lucier et al., 1995 Meier et al., 1994 Nash, Inderlied, 1995 Occhialini et al., 1997 Pernodet et al., 1988 Ross et al., 1997 Sander et al., 1997 Sigmund et al., 1984 Sor, Fukuhara, 1982 Stamm, Bergen, 2000 Stone et al., 1996 Tait-Kamradt et al., 2000 Versalovic et al., 1996 Vester, Garrett, 1987 Wallace et al., 1996 Wang, Taylor, 1998
2059	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium chelonae</i> <i>Mycobacterium intracellulare</i> <i>Mycobacterium avium</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Propionibacteria</i>	A	C, G	Макролиды-линкозамин-стрептогамин В Кларитромицин Азитромицин	Debets-Ossenkopp et al., 1998 Lucier et al., 1995 Meier et al., 1994 Occhialini et al., 1997 Ross et al., 1997 Sander et al., 1997 Tait-Kamradt et al., 2000 Versalovic et al., 1996 Wallace et al., 1996 Wang, Taylor, 1998

Продолжение таблицы 13.7

Позиция в 23S-рРНК (соответствующая <i>E. coli</i> )	Микроорганизмы	Нуклеотиды		Устойчивость к антибиотикам	Авторы, год
		Дикие типы	Мутанты		
2052	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	C	U	Карбомицин Линкозамин	Aagaard et al., 1994
2611	<i>Chlamydomonas moewusii</i> <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C	A, G, U	Эритромицин Спирамицин Линкозамин	Gauthier et al., 1988 Harris et al., 1989 Sor, Fukuhara, 1982 Tait-Kamradt et al., 2000 Vannuffel et al., 1992

Такие мутации у *Chlamydiales* пока не выявлены, однако, учитывая, что эти мутации затрагивают консервативные участки рибосомальной РНК, которые мало отличаются у различных бактерий, то наличие таких мутаций у хламидий весьма вероятно.

Другим механизмом резистентности к макролидам является наличие эффлюксных белков, кодируемых тремя классами генов – *mef*, *msr* и *vga*. Этот вид устойчивости к макролидам преобладает в последние годы (Arpin, et al., 1999; Clancy et al., 1998; Luna et al., 1999; Roberts et al., 1999; Ross et al., 1995; Shortridge et al., 1996; Sutcliffe et al., 1996; Tait-Kamradt et al. 1996; Widdowson, Klugman, 1998; Widdowson, Klugman, 1999; Wondrack et al., 1996). Ген *Utys mef* (macrolide efflux), кодирующий этот вид устойчивости к макролидам, находится в конъюгирующих элементах хромосом, которые обмениваются в результате процесса конъюгации между различными видами и родами бактерий, что может привести к передаче такой устойчивости. Гены *msr* отличаются от *mef*-генов тем, что последние обуславливают устойчивость не только к макролидам, но и к стрептограмину В (фенотип MS). Гены *msrA* и *msrB* обнаружены у *S. aureus*. Гены *vga*, *vgaB* определяют устойчивость к стрептограмину А.

Механизм, обеспечивающий ферментативную инактивацию антибиотика, заключается в гидролизе лактонного кольца макролидов – ферменты EreA и EreB (гены *ereA* и *ereB*). Другой фермент – фосфотрансфераза типа I (*mphA*) и типа II инактивирует макролиды, вводя фосфат в 2'-гидроксильную группу аминокислот.

**Макролиды – одна из самых безопасных групп антибиотиков, редко вызывающих серьезные побочные эффекты.** Наиболее типичными для макролидов являются реакции со стороны верхних отделов желудочно-кишечного тракта в виде болей, тошноты и рвоты, которые чаще возникают при оральном приеме высоких доз препаратов, но могут наблюдаться и при внутривенном введении. Развитие диспептических расстройств наиболее характерно для эритромицина и олеандомицина, что связано с их стимулирующим действием на моторику желудочно-кишечного тракта. Данные препараты являются агонистами рецепторов, чувствительных к эндогенному стимулятору моторики – мотилину. 16-членные препараты



(джозамицин) реже вызывают диспептические явления (Pilot, Qin, 1988). Нежелательные реакции со стороны нижних отделов кишечника возникают редко, хотя описаны случаи развития диареи. Возможно развитие суперинфекции (*Candida*, грамотрицательные бактерии) в желудочно-кишечном тракте или влагалище. Гиперчувствительность к макролидным антибиотикам отмечается очень редко (Leclercq, Couvralin, 1995; Gialdroni et al., 1995).

В процессе биотрансформации 14-членные макролидные антибиотики способны превращаться в нитрозоалкановые формы, которые связываются с цитохромом P-450 и образуют с ним неактивные комплексы. Тем самым макролиды могут тормозить метаболизм в печени других лекарственных препаратов, повышая их концентрацию в крови и усиливая не только терапевтические эффекты, но и риск токсичности. Наиболее сильным ингибитором цитохрома P-450 является тролеандомицин. Другие препараты по уменьшению негативного эффекта можно расположить в следующем порядке: кларитромицин > эритромицин > рокситромицин > азитромицин > спирамицин > джозамицин (Miura et al., 1989; Gialdroni et al., 1995; Vanuffel, Cocito, 1996). Большинство сообщений об имеющем клиническое значение лекарственном взаимодействии макролидов касается эритромицина и кларитромицина. Использование их в сочетании с варфарином, карбамазепином или теофиллином чревато развитием нежелательных реакций, свойственных последним. Следует избегать одновременного назначения макролидов и циклоспорина. При сочетании эритромицина с ловастатином отмечены случаи тяжелой миопатии и рабдомиолиза. Макролиды способны повышать биодоступность дигоксина при приеме внутрь, благодаря подавлению микрофлоры толстой кишки (*Eubacterium lentum*), которая инактивирует дигоксин. Всасывание некоторых макролидов, особенно азитромицина, в желудочно-кишечном тракте может ослабляться при приеме антацидов. Антигистаминные препараты терфенадин и астемизол, а также прокинетики цизаприд противопоказаны больным, принимающим эритромицин или кларитромицин, вследствие высокого риска развития фатальных нарушений сердечного ритма.

### 13.1.3. Фторхинолоны

Еще одной группой этиотропных средств, сыгравших и продолжающих играть важную роль в лечении хламидиоза, являются кинолон-карбоксильные кислоты – фторхинолоны (Wolfson et al., 1985). Уникальный механизм действия, спектр антибактериальной активности, фармакокинетика фторхинолонов привели к интенсивным исследованиям их клинической эффективности, в том числе и при хламидиозах (Megran, 1989). Хинолоны являются ингибиторами ДНК гиразы (топоизомеразы) бактерий и представляют собой синтетические антимикробные субстанции – производные налидиксовой кислоты, препарат которой (Nogram) появился в 1963 году. Налидиксовая кислота обладает узким спектром действия преимущественно на энтеробактерии (*Enterobacter*). Позже появились другие близкие ей в структурном отношении дериваты: пипемидовая кислота (Deblaston, 1977 год), ризоксацин (Winuron, 1981 год), циноксацин (Cinoxacin Rosen-Pharma, 1983 год). По сравнению с современными фторхинолонами, эти препараты обладали невысокой антибактериальной активностью и неблагоприятной фармакокинетикой, однако с успехом применялись при инфекциях мочевыводящих путей. К настоящему времени они утратили свое значение.

Эра широкого применения фторхинолонов началась со второй половины 1980-х годов с появлением норфлоксацина (Varazan, 1984 год), офлоксацина (Tarivid, 1985 год), эноксацина

(Enoxor, 1987 год) ципрофлоксацина (Ciprobaу, 1987 год), пефлоксацина (Peflacin, 1992), флероксацина (Quinodis, 1995). Расширение спектра действия, усиление активности новых фторхинолонов, а также улучшение их фармакокинетики привело к стремительному расширению применения препаратов этой группы (Kresken, Hafner, 2001; Simon, Stille, 2000; Oliphant, Green, 2002; Zhanel et al., 2002).

По химической структуре современные фторхинолоны являются производными хинолонкарбоновой кислоты. Общими структурными признаками всех фторхинолонов является оксогруппа в позиции 4, кислотная функциональная группа в позиции 3, атом фтора в позиции 6, а также по одному заместителю в 1-м и 7-м положениях. Некоторые из фторхинолонов имеют также замещения в 5 и 8 позициях основной структуры хинолона (рис. 13.10) (Domagala, 1994; Zhanel et al., 2002). При этом замещение в N-1 обязательно для антибактериальной активности молекулы. Оптимальным является циклопропиловый остаток, который (за исключением левофлоксацина) имеется во всех новых фторхинолонах.

Незаменимыми структурами для связывания фторхинолонов с комплексом ДНК-гираза и проникновения в бактериальную клетку являются карбоксильная группа в позиции 3 и кетогруппа в позиции 4. (рис. 13.10). Эти заместители имеются у всех фторхинолонов и являются причиной образования комплексов с катионами ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ). Замещение

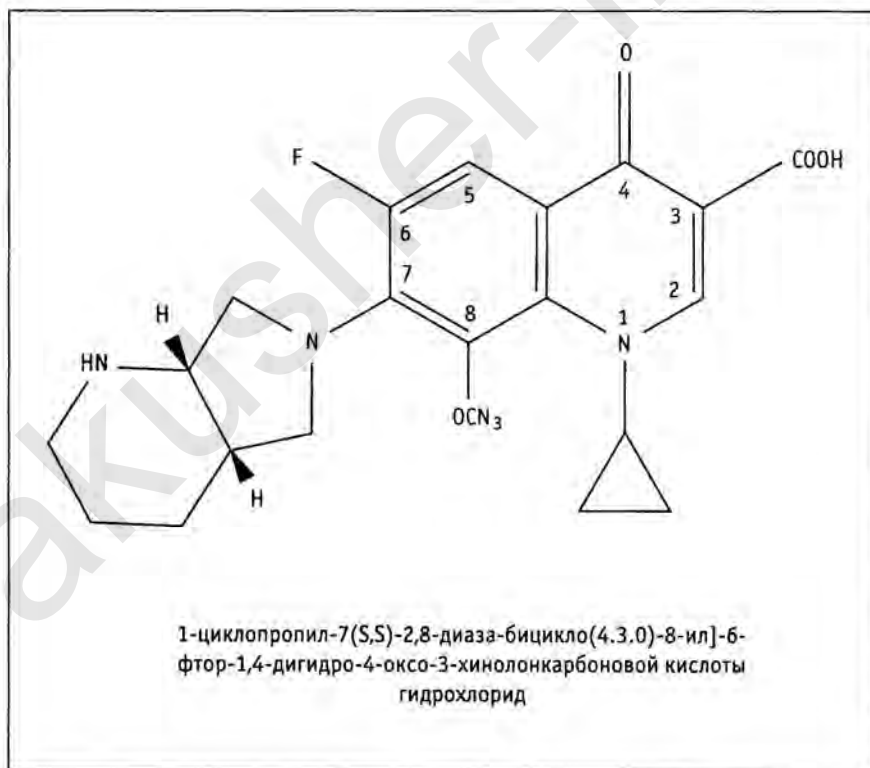


Рисунок 13.10. Химическая структура моксифлоксацина (Stass et al., 1998; Страчунский, Кречинов, 2002)

в С-5 основной структуры хинолона в значительной степени определяет активность молекулы в отношении грамотрицательных бактерий и хламидий, в частности. Оптимальным является замещение атомов водорода в позиции 5 на группы  $\text{NH}_2$  или  $\text{CH}_3$ , как в спарфлоксацине (Zagam) или грепафлоксацине (Vaxar). Атом фтора в позиции 6 повысил активность по сравнению с прежними ингибиторами гиразы. Он усиливает ингибирование ДНК-гиразы и повышает проникновение молекулы в бактериальную клетку, поэтому рассматривается, как незаменимый для повышения антибактериальной активности. Изменения в позиции 7 основной структуры хинолона улучшают эффективность против грамотрицательных возбудителей и ответственны за фармакокинетические свойства фторхинолонов. При этом замещенное пирролидиновое кольцо в тровафлоксацине (Trovan) и моксифлоксацине (Avelox) повышает активность в отношении грамположительных бактерий. В то же время пиперациновое кольцо в ципрофлоксацине, левофлоксацине или в гатифлоксацине (Vopod, Tebris) повышает активность по отношению к грамотрицательным возбудителям. Дальнейшее алкилирование этой кольцевой системы усиливает активность в отношении грамположительных организмов, удлиняет период полураспада и повышает водорастворимость, что снижает риск кристаллурии. За счет заместителей в С-7 снижается потенциал взаимодействия и риск побочного влияния на ЦНС. Особенно благоприятными как заместители являются пиперацин или пирролидин. Замещение в позиции 8 расширяет антибактериальный спектр фторхинолонов в отношении анаэробов, улучшает водорастворимость и биодоступность, однако это замещение ответственно за побочные эффекты. Так, галогенизация в С-8 обуславливает фототоксичность фторхинолонов, например, флероксацина (Quinodis), спарфлоксацина и ломефлоксацина (Okazin). Замена галогена метоксиновой группой в моксифлоксацине и гатифлоксацине повышает фотостабильность и в значительной степени устраняет фототоксичный эффект при сохранении активности в отношении анаэробов. Метоксиновые заместители в позиции 8 также замедляют развитие резистентности и уменьшают взаимодействие с теофиллином (рис. 13.10) (Domagala, 1994; Petersen, 2001; Zhanel et al., 2002).

Антибактериальное действие фторхинолонов, сводится к торможению бактериальной ДНК-гиразы (топоизомеразы II). Эти ферменты выполняют строго определенные функции в процессе формирования пространственной структуры молекулы ДНК при ее репликации. ДНК-гираза катализирует расплетение (отрицательную суперспирализацию) нитей ДНК, а топоизомераза участвует в разъединении (декатенации) ковалентно-замкнутых кольцевых молекул ДНК. Ингибирование этих ферментов нарушает процессы роста и деления бактериальной клетки, что приводит к ее гибели (рис. 13.11).

Основной мишенью фторхинолонов у хламидий является ДНК-гираза, которая выполняет важную функцию при репликации, транскрипции, рекомбинации и репарации бактериальной ДНК. Этот фермент необходим для образования особой складчатой структуры ДНК – суперспирализации наподобие супервинта. Это скручивание позволяет «упаковать» сравнительно длинную бактериальную хромосому в крайне малом пространстве, занимаемом микробной клеткой (для хламидий – менее  $1 \text{ мкм}^3$ ). Длина хромосомы в развернутом состоянии более чем в 1000 раз превосходит диаметр элементарного тельца хламидий. «Упаковка» достигается за счет того, что ДНК вначале сворачивается в виде спирали и организуется в так называемые зоны (домены) скручивания (domains of supercoiling). Дальнейшее сжатие в пространстве достигается за счет сверхспирализации – повторного скручивания бактериальной ДНК. При этом витки вторичной спирали (суперспирали) направлены против витков первичной



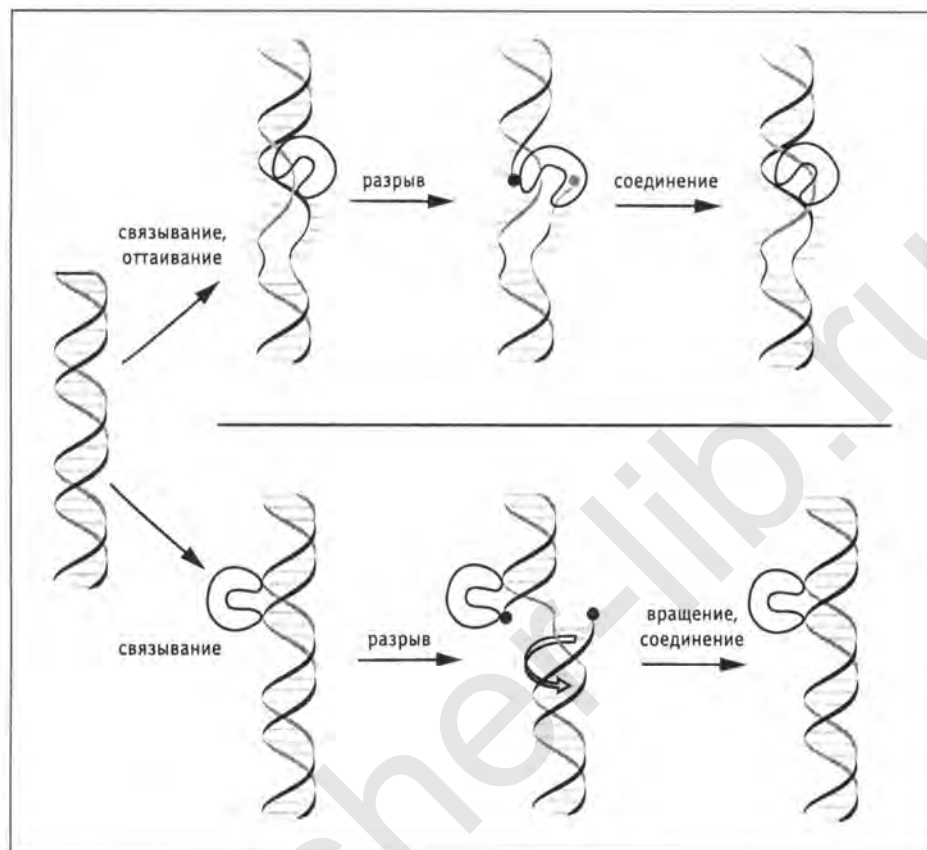
Рисунок 13.11. Механизм действия фторхинолонов.

спирали Уотсона и Крика в линейной ДНК (отрицательное вращение оси). Суперспирализация представляет собой процесс, при котором происходит расходование АТФ. Он начинается с разделения хромосомной двойной нити посредством субъединицы А гиразы (рис. 13.12).

Быстрое раскручивание цепей ДНК в процессе репликации (4500 об/мин) предполагает, что вся хромосома, расположенная впереди репликативной вилки, должна вращаться с такой же скоростью. Избежать этого клетке помогает «шарнир» в ДНК, благодаря которому вращаться приходится только короткому участку ДНК. Это достигается за счет кратковременного разрыва одной из цепей ДНК, который быстро восстанавливается после одного или нескольких оборотов. У бактерий кратковременные разрывы и воссоединения ДНК обеспечиваются ферментом ДНК-гиразой (*gyration* – вращение). Этот фермент не позволяет ДНК вращаться в процессе репликации. Закручивание ДНК с помощью гиразы обуславливает сверхспиральное состояние хромосомы. Благодаря гиразе все кольцевые ДНК бактериальных клеток поддерживаются в сверхспиральной форме (рис. 13.12).

Предполагается, что фторхинолоны действуют на последнем этапе сверхспирализации. Они тормозят комплекс гираза-ДНК, который разделяет двойную хромосомную нить, инициирует отрицательную суперспираль и затем снова закрывает двойную нить ДНК. Фторхинолоны ингибируют субъединицы А гиразы. Субъединицы В воздействиям фторхинолонов не подвергаются, но принимают участие в развитии резистентности в отношении фторхинолонов. Молекула фторхинолона фиксирует комплекс гираза-ДНК на этапе реакции, в котором гираза ковалентно связана с ДНК. В результате прекращаются реакции полимеризации вдоль ДНК, так же, как репликация и транскрипция ДНК. «Карман» связывает молекулу фторхинолона между субъединицами гиразы А (*GyrA*) и В (*GyrB*). Место связывания расположено таким образом, что аминокислотные остатки 426 и 447 полипептидной цепи гиразы связываются с молекулой ципрофлоксацина. Фторхинолон взаимодействует с выгнутым участком ДНК в месте действия гиразы. Нижняя часть молекулы взаимодействует с аминокислотными





**Рисунок 13.12.** Механизм действия Ддб-гиразы А (вверху) и В (внизу). Показан сегмент «сверхспирализированной» Ддб. образование отрицательных сверхвитков под действием Ддб-гиразы. Ддб-гираза делает в одной из цепей Ддб разрыв. через открывшуюся брешь выходит интактная цепь, после чего концы разорванной цепи сшиваются тем же ферментом (Dekker et al., 2002).

остатками GyrA, включая Ser83 и Asp87. Химическая группа, присоединенная к атому углерода в позиции 7, взаимодействует с Asp426 и Lys447 GyrB (Yoshida et al., 1993; Heddle, Maxwell, 2002) (рис. 13.13).

Микробная клетка немедленно реагирует «стрессовыми реакциями» в виде продукции белков теплового шока, назначением которых является сигнал «SOS» для репарации повреждений ДНК. Чтобы выиграть время для «аварийного ремонта», временно прерывается процесс деления клеток. Хинолоны вызывают длительную индукцию сигналов, что приводит к истощению данного защитного механизма, дезинтеграции мембран и гибели микробной клетки.

Хинолоны тормозят не только синтез хромосомной ДНК, но и ДНК плазмид и бактериофагов, что приводит к элиминированию плазмид, торможению репликационной транспозиции бактериофагов. В высоких дозах фторхинолоны вызывают также торможение топоизомеразы IV – фермента, играющего роль при разделении (декатенировании) реплицированной

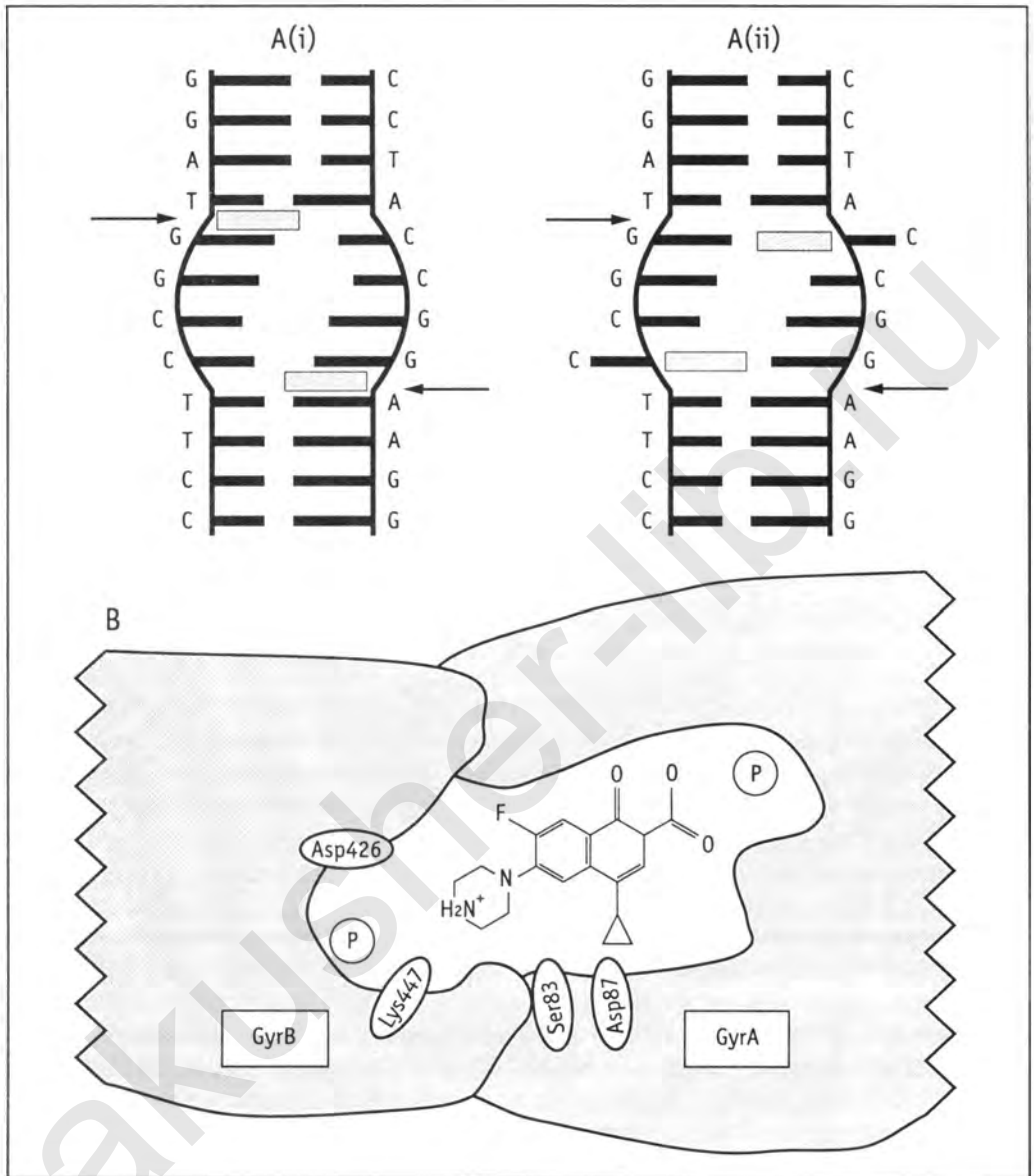


Рисунок 13.13. Схема действия фторхинолонов. Взаимодействие с ДНК и с ДНК-гиразой бактерий (Heddle, Maxwell, 2002)

ДНК. Две субъединицы топоизомеразы IV – ParC и ParE, а также субъединицы ДНК-гиразы (A2 и B2), являются гомологами. У *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae* они кодируются посредством гиразы А-подобного (*gylA*) или, соответственно, гиразы В-подобного (*gylB*) генов. Аналогичные гены имеются и у *Chlamydiales*. Мутации указанных генов участвуют в развитии устойчивости по отношению к фторхинолонам (Stahlmann, Riecke, 2001; Jetter, Fuhr, 2001).

Клетки человека также содержат топоизомеразу со свойствами, подобными бактериальной топоизомеразе. Однако фторхинолоны не могут воздействовать на этот фермент, поскольку человеческая топоизомераза не вызывает суперспирализации ДНК. У человека этот процесс происходит под воздействием хромосомных белков – гистонов. Однако фторхинолоны могут воздействовать на процессы рекомбинации ДНК эукариотных клеток, что приводит к нарушениям трансформации и дифференциации клеток на этапах эмбрионального и постэмбрионального развития. Этим объясняется тератогенное действие фторхинолонов и их неблагоприятное влияние на растущий молодой организм. Фторхинолоны противопоказаны при беременности, кормлении и лицам до 18 лет (Коваленко, Викторов, 2000).

Фторхинолоны различаются по антибактериальной активности, фармакокинетике и по области применения. Они подразделяются на четыре группы (поколения) (табл. 13.8) (Quintiliani et al., 1999; Naber, Adam, 1998; Страчунский, Кречинов, 2002; Яковлев, Яковлева, 2002).

Нефторированные хинолоны (налиндиксовая кислота, пипемидиновая кислота, розоксацин, циноксацин) практически не применяются в клинической практике. Естественно, что данная классификация условная, резких границ между группами нет. В особенности это относится к границе между офлоксацином, ципрофлоксацином и левофлоксацином (Naber, Adam, 1998). Норфлоксацин и пефлоксацин представляют собой два фторхинолона, которые вследствие исключительно оральной формы применения и низкой антихламидийной активности не применяются для лечения генитального хламидиоза, который в настоящее время считается системной инфекцией. Норфлоксацин и пефлоксацин применимы при лечении бактериального энтерита, гонореи и простатита, не связанных с хламидийной этиологией. Вследствие длительного времени полураспада (7-13 часов) они рекомендованы для лечения неосложненного цистита (Naber, Adam, 1998;). К группе II наряду с эноксацином, флероксацином, офлоксацином и ципрофлоксацином, отнесены четыре фторхинолона, которые, исключая эноксацин и флероксацин, могут использоваться также в парентеральной форме применения. Они обнаруживают высокую активность *in vitro* в отношении энтеробактерий и *Haemophilus influenzae*, но лишь умеренную активность в отношении стафилококков, пневмококков, энтерококков, а также хламидий и микоплазм. Ципрофлоксацин, кроме того, активен к *Pseudomonas aeruginosa* и в этом отношении принадлежит к наиболее активным фторхинолонам. Эноксацин, флероксацин, офлоксацин и ципрофлоксацин обладают отчетливо более широким спектром показаний, охватывающим, кроме инфекций мочевыводящих путей, инфекции дыхательных путей (в особенности, вызываемые грамотрицательными бактериями), кожи, мягких тканей, костные, а также системные инфекции, вплоть до сепсиса.

К группе III фторхинолонов были отнесены левофлоксацин, спарфлоксацин и грепафлоксацин. Они обнаруживают, при сохраняемой эффективности в отношении грамотрицательных бактерий, улучшенную активность в грамположительной области, а также в отношении «атипичных» возбудителей. Так как спарфлоксацин и грепафлоксацин, вследствие значительных нежелательных побочных эффектов, были изъяты из применения в ряде стран, левофлоксацин является сейчас единственным представителем указанной группы. Левофлоксацин представляет собой левовращающий биологически активный энантиомер офлоксацина и обладает таким же спектром антибактериального действия, как и офлоксацин. (табл. 13.8). Поскольку левофлоксацин, во-первых, применяется в более высоких дозах и, во-вторых,

Спектр активности и показания для применения фторхинолонов (Naber, Adam, 1998)

Поколение	Спектр активности	Непатентованное название	Свойства
I — нефторированные хинолоны	<i>Enteobactericea</i>  Высокая активность против грамотрицательных бактерий и <i>S. aureus</i> .	Налидиксовая кислота Оксолиновая кислота Пипемидовая кислота  Норфлоксацин Пефлоксацин	В настоящее время с целью антибактериальной терапии применяются редко  Лишь для орального применения. Показания ограничиваются инфекциями мочевыводящих путей (гонорея, бактериальный уретрит). Низкая активность при генитальном хламидиозе
II — «грамотрицательные» фторхинолоны	Умеренная активность против <i>Chlamydia trachomatis</i> и <i>Ureaplasma urelyticum</i> . Низкая активность против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Chlamydochloa pneumoniae</i> .	Офлоксацин Ломефлоксацин Ципрофлоксацин Эноксацин Флероксацин	Для орального и парентерального применения. Широкий спектр показаний: инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, кожи и мягких тканей, остеомиелит, сепсис. Могут применяться для лечения генитального хламидиоза при парентеральном введении в больших дозах. Низкая активность при хламидийной пневмонии
III — «респираторные» фторхинолоны	Высокая активность против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma urelyticum</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydochloa pneumoniae</i> .	Левифлоксацин Спарфлоксацин Темафлоксацин Грепалофлоксацин	Для орального и парентерального применения. основными показаниями являются все виды инфекций дыхательных путей, а также инфекции мочевыводящих путей. Эффективны при генитальном хламидиозе и хламидийной пневмонии
IV — «антианаэробные» фторхинолоны	Высокая активность против анаэробов ( <i>Bocteroides fragilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Fusobacterium spp.</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i> ), а также против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Ureaplasma urelyticum</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydochloa pneumoniae</i> .	Тровафлоксацин Клинафлоксацин Моксифлоксацин Гемифлоксацин Гатифлоксацин	Для орального и парентерального применения. основными показаниями являются инфекции дыхательных путей (моксифлоксацин, гатифлоксацин), мочевыводящих путей, кожные инфекции и инфекции мягких тканей (гатифлоксацин). Эффективны при генитальном хламидиозе и хламидийной пневмонии. Нет окончательных данных о применении для костных инфекций, желудочных, системных инфекций, сепсиса, менингита



обнаруживает *in vitro* вдвое более высокую активность, он допущен к применению при пневмококковой пневмонии. Поэтому левофлоксацин был отнесен к группе III. Окончательное отнесение конкретного фторхинолона к той или иной группе является дискуссионным (Naber, Adam, 1998). К группе IV отнесены trovафлоксацин (изъятый в 1999 году вследствие поражений печени), моксифлоксацин и гатифлоксацин, которые обнаруживают улучшенную активность по отношению к *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae*. Кроме того, фторхинолоны группы IV эффективны в отношении анаэробов, в частности, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, фузобактерий и пептострептококков. Общепринятыми областями применения являются инфекции дыхательных путей, мочевыводящих путей, инфекции кожи и мягких тканей (только гатифлоксацин). В какой степени они могут быть допущены к лечению костных, желудочно-кишечных и системных (сепсис и менингит) инфекций, в настоящее время еще нельзя утверждать с определенностью (Naber, Adam, 1998;).

Оральная биодоступность фторхинолонов, как правило, составляет 80-100%. Исключение составляет только норфлоксацин, биодоступность которого составляет 40%. Биодоступность ципрофлоксацина обнаруживает достаточно высокую вариабельность (табл. 13.9).

Ципрофлоксацин, левофлоксацин, моксифлоксацин и офлоксацин применяются также в парентеральной форме, которая весьма эффективна и показана при тяжелых осложненных хламидийных инфекциях. Связывание с белком плазмы незначительно и варьируется от 14% (офлоксацин) до 50% (флероксацин, моксифлоксацин). Проникновение в жидкости и ткани организма является высоким. Объем распределения в равновесном состоянии в среднем более 2 литров на килограмм массы тела. Как правило, фторхинолоны обнаруживают в тканях в более высоких концентрациях, чем в плазме. Высока также аккумуляция в макрофагах и полиморфноядерных лейкоцитах (Vazifeh et al., 1999; Pascual et al., 1999; Walters et al., 1999; Garcia et al., 2000; Paillard et al., 2002). Через гематоэнцефалический барьер фторхинолоны проникают плохо. Поэтому при менингите они не являются препаратами выбора. Исключение составляет офлоксацин, концентрации которого в цереброспинальной жидкости могут достигать примерно 90% от концентрации в плазме. Выведение фторхинолонов частично происходит за счет метаболических превращений в печени, а частично – в неизменном состоянии осуществляется почками. Так, пefлоксацин метаболизируется почти на 90%. Офлоксацин, левофлоксацин и гатифлоксацин, напротив, выводятся почками почти в неизменном состоянии. Прочие фторхинолоны выводятся как через печень, так и посредством почек. Необходимо поэтому обращать внимание на нарушения функций печени и, в особенности, почек при выборе дозирования (Oliphant, Green, 2002; Zhanet et al., 2002; Paladino, 2001).

В последние годы устойчивость возбудителей по отношению к фторхинолонам наблюдается чаще. Она связана с растущим использованием ингибиторов гиразы в клинической и сельскохозяйственной практике. Развитие резистентности обусловлено исключительно хромосомными мутациями. Связанная с плазмидами резистентность не обнаружена (Kresken, Hafner, 2001). У грамотрицательных бактерий и у *Chlamydiales* это изменение структуры – субъединицы A гиразы (в большей степени) и топоизомеразы IV (в меньшей степени). Предпочтительные положения для мутаций резистентности – высококонсервированные аминокислоты внутри области, определяющей устойчивость. Кроме того, важную роль играет уменьшенное аккумулялирование фторхинолонов вследствие усиленной экспрессии неспецифических эффлюксных насосов (AcrAB, TolC) (Jetter, Fuhr, 2001). Развитие резистентности

**Основные фармакокинетические данные фторхинолонов после приема  
внутри разовых терапевтических доз**  
(Paladino, 2001; Oliphant, Green, 2002; Zhanet et al., 2002)

Международное непатентованное название	Норфлоксацин	Офлоксацин	Эноксацин	Ципрафлоксацин	Флероксацин	Левифлоксацин	Моксифлоксацин	Гатифлоксацин
Разовая доза	400 мг	400 мг	400 мг	500 мг	400 мг	500 мг	400 мг	500 мг
Биодоступность (%)	35-45	85-95	80-90	52-84	96-102	99	86-92	96
C <sub>max</sub>	1,4-1,8	3;5-5;3	2,8-3; 6	1,5-2,8	4,4-6,8	4;5-5;2	2,5-5	3,4-4,5
t <sub>max</sub>	1,5-2,5	1-2	1-1,5	1-1,5	0,7-2	1,3-1,6	1-2	0;8-2
Связывание с белком (%)	25	14	38	20-35	23-50	24-38	39-48	20
Объем распределения (л/кг)	1,4	1,1-1,6	2; 5	3,5-4,8	1,3-1,5	1,1-1,3	3,1-3,6	1,6-1,8
Период полувыведения (ч)	5-7	3,3-5,5	3,3-5,8	2,5-5,4	9,1-15	6,8-7,4	8,3-15,6	6,8-9,3
Выведение с мочой (%)	30-40	70-90	65-72	40-60	75-83	64-10	35	65-90
Выведение с калом (%)	28	4	18	15	10-13	22	61	6

связано с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB*, которые кодируют ДНК-гиразу, и в *parC* (*griA*) и *parE* (*griB*), которые кодируют топоизомеразу IV. Кроме того, к устойчивости могут привести мутации в гене *norA*, который кодирует эффлюксные мембранные белки, выводящие фторхинолоны из клетки (Hooper, 1999). Высокий уровень резистентности возникает вследствие сочетания этих двух механизмов (Janoir et al., 1996). Мутации, возникающие в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, значительно меньше влияют на активность моксифлоксацина, чем других фторхинолонов. У *Escherichia coli* двойная мутация гена *gyrA* приводит к выраженному снижению активности фторхинолонов. Так, концентрация, подавляющая активность фермента-мишени на 50% (IC50), для норфлоксацина, ципрофлоксацина и спарфлоксацина возрастает более чем в 500 раз, в то время как для моксифлоксацина это возрастание не превышает 12 раз. Эффлюкс-мутация в гене *norA* значительно меньше влияет на активность гидрофобных препаратов, таких как моксифлоксацин, чем на активность гидрофильных препаратов, например ципрофлоксацина (Schedlelzy et al., 1999; Schmitz).

Имеется экспериментальное подтверждение развития устойчивости к ципрофлоксацину, офлоксацину и спарфлоксацину у *Chlamydia trachomatis*. Dessus-Babus и соавторы (1998) пассировали *C. trachomatis*, серотип L2 в среде с низкими субтерапевтическими концентрациями офлоксацина (0,5 мкг/мл) и спарфлоксацина (0,015 мкг/мл) и через четыре пассажа получили мутантные штаммы, в 1000 раз более устойчивые к различным фторхинолонам, чем изначальный штамм. При этом чувствительность к тетрациклину и эритромицину не изменилась. У данных штаммов были определены последовательности генов гиразы (*gyrA*, *gyrB*) и топоизомеразы IV (*parC*, *parE*), в результате мутации которых возникла устойчивость к фторхинолонам. Была обнаружена точечная мутация *gyrA*, приводящая к замене аминокислоты серина (в позиции 83 в молекуле гиразы) на изолейцин (Dessus-Babus et al., 1998). В подобных условиях Takahashi и соавторам (2000) не удалось получить устойчивость *C. trachomatis* к левофлоксацину. Авторы провели только четыре пассажа, что могло быть недостаточным для селекции устойчивых мутантов (Takahashi et al., 2000). Morrissetteley и соавторы (2002) изучали развитие устойчивости к фторхинолонам у *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* *in vitro*. Было показано, что первые 10-20 пассажей не приводили к развитию устойчивости у *C. trachomatis*, тогда как после 30 пассажей резистентность к офлоксацину и ципрофлоксацину увеличилась более чем в 256 раз. Несмотря на большое количество пассажей, авторам не удалось получить штаммы *C. pneumoniae*, устойчивые к левофлоксацину и моксифлоксацину. Штаммы, устойчивые к спарфлоксацину, плохо росли в культуре клеток McCoy (Morrissetteley et al., 2002).

Представление о том, что фторхинолоны являются наиболее токсичными из всех групп антибиотиков, являются преувеличенным. При сравнительных клинических исследованиях неблагоприятное воздействие при терапии с использованием фторхинолонов встречается не чаще, чем при лечении другими антибактериальными средствами. Фторхинолоны обладают характерным профилем нежелательных побочных эффектов. Вследствие структурных различий между отдельными представителями, выраженность побочных действий сильно отличается (Christ, et al., 1998; Stahlmann, Hoffler, 2000). В последние десятилетия по различным причинам в большинстве европейских стран был изъят ряд высокоактивных фторхинолонов: темафлоксацин (Teflox, допущен и изъят в 1992 году), грепафлоксацин (Vaxar, допущен в 1997 году, изъят в 1999 году), спарфлосацин (Zagam, допущен в 1999 году, изъят в 2001 году), тровафлоксацин (Trovan, допущен в 1998, изъят в 1999 году).

На первом месте среди нежелательных воздействий фторхинолонов находятся – как и у других антибактериальных препаратов – желудочно-кишечные расстройства: тошнота, рвота, диарея, боли в абдоминальной зоне, хотя случаи псевдомембранозного энтероколита крайне редки. Сравнительно частыми при терапевтическом применении флорхинолонов являются нарушения со стороны ЦНС: головные боли, чувство беспокойства, спутанность сознания, галлюцинации, психозы, экстрапирамидные моторные расстройства и судорожные приступы. Последние варьируют, в зависимости от антагонистической по отношению к гамма-аминомасляной кислоте, потенции фторхинолонов. Описаны судороги при лечении энноксацином, офлоксацином, ципрофлоксацином и левофлоксацином. Они могут усиливаться при одновременном приеме нестероидных противовоспалительных препаратов. Необходимо учитывать возможность аллергических реакций на коже, а также опасность анафилактического шока. Вообще, применение фторхинолонов вызывает побочные реакции от 4,4% до 20%, если учитывать все реакции (Christ, et al., 1998).

При терапевтическом применении фторхинолонов наблюдаются фототоксические реакции. Причиной фототоксичности является образование супероксидных соединений под воздействием ультрафиолетового излучения. Потенциально фототоксичными и поэтому фототоксичными являются фторхинолоны, которые в позиции 8 основной структуры имеют галогенное замещение – флероксацин, спарфлоксацин, ломефлоксацин. В эксперименте на животных при хроническом субэритемном ультрафиолетовом облучении под воздействием различных фторхинолонов удается вызвать доброкачественные опухоли кожи. Ломефлоксацин – единственный из ингибиторов гиразы – вызвал в этих экспериментах плоскоклеточный рак (Klecak et al., 1997; Makinen et al., 1997; Christ, et al., 1998; Stahlmann, Hoffler, 2000). По причине фототоксичности спарфлоксацин был изъят из обращения во многих странах, а ломефлоксацин допущен лишь в форме глазной мази для лечения бактериальных конъюнктивитов.

Потенциальным кардиогенным эффектом фторхинолонов является удлинение интервала QT и, возможно, связанное с ним опасное для жизни нарушение сердечного ритма (тахикардии или нарушения сердечного ритма Torsade de Pointes). Подобные побочные эффекты были описаны для норфлоксацина, офлоксацина, ципрофлоксацина, грепафлоксацина, спарфлоксацина, левофлоксацина, моксифлоксацина и гатифлоксацина. По этой причине было прекращено применение грепафлоксацина. По данным многолетних наблюдений, у норфлоксацина, офлоксацина, спарфлоксацина, левофлоксацина и гатифлоксацина на 10 миллионов назначений доказано более 15 случаев выраженных кардиогенных эффектов (Zhanet et al., 2002; Paladino, 2001 Stahlmann, Hoffler, 2000; Christ, et al., 1998; Stahlmann, Riecke, 2001).

Тендиниты и разрывы связок описаны, в частности, после приема офлоксацина, ципрофлоксацина и пефлоксацина. У молодых подопытных животных флорхинолоны оказывают токсическое воздействие на незрелый суставной хрящ. Поэтому были установлены противопоказания для фторхинолонов на период беременности, кормления грудью, а также для детей и подростков (Zhanet et al., 2002; Paladino, 2001 Stahlmann, Hoffler, 2000; Christ, et al., 1998; Коваленко, Виктор, 2000).

Некрозы клеток печени (вплоть до летальных исходов) явились причиной для запрещения тровафлоксацина. Повышение содержания трансаминаз наблюдалось и при терапевтическом применении других фторхинолонов (Zhanet et al., 2002; Paladino, 2001; Stahlmann, Riecke, 2001). Особо тяжелые побочные эффекты в виде системного синдрома, сопровождавшегося



гемолизом, внутрисосудистым свертыванием (коагулопатия потребления), нарушением работы печени и почек, нередко со смертельным исходом, наблюдались при терапевтическом применении темафлоксацина (так называемый темафлоксациновый синдром). Это привело, после трехмесячного присутствия на рынке, к запрещению терапевтического применения этого препарата во всем мире.

Лекарственные взаимодействия фторхинолонов относятся в первую очередь к тем медикаментам, которые содержат двух- и трехвалентные катионы ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ), например, антацидные средства. Они заметно снижают оральную резорбцию хинолонов (на 30-90%). Сульфат также ухудшает резорбцию фторхинолонов. Прием оральных фторхинолонов должен происходить за 2 часа до или через 4-6 часов после применения антацидов. Норфлоксацин, энноксацин, ципрофлоксацин тормозят метаболизм других лекарств посредством воздействия на цитохром P-450. Описаны повышенные концентрации в плазме теофиллина и кофеина при совместном приеме с фторхинолонами. Стали известны клинически значимые взаимодействия при одновременном применении варфарина и норфлоксацина, энноксацина, офлоксацина или ципрофлоксацина, выражавшиеся в форме геморрагических осложнений. Механизм их остался невыясненным. Как и для других антибиотиков, для фторхинолонов следует учитывать снижение эффективности оральных контрацептивов. Для некоторых из фторхинолонов описано клинически значимое взаимодействие с нестероидными противовоспалительными препаратами, глибенкламидом, рифампицином, диазепамом, а также циметидином (Paladino, 2001; Jetter, Fuhr, 2001).

У 10-15% больных хламидиозом макролиды (как и тетрациклины) не оказывают выраженного клинического и микробиологического действия. В таких случаях назначают фторхинолоны. При исследованиях *in vitro* различные кинолоны проявляли разную активность против *C. trachomatis* (табл. 13.10). Так, налидиксиновая кислота, розоксацин, норфлоксацин и энноксацин оказались мало активными в отношении хламидий (Heessen, Muytjens, 1984; Ridgway et al., 1984). В сравнительных исследованиях *in vitro* офлоксацин проявлял наибольшую антихламидийную активность. Наблюдалась также высокая активность ципрофлоксацина *in vitro* (Hart et al., 1984; Anzar et al., 1985; Schachter, Moncada, 1987). Флероксацин (R0-23-6240) был менее активен в отношении хламидий *in vitro*. То же можно сказать о NY-198 и перфлоксацине. Антихламидийная активность этих препаратов сравнима с таковой у клиндамицина. Фторхинолоны T-3262, темафлоксацин, AT-4140 также проявляли высокую антихламидийную активность (Maeda et al., 1988). Ряд клинических исследований показал неэффективность одноразовых схем лечения фторхинолонами при хламидиозе (в отличие от гонорей). В работе Loo и соавторов (1985) при клиническом испытании ципрофлоксацина ни один из 14 мужчин со смешанной гонорейно-хламидийной инфекцией не избавился от хламидий при однократном приеме 500 мг препарата внутрь. Как показывают исследования, для излечения хламидийной инфекции необходим курс лечения не менее 10 дней (Toomey, Barnes, 1990).

Мавров (2001) изучил эффективность ципрофлоксацина (ципринол, ципротад) у 87 больных осложненным урогенитальным хламидиозом. В этой подгруппе больных у мужчин был уретропростатит, у женщин – аднексит. Лечение хронического, осложненного хламидиоза проводилось комплексно. В качестве этиотропных средств использовались вначале ципрофлоксацин в инфузионной форме: в дозе 300-400 мг два раза в день, в течение 10-14 суток. С целью коррекции иммунного статуса и улучшения проникновения антибиотика в зону воспаления назначали иммуномодуляторы (тимоген, левамизол), индукторы интерферона (циклоферон, неовир).

Пациенты также получали физиотерапию (лазер, АУФОК, магнитотерапию, СМВ-терапию, фонофорез). По показаниям назначались противогрибковые препараты и зубиотики. Несмотря на высокие дозы, препарат относительно хорошо переносился. У 4 пациентов из 87 (4,6%) отмечались побочные явления в виде тошноты, болей в желудке, мышечной скованности, головной боли, нарушений сна (Мавров, 2001).

Офлоксацин *in vitro* более активен против *C. trachomatis*, чем цiproфлоксацин. Однако цiproфлоксацин лучше проникает в очаг хронического воспаления, поскольку он накапливается в фибробластах. (Yang et al., 2002). Офлоксацин (офлотад) и цiproфлоксацин (ципротад) являются эффективным средством лечения хламидийных уретритов, цервицитов (Blomer et al., 1988; Hooton et al., 1992). В США офлоксацин (300 мг два раза в день) и левофлоксацин (500 мг 1 раз в день) рекомендованы для лечения неосложненной генитальной хламидийной инфекции (CDC, 2002). В Великобритании рекомендованная суточная доза офлоксацина составляет 400 мг (Ridgway, 1997; 2000). Левофлоксацин также рекомендован для лечения респираторной инфекции, вызванной *C. pneumoniae* (Hammerschlag, Roblin, 2000).

Bowie и Willets (1989) применили флорексацин для лечения хламидийной инфекции. Процент неудач оказался высоким (25-57%). Это объяснялось отказом от лечения в связи с побочными реакциями на препарат. Ноорер и Wolfson (1989) указывали на факторы токсичности и переносимости, которые ограничивали применение фторхинолонов для лечения больных урогенитальным хламидиозом, поскольку в этом случае необходим длительный курс лечения максимальными суточными дозами. Светачев и Юрасов (2002) назначили спарфлоксацин 52 пациенткам с восходящим воспалительным процессом мочеполовых органов (сальпингит, сальпингоофорит) – спарфлоксацин (спарфло) 1-й день 400 мг, со 2-го по 14-й день 200 мг в сутки; метронидазол по 0,25 г 3 раза в день (10 дней); кларитромицин по 250 мг 2 раза в день (14 дней). Результаты лечения оценивали через 1 месяц после его завершения. Проведенное исследование показало более высокую эффективность терапии спарфлоксацином, по сравнению с терапией офлоксацином, в составе комплексной терапии урогенитальной хламидийной и смешанной инфекций, что позволило авторам рекомендовать данный препарат в практике гинекологов и венерологов, наряду с применением макролидов и метронидазола для лечения восходящей генитальной инфекции (Светачев, Юрасов, 2002).

Левофлоксацин (Tavanic) – (S)-(2)-офлоксацин – является одним из наиболее активных фторхинолонов по отношению к *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydophila pneumoniae*, а также против *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma urealyticum* (Davis, Bryson, 1994; Kamiya et al., 1992; Lode et al., 1987; Joan C. et al., 2000). Левофлоксацин впервые был синтезирован в 1983 году (Daiichi Pharmaceutical Co.) и применяется в клинической практике с начала 1990-х годов. Интерес к этому препарату в настоящее время возрос в связи с повышением роли устойчивых микроорганизмов в возникновении урогенитального хламидиоза. После приема внутрь, левофлоксацин всасывается быстро и хорошо (биоусвояемость около 70-80%), преимущественно из двенадцатиперстной кишки и верхнего отдела тонкого кишечника, через 60-90 минут достигает максимальных концентраций в сыворотке крови. Объем распределения левофлоксацина составляет в спокойном состоянии 2-3 л/кг. Так как с белками плазмы левофлоксацин связывается незначительно (20-30%), а вещество находится в плазме крови преимущественно в неионизированной форме, почти вся введенная доза может свободно диффундировать в экстравазальное пространство. Таким образом, концентрации в определенных жидкостях организма и тканях могут заметно превышать соответствующий уровень в сыворотке.

Профиль безопасности левофлоксацина относительно благоприятен по сравнению с другими фторхинолонами. File и соавторы (1997) изучили результаты лечения 590 больных левофлоксацином: 500 мг в день внутривенно или внутрь, от 7 до 14 дней. Побочные эффекты наблюдались у 5,8% больных. Тошнота наблюдалась у 1,7%, диарея – у 1,4% больных. У остальных – неврологические проявления – тремор, головокружение, расстройство речи. Тринадцать пациентов из 590 (2,2%) вынуждены были прервать лечение в срок до пяти суток терапии (File et al., 1997).

Моксифлоксацин (Avelox) — представитель IV поколения фторхинолонов. Циклопропиловая группа в положении 1 обеспечивает активность против грамотрицательных микроорганизмов (рис. 13.12). Присоединение дополнительного кольца в позиции 7 придает высокую активность по отношению к грамположительной микрофлоре, включая пневмококки. Добавление в структуру молекулы метоксигруппы в положении 8 привело к повышению активности в отношении анаэробов без увеличения риска потенциальной фототоксичности (Appelbaum, Hunter, 2000, Кречинов, 2002; Яковлев, Яковлева, 2002). В отношении *S. trachomatis* моксифлоксацин превосходит не только эритромицин, азитромицин, доксициклин и цiproфлоксацин, но и офлоксацин. Он является перспективным для лечения урогенитальных хламидийно-микоплазменных инфекций. По активности против *S. pneumoniae* моксифлоксацин находится на одном уровне с левофлоксацином и более активен по сравнению с цiproфлоксацином. По активности против *M. hominis* моксифлоксацин значительно превосходит доксициклин, кларитромицин, левофлоксацин и цiproфлоксацин. По действию на *Ureaplasma urealyticum* моксифлоксацин незначительно уступает кларитромицину и проявляет высокую активность как в отношении чувствительных (МПК90 – 0,25 мг/л), так и резистентных к доксициклину штаммов (МПК90 – 0,5 мг/л). В лечении уреаплазмоза моксифлоксацин активнее доксициклина, эритромицина, цiproфлоксацина и левофлоксацина (Страчунский, Кречинов, 2002; Яковлев, Яковлева, 2002), (табл. 13.10).

Благодаря широкому спектру активности моксифлоксацина, включающему большинство возбудителей урологических и гинекологических инфекций, он может быть хорошей альтернативой традиционным 2–3-компонентным схемам лечения. При терапии неосложненных воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин моксифлоксацин (400 мг 1 раз в сутки, 14 дней) был сравним по клинической эффективности (96,6 и 98,0%) с комбинацией цiproфлоксацина (500 мг однократно), доксициклина (100 мг 2 раза в сутки) и метронидазола (500 мг 3 раза в сутки) в течение 14 дней. Бактериологическая эффективность моксифлоксацина была выше, чем в группе сравнения (92,5% и 88,2% соответственно (Heystek et al., 1999)). Иванов и соавторы (2002) изучали эффективность моксифлоксацина (авелокса) при лечении урогенитального хламидиоза и уреаплазмоза у 50 пациентов (26 женщин и 24 мужчины). Из них у 31 был диагностирован хламидиоз, у 15 – уреаплазмоз, у 4 – смешанная инфекция. Все пациенты получали моксифлоксацин по 400 мг 1 раз в сутки после еды (10 дней). Переносимость препарата была хорошей. У 1 больного возникли транзиторные диспепсические расстройства, не потребовавшие отмены препарата. К концу лечения (на 10-й день) у всех из них отсутствовали субъективные ощущения и регрессировали объективные признаки воспаления. Контрольные лабораторные исследования, проведенные в среднем через 21 день после окончания лечения, показали эффективность моксифлоксацина у 48 (96%) больных (Иванов и соавт., 2002).

Таблица 13.10

Активность фторхинолонов в отношении хламидий и генитальных микоплазм  
(Fung-Tomc et al., 2000; Takahata et al., 2001)

Микроорганизм	Фторхинолон	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) мг/л		
		Диапазон	МИК <sub>50</sub>	МИК <sub>90</sub>
<i>Chlamydia trachomatis</i>	BMS 287456	<0,004–0,016	0,008	0,016
	Моксифлоксацин	0,03–0,06	0,03	0,06
	Левифлоксацин	0,025–0,5	0,25	0,5
	Офлоксацин	1–2	1	2
	Ципрофлоксацин	0,25–2	1	2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	BMS287456	<0,004–0,008	0,008	
	Моксифлоксацин	0,06–0,12	0,06	
	Левифлоксацин	0,5	0,5	
	Офлоксацин	0,5–1	1	
	Ципрофлоксацин	0,5	0,5	
<i>Mycoplasma hominis</i>	BMS 287456	0,008–0,25	0,03	0,03
	Тровафлоксацин	0,016–0,12	0,03	0,06
	Моксифлоксацин	0,03–0,12	0,06	0,12
	Левифлоксацин	0,25–4	1	2
	Офлоксацин	0,5–8	2	8
	Ципрофлоксацин	0,5–4	1	2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	BMS 287456	0,12–1	0,12	0,25
	Тровафлоксацин	0,12–0,5	0,5	0,5
	Моксифлоксацин	0,25–1	0,5	1
	Левифлоксацин	0,5–4	1	4
	Офлоксацин	2–4	4	4
	Ципрофлоксацин	4–16	8	8

По данным метаанализа 26 клинических исследований, включавших 6178 пациентов, которые принимали моксифлоксацин (400 мг), частота нежелательных реакций составила 26% и была сравнимой (23%) с препаратами выбора при лечении этих заболеваний. Наиболее частыми нежелательными реакциями были тошнота и диарея (14%), а также головокружение (3%). (Kubin, Reiter, 2000). В клинических исследованиях частота нежелательных реакций при приеме моксифлоксацина была аналогична частоте при приеме препаратов сравнения – кларитромицина, амоксициллина. По данным Burke и соавт. (1999), при приеме моксифлоксацина частота возникновения приступов тошноты была статистически значимо выше, чем при приеме цефуроксим ацетил (11 и 4% соответственно,  $P=0,003$ ). Метаанализ 20 клинических исследований показал, что у 1,2% пациентов, принимавших моксифлоксацин, изменялись лабораторные показатели функций печени. Сходные результаты получены в группах сравнения (1,2–1,8%) (Springsklee et al., 1999) В исследованиях *in vitro* на животных и на человеке моксифлоксацин не вызывал фототоксических реакций (Man et al., 1999; Страчунский, Кречинов, 2002; Яковлев, Яковлева, 2002). Это особенно очевидно при сравнении моксифлоксацина с ломефлоксацином, при применении которого значительно (в 3–4 раза) повышается чувствительность кожи к световому излучению. По результатам метаанализа, у 6178 пациентов, принимавших моксифлоксацин, не было отмечено реакций фототоксичности (Springsklee et al., 1999).



Как показал метаанализ 2650 пациентов, принимавших моксифлоксацин по 400 мг, удлинение интервала QT наблюдалось у 2,8%, что сходно с препаратами сравнения (2,2%) и ниже, чем при использовании кларитромицина (3,7%). Из более чем 1,2 миллиона человек, принимавших моксифлоксацин, только у 22 пациентов были отмечены клинически значимые изменения функции сердечно-сосудистой системы, 15 из которых были оценены как тяжелые (Springsklee et al., 1999). Отмечен случай тахикардии (120 ударов в минуту), продолжавшейся 45 мин после приема 400 мг моксифлоксацина (Siermann, Kirch, 2001). Одновременный прием моксифлоксацина и препаратов, удлиняющих интервал QT, не приводил к дополнительному его удлинению (Hollister et al., 2000).

Таким образом, в последние 10 лет фторхинолоны прочно вошли в практику как средства лечения хамидиоза. Схемы применения фторхинолонов при лечении хламидийной инфекции показаны в табл. 13.11.

Таблица 13.11

#### Дозы фторхинолонов при лечении хламидийной инфекции

Фторхинолоны	Суточные дозы	Курс лечения	Примечание
Ципрофлоксацин, Офлоксацин, Пефлоксацин	0,3–0,8 г	10–15 дней	При тяжелых осложненных инфекциях лучше вводить внутривенно
Моксифлоксацин, Гатифлоксацин, Спарфлоксацин	0,4 г		
Левифлоксацин	0,5 г		

#### 13.1.4. Антибактериальные препараты других групп

Большинство сульфаниламидов оказались активными в отношении урогенитальных штаммов хламидий *in vitro*, но лишь немногие из них применялись для лечения хламидийной инфекции, поскольку они оказывали действие в больших дозах и при длительном применении. Так, сульфизоксазол и сульфаметоксазол в дозах 0,5 г четыре раза в день в течение 10 дней излечивали хламидийный уретрит и цервицит (Johannisson et al., 1980). Пятидневные курсы сульфаметоксазола в комбинации с триметопримом при лечении смешанной гонококково-хламидийной инфекции излечивали гонорею, но не хламидийную инфекцию (Csango et al., 1984). Триметоприм, который часто использовался в комбинации с сульфаниламидами, проявлял слабую антихламидийную активность *in vitro* (Hammerschlag, 1982; Nielsen et al., 1984).

Бензилпенициллин и производные пенициллина лишь временно подавляют активность хламидий, реактивация которых после прекращения пенициллинотерапии является частой причиной возникновения «персистентной» инфекции. Поэтому они не применяются для лечения хламидийных инфекций. Исключение составляет лечение беременных при непереносимости макролидов, когда рекомендован прием амоксициллина по 500 мг три-четыре раза в день в течение 10 дней (Alary et al., 1994; CDC, 2002).

В качестве альтернативы в случаях, когда нет возможности применить тетрациклины, макролиды или фторхинолоны, допустимо применение рифампицина в дозе 0,9-1,2 г на протяжении 3-5 недель. Однако широкое применение этого препарата в случаях, не связанных с инфекциями, вызванными микобактериями, не рекомендуется ВОЗ из-за опасности развития устойчивых форм туберкулеза. Клиндамицин, который относится к линкозамидам, также действует на хламидии при применении в больших дозах – 0,6 г каждые 8 часов в течение 10-14 дней.

При лечении хламидиоза могут быть неудачи, когда клинические проявления сохраняются, несмотря на санацию организма от хламидий. Одной из причин может быть персистенция условнопатогенных бактерий, поддерживающих воспалительный процесс. Это *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Gardnerella*. Многие из этих микроорганизмов проявляют устойчивость к противохламидийным антибиотикам – тетрацикламам, макролидам, фторхинолонам. Особенностью урогенитальной хламидийной инфекции у женщин является сочетанный характер инфицирования с другими возбудителями инфекций, передаваемых половым путем, а также участие в инфекционном процессе бактерий из состава нормальной микрофлоры (Никитенко, 2002). У женщин с хроническим генитальным хламидиозом сопутствующий микробный пейзаж слизистой влагалища сформирован монокультурами и ассоциациями с преобладанием *E. faecalis*, а также *E. coli* и дрожжеподобных грибов, изолированных преимущественно из 2-компонентных ассоциаций (Абрамченко и соавт., 2001; Савицкая и соавт., 2003). Поэтому перед началом противохламидийного лечения у хронических, длительно болеющих пациентов, рекомендовано назначать метронидазол внутривенно по 500 мг или внутрь по 400-500 мг 3 раза в день в течение 5-7 дней одновременно с местным или системным применением антифунгальных препаратов – флуконазол, итраконазол, тербинафин (Мавров, и соавт.2001).

## 13.2. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Эффективность лечебных мероприятий увеличивается, если в системе комплексного лечения больных урогенитальными хламидиозами, помимо специфических препаратов, действие которых направлено на возбудителя инфекции, применяют патогенетические и симптоматические средства. При мочеполовом хламидиозе применяется патогенетическая и симптоматическая терапия, а также местное лечение. Выбор способов лечения определяется:

- наличием осложнений;
- локализацией воспалительного процесса, характером патологических изменений;
- общим состоянием организма.

Терапия включает также коррекцию нарушений иммунной системы, физиотерапевтическое лечение, борьбу с сопутствующими заболеваниями, застойными явлениями в тазовых органах, диету и фармакологическую защиту печени.

### 13.2.1. Иммунотерапия

Хламидийные инфекции характеризуются тем, что, с одной стороны, возбудитель является внутриклеточной бактерией с «атипичными» свойствами, способной вызвать иммунопатологию

ческие нарушения, а с другой – инфекция протекает на фоне снижения иммунологической реактивности населения. Если исходить из современного представления о патогенезе хламидиоза, как инфекции с хроническим течением и склонностью к персистенции, то становится понятной необходимость иммунотропного лечения, как важного и во многих случаях необходимого компонента комплексной терапии. В большинстве случаев антибиотик подавляет размножение хламидий, но конечная их элиминация из организма является результатом деятельности факторов иммунитета. Вот почему на фоне подавленной иммунореактивности действие этиотропных препаратов может быть недостаточно эффективным. Очевидно, что оптимальный клинический эффект достигается только при наличии синергизма в действии защитных сил организма и антимикробных лекарственных средств (Хайтов, Пинегин, 2000; 2001; Гомберг и соавт., 2000).

В 1980-х годах, когда только была осознана роль хламидий в этиологии воспалительных заболеваний половых органов, ряд отечественных авторов стали уделять большое внимание изучению средств патогенетической терапии в лечении хламидийной инфекции. На основании того, что при хламидиозе происходят иммунологические сдвиги, которые характеризуются, с одной стороны, «инфекционной аллергией», а с другой – угнетением Т-системы иммунитета, в комплексе лечебных мероприятий предлагалась иммуномодулирующая терапия – левамизол, метилурацил, пентоксил, оротат калия (Ильин, 1990; Мавров, 1994). Иванюта (1990) и Пшеничникова (1991) при лечении воспалительных заболеваний половых органов у женщин рекомендовали пирогенные препараты микробного происхождения – пирогенал и продигозан. Эти препараты обладают свойствами поликлонально активировать иммунную систему, усиливают регенеративные процессы (Ермольева, Вайсберг, 1974). Мешков (1986), на основании клинических и ультраструктурных данных, обосновывал применение при урогенитальных хламидиозах диуцифона 0,2 г/сут циклами по 5 дней совместно с применением эрициклина. Тогда же в венерологии стали шире применять полипептиды тимуса животных – тималин, тимоген, тактивин. Эти препараты регулируют количество Т- и В-лимфоцитов, усиливают фагоцитоз и процессы регенерации в тканях (Морозов, Хавинсон, 1978; 1981).

В настоящее время интерес врачей к иммунотропным препаратам возрос. Появилось большое количество лекарственных средств и пищевых добавок, воздействующих на иммунитет. Практикующему врачу трудно разобраться в потоке информации и выбрать нужное средство. Издается множество «методических рекомендаций», часто не прошедших процедуру научного рецензирования, обсуждения и утверждения, носящих порой откровенно рекламный характер, когда предлагается то или иное иммунотропное средство для лечения хламидиоза (хорошо, если в комплексе с антибиотиками).

Чтобы иммуномодулятор (иммуностимулятор) мог быть отнесен к группе средств, обязательных для лечения хламидиоза, должна быть доказана его способность улучшать показатели клинической и микробиологической излеченности в комплексе с адекватной антибактериальной терапией. Для этого необходимо проведение испытаний в соответствии с принципами доказательной медицины (двойного слепого рандомизированного исследования). Поскольку данных о таких испытаниях в литературе, посвященной лечению хламидиоза, практически нет, то некоторые иммунотропные препараты могут быть лишь рекомендованы на основании уже доказанных их свойств и известных фактов об иммунных механизмах защиты от инфекции и об иммунологических нарушениях при хламидиозе.

По характеру действия иммуотропные препараты подразделяются на 3 группы (Хаитов, Пинегин, 2000): иммуномодуляторы – средства, которые восстанавливают нарушенные функции иммунной системы; иммуностимуляторы – средства, усиливающие иммунный ответ, стимулирующие иммунные процессы; иммунодепрессанты – это средства, подавляющие иммунный ответ. Иммуномодулирующие препараты можно условно разделить по направленности действия на моноциты/макрофаги, В- и Т-клетки и NK-клетки. Интерфероны (а значит и их индукторы) и ликопид действуют преимущественно на макрофагальное звено иммунитета. Тактивин и иммунофан – на Т-клетки, миелопид – как на В-клетки, так и на Т-клетки, а полиоксидоний одновременно стимулирует функции полиморфоядерных нейтрофилов, макрофагов и NK-клеток. Мишенями для препаратов микробного происхождения (продигиозан, пирогенал, рибомунил) служат фагоциты – нейтрофилы и макрофаги.

При заражении хламидиозом первой клеткой, которая вступает в борьбу с возбудителем, является тканевый макрофаг. Он поглощает и переваривает хламидии, представляя их антигенные пептиды Т- и В-клеткам и инициируя тем самым развитие клеточного и гуморального ответа. При этом макрофаг выделяет цитокины, которые активируют факторы неспецифической резистентности – нейтрофилы, моноциты/макрофаги, NK-клетки, а также действуют на Т- и В-лимфоциты, включая специфический иммунный ответ. Таким образом, макрофаги и другие антигенпредставляющие клетки первыми инициируют развитие неспецифической резистентности и специфического иммунитета при хламидиозе. Активация макрофагов ведет к усилению синтеза многих цитокинов и включению как клеточного, так и гуморального иммунитета. Основной мишенью действия иммунофана являются Т-лимфоциты. Этот иммуномодулятор активирует пролиферацию и дифференцировку Т-клеток путем усиления продукции ИЛ-2 и его рецепции чувствительными клетками. Кроме того, иммунофан оказывает иммуномодулирующее влияние на синтез ФНО $\alpha$ . Как ИЛ-2, так и ФНО $\alpha$  оказывают множественное действие на различные компоненты иммунной системы, включая клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Иммуномодулятор миелопид обладает множественной направленностью действия. Этот препарат состоит из миелопептидов. Компонент миелопептид-1 действует преимущественно на Т-клетки, миелопептид-3 – на макрофаги, усиливая их цитотоксичность, экспрессию антигенов HLA-DR и способность представлять антигенные пептиды (Хаитов, Пинегин, 2000).

Иммуномодулятор может оказывать избирательное действие на соответствующий компонент иммунитета, но конечный эффект его влияния на иммунную систему всегда будет многогранным. Это связано с тем, что действие на иммунную систему как специфических, так и неспецифических стимулов, осуществляется через цитокины, которые оказывают множественное влияние на иммунную систему. В настоящее время не выявлено цитокинов со строго специфическим действием. Таким образом, особенности функционирования иммунной системы делают практически невозможным существование «идеального иммуномодулятора» со строго селективным действием на иммунитет. Следовательно, любой иммуномодулятор, влияющий на фагоцитоз, гуморальный или клеточный иммунитет, будет оказывать действие и на все другие компоненты иммунной системы. Поэтому при назначении иммунотерапии при хроническом хламидиозе нет абсолютных показаний для развернутой иммунограммы (при отсутствии указаний на наличие иммунодефицитов иного генеза). Существует мнение, что в случаях хронического хламидиоза при вторичной иммунологической недостаточности, следует применять иммуномодулирующую терапию вне зависимости от того, выявлены или не выявлены изменения в иммунном статусе у данного больного (Гомберг и соавт, 2000).



При лечении хламидийной инфекции приходится сталкиваться со многими проблемами. Это высокая частота рецидивов (30%), наличие резистентных форм хламидий к существующим препаратам, особенности состояния иммунитета больных и необходимость применения высоких доз антибиотиков (Мавров, 2001; Мавров и соавт., 2001). При хронической хламидийной инфекции значительно изменяется иммунитет. Во многих исследованиях было показано, что при данной инфекции иммунная система функционирует неадекватно, ответ формируется поздно, над защитными реакциями преобладают иммунопатологические. При лечении хламидиоза иммуномодуляторы применяются обязательно в комплексе с антибиотиками. Антихламидийные препараты следует назначать не после и не перед приемом антибиотиков, а одновременно с ними. В этом случае по возбудителю наносится двойной удар: антибиотик понижает метаболическую активность хламидий, а иммуномодулятор повышает функциональную активность фагоцитарных клеток, за счет чего достигается элиминация. Не следует преувеличивать негативного влияния антибиотиков на иммунную систему. Имеется ряд антибиотиков, оказывающих не ингибирующее, а стимулирующее действие на иммунитет. Прежде всего, это относится к макролидам. При прочих равных условиях при лечении хламидиоза следует отдавать предпочтение последним.

Для активации противохламидийного иммунитета лучше применять иммуномодуляторы, воздействующие на клетки моноцитарно-макрофагальной системы. Элиминация хламидий из макроорганизма осуществляется в конечном счете с помощью клеток фагоцитарной системы. Поэтому препаратами выбора при лечении хронических хламидийных инфекций могут являться индукторы интерферонов и полиоксидония, воздействующие на макрофаги. Таким образом, общие принципы применения иммуномодуляторов у больных с хроническим хламидиозом таковы:

- Иммуномодуляторы назначают в комплексной терапии одновременно с антибиотиками.
- Иммуномодуляторы, действующие на фагоцитарное звено иммунитета, можно назначать больным как с выявленными, так и с невыявленными нарушениями иммунного статуса. Основанием для назначения препарата является хронический, упорный характер течения хламидиоза.
- При наличии соответствующей материально-технической базы иммуномодуляторы целесообразно (но не обязательно) применять на фоне иммунологического мониторинга.

Интерфероны обладают способностью ингибировать внутриклеточное размножение хламидий. Хотя доказана антихламидийная активность  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -интерферонов, на практике используются  $\alpha$ - и  $\beta$ -интерфероны. Пока существует только одна лекарственная форма на основе  $\gamma$ -интерферона – имукин. К группе аналогов  $\gamma$ -интерферона относятся интрон А, лаферон, роферон, ребиф. Принимая участие в иммунных реакциях организма, интерфероны стимулируют неспецифическую цитотоксичность иммуноцитов и, кроме того, вызывают экспрессию молекул HLA в тех популяциях клеток, которые обычно не экспрессируют эти антигены. В свою очередь это может явиться причиной усугубления аутоиммунного ответа организма. При использовании индукторов интерферона такой опасности нет, поскольку синтез интерферонов контролируется механизмами, обеспечивающими защиту организма от избытка интерферона.

Препараты, вызывающие образование эндогенного интерферона, получили название индукторы интерферона. Среди многих известных индукторов интерферона в медицинской

практике применяются индукторы полинуклеотидной природы – ларифан (РНК фага f2) и ридостин (РНК дрожжей *S. cerevisiae*); амплиген-модифицированная форма poly(A)-poly(U) – полудан; природный полифенол – мегасин (производное госсипола); низкомолекулярные синтетические индукторы – арбидол (производное индола), тилорон (производное флуоренона), неовир (производное акридина) (Андронати и соавт., 1999). Наиболее широкое применение нашли тилорон (амиксин), изопринозин (гропринозин), производные акридонуксусной кислоты (неовир, циклоферон). При использовании индукторов синтезируется собственный интерферон, который, в отличие от вводимых интерферонов, не обладает антигенными свойствами. Однократное введение индукторов обеспечивает относительно длительную циркуляцию интерферона на терапевтическом уровне.

Тилорон – дигидрохлорид 2,7-бис[2-(диэтиламино)этокси]флуоренон-9 – пероральный синтетический индуктор эндогенного  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -интерферона, продуцируемого иммунокомпетентными клетками (Kruger, Jochimura, 1970; Богатский и соавт. 1976) (рис. 13.14).

Тилорон впервые был синтезирован в США. Экспериментальные данные о противовирусном и интерферониндуцирующем действии тилорона, его активности в отношении ряда онковирусов стимулировали исследования свойств этого иммуномодулятора (Kruger, Jochimura, 1970). Испытания тилорона за рубежом принесли противоречивые результаты, поэтому интерес к нему как противоопухолевому препарату снизился (Regelson, 1976). В середине 70-х годов тилорон был синтезирован и изучен в Украине (Богатский и соавт. 1976). Была установлена его мощная иммуномодулирующая активность. По данным некоторых авторов, тилорон обладает способностью включать синтез интерферонов в определенных популяциях клеток и органов, что в ряде случаев дает преимущества перед поликлональной стимуляцией иммуноцитов экзогенными интерферонами. Максимальные уровни интерферона зарегистрированы в кишечнике и печени. В легких и почках уровень синтеза интерферона остается низким. Тилорон индуцирует синтез интерферона в лейкоцитах человека. Он не индуцирует синтез интерферона в культурах фибробластов и В-клеток. Основными продуцентами интерферона в ответ на введение тилорона являются клетки эпителия кишечника, гепатоциты, Т-лимфоциты и гранулоциты. Характерной особенностью противовоспалительного действия тилорона является отсутствие влияния на простагландин-синтезную активность (Андронати, 1999).

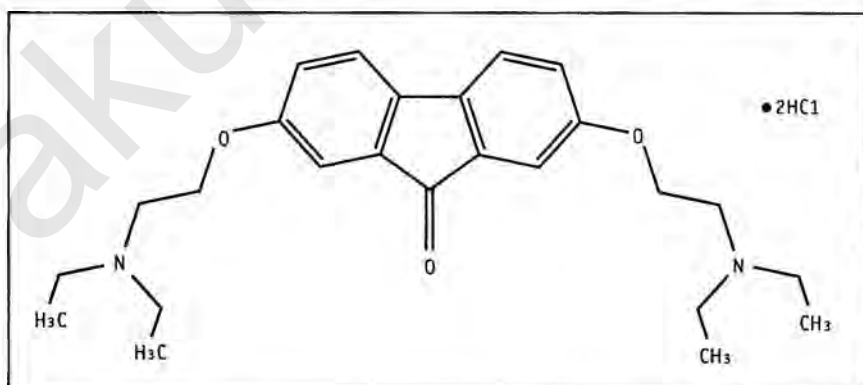


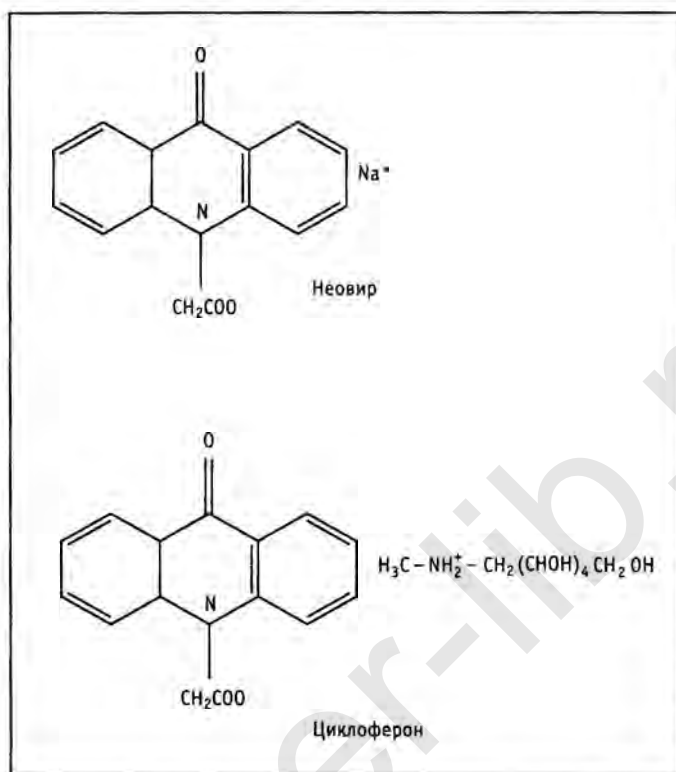
Рисунок 13.14. Структурная формула тилорона – дигидрохлорид 2,7-бис [2-(диэтиламино) этокси] флуоренон-9. Эффективность связана с наличием в молекуле планарной трициклической структуры (Богатский и соавт. 1976)

Тилорон ингибирует лизосомальные ферменты, ответственные за расщепление гликозаминогликанов и увеличивает активность протеинкиназы в клетках. Он является ингибитором обратной транскриптазы, что обуславливает противовирусный эффект. Показано усиление перекисного окисления липидов в тимоцитах под влиянием тилорона и снижение такового в спленоцитах, макрофагах и гепатоцитах. Показано, что тилорон снижает содержание цитохрома P-450 и ингибирует активность монооксигеназ печени (Богатский, 1981; Галкин, 1990). Одним из возможных механизмов разнообразного биологического действия тилорона является его взаимодействие с нуклеиновыми кислотами и нуклеазами. Доказана возможность интеркаляции тилорона в ДНК и в олигонуклеотиды. Показано, что максимальным аффинитетом тилорон и его аналоги обладают к альтернативным последовательностям (прежде всего к А-Т). Значительную роль в связывании играют взаимодействия протонированных аминных фрагментов с фосфатными группировками (Sturm et al., 1981). Показано, что под влиянием тилорона улучшалось течение воспалительного процесса, активировались макрофаги, увеличивалось количество противовоспалительных цитокинов, повышалась секреция лизосомных ферментов. В экспериментах *in vitro* тилорон ингибировал ферменты, субстратом которых служила ДНК: ДНК-полимеразу, топоизомеразу, обратную транскриптазу. Высказано предположение о том, что препарат может индуцировать пролиферацию цитолитических лимфоцитов так же, как IL-2. (Algarra et al., 1993; Bispinck et al., 1998; Ma et al., 1995; Chung et al., 2000; Андронати, 2003).

Для медицинского применения тилорон выпускается в виде таблеток «амиксин» по 0,125 г. При хронических воспалительных процессах хламидийной этиологии ряд авторов рекомендуют назначать одновременно с антибактериальной терапией по 0,25 г/сутки в течение 2 суток, затем по 0,125 г ч/з 48 часов в течение 4 недель (Антонова и соавт., 1996; Малашенкова и соавт., 1996, 1998; Баткаев и соавт., 1998, 2000; Бочкарев, Сергеев, 2000; Галян, 2002; Ковалева, 2001; Запорожан и соавт., 2003; Андронати, 2003).

Циклоферон и неовир являются производными акридонуксусной кислоты (10-карбоксиметил-9-акриданон). В данных веществах сочетаются высокая липофильность, обусловленная плоским гетероароматическим кольцом и гидрофильность за счет кольцевой кетогруппы и карбоксильного остатка. Такое своеобразное химическое строение позволяет предположить наличие высокой биологической активности, обусловленной как легким проникновением в органы и ткани и возможным влиянием на рецепторный аппарат клетки, так и участием в метаболических реакциях в организме (Аспель, и соавт., 2001). Наиболее известны в настоящее время и широко применяются в клинической практике соли незамещенной акридонуксусной кислоты с органическими и неорганическими основаниями: натриевая соль – неовир, а также N-метилглюкаминная соль – циклоферон (рис. 13.15). После проникновения через биологические мембраны эти соединения гидролизуются до свободной акридонуксусной кислоты.

Циклоферон быстро проникает в кровь, практически не связывается с белками, широко распространяется в органах и тканях, в биологических жидкостях организма, 99% введенного препарата элиминируется почками в неизменном виде в течение 24 часов. Препарат выпускается по 250 мг в виде 12,5% раствора в ампулах по 2 мл или по 250 мг лиофилизированного порошка во флаконах. Стандартная методика введения циклоферона: 2 мл (250 мг) – один раз в сутки внутримышечно на 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 19-й день курса лечения. В острый период – одна инъекция внутривенно (4 мл, 500 мг), далее по той



**Рисунок 13.15.** Соли незамещенной акридонуксусной кислоты, применяемые в клинической практике в качестве индукторов эндогенного интерферона: натриевая соль (неовир), N-метилглюкаминная соль (циклоферон). После проникновения через биологические мембраны эти соединения гидролизуются до свободной акридонуксусной кислоты.

же схеме внутримышечно или внутривенно (2-4 мл, 250-500 мг). Для закрепления эффекта возможно повторение курса лечения, особенно при хронических процессах. Выпускаются также линимент циклоферона – жидкая мазь, содержащая 5% N-(дезоксиглюцитол-1-ил) N-метиламмоний 10-метил-карбоксилат акридон с 1% антисептика катапола и 1,2 пропиленгликоль в качестве основы до 100%. Существует пероральная форма циклоферона (таблетки по 250 мг). Циклоферон обладает низкой токсичностью, не отмечено побочного действия, мутагенного, тератогенного, эмбриотоксического, канцерогенного эффекта. Противопоказаниями к назначению циклоферона являются беременность, декомпенсированный цирроз печени, проявление непереносимости препарата (Исаков и соавт., 1997; Аспель и соавт., 2001; Федотов и соавт., 2001; Рыбалкин и соавт., 2001).

Неовир при урогенитальном хламидиозе вводился парентерально по 2 мл каждые 48 часов, всего 5-7 инъекций. Ряд авторов отмечают улучшение показателей излеченности хламидиоза и хорошую переносимость препарата (Делекторский, Малиновская, 2001; Делекторский и соавт., 2001; Сергеев, Сергеев, 2001; Иванов и соавт., 2001).

Полиоксидоний – сополимер N окси 1,4 – этиленпиперазина и (N – карбоксиэтил) 1,4 этиленпиперазиний бромида. Полиоксидоний является истинным иммуномодулятором.

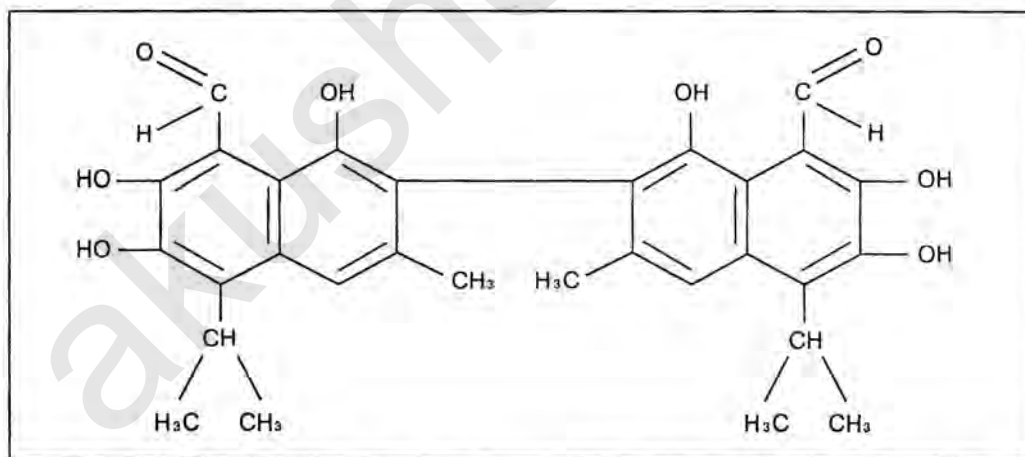


Препарат обладает иммуностимулирующим и детоксицирующим действием, увеличивает иммунную резистентность организма в отношении локальных и генерализованных инфекций. При взаимодействии с моноцитами периферической крови человека, полиоксидоний активирует синтез ФНО $\alpha$  только у лиц с исходно низкими или средними уровнями его продукции. У лиц с исходно высокими уровнями ФНО $\alpha$  он не влияет на продукцию этого цитокина. Такие свойства полиоксидония исключают минимальную возможность гиперактивации иммунной системы, что служит важным условием применения иммуотропного препарата при инфекциях с возможными аутоиммунными реакциями. Наряду с иммуностимулирующим действием, полиоксидоний обладает также выраженной анти-токсической активностью, которая не является результатом стимуляции иммунных механизмов, а определяется полимерной природой препарата. Полиоксидоний повышает устойчивость мембран клеток к цитотоксическому действию, снижает токсичность лекарственных препаратов, что важно при массивной антибиотикотерапии хронического хламидиоза. Указанные свойства полиоксидония и других препаратов с преимущественным влиянием на клетки фагоцитарной системы определяют в известной степени и тактику их применения для лечения хронических воспалительных процессов хламидийной этиологии. Препарат назначают взрослым внутримышечно или подкожно в дозах 3-6-12 мг один раз в сутки курсом 5-10 инъекций, ежедневно, через день, 2 раза или 1 раз в неделю. Перед инъекцией препарат растворяют в 1-1,5 мл физиологического раствора, дистиллированной воды или 0,25% раствора новокаина. При хроническом хламидиозе применяют курс по 6 мг ежедневно, 10 инъекций через день в сочетании с антибиотиками.

Иммуномодулятор широкого спектра действия, производное инозина – изопринозин (гропринозин) хорошо зарекомендовал себя в клинической практике при лечении хронических инфекций с признаками иммунодефицита (Мавров и соавт., 1997; Мавров, 2000; Осипова, 2002). Он усиливает дифференцировку пре-Т-лимфоцитов, стимулирует индуцированную митогенами пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, повышает функциональную активность Т-лимфоцитов, в том числе их способность к образованию лимфокинов (Rey et al., 1993). Препарат усиливает продукцию интерлейкина-2 лимфоцитами человека, активированными ФГА, и способствует экспрессии на лимфоидных клетках рецепторов для этого интерлейкина (Дранник и соавт., 1994; Земсков и соавт., 1995; Wuogan, 1996). Добавление препарата в культуру лимфоцитов, активированных субоптимальной дозой конканавалина А, повышает накопление эндогенного интерферона. Гропринозин стимулирует активность NK-клеток, а также макрофагов в отношении фагоцитоза, процессинга и презентации антигена. После приема препарата на следующий день в организме возрастает число антителопродуцирующих клеток. Гропринозин стимулирует синтез интерлейкина-1, микробицидность, экспрессию мембранных рецепторов, способность реагировать на цитокины. Таким образом, гропринозин обладает тимозиноподобным действием и стимулирует преимущественно клеточный иммунитет в условиях клеточного иммунодефицита (Wuogan, 1996; Осипова, 2002). При хронической хламидийной инфекции гропринозин можно применять в комплексе с антибиотиками: три цикла по 10 дней (с 10-дневным перерывом). Препарат имеет незначительное количество побочных эффектов. Высокие дозы препарата могут вызвать диспепсические явления, которые проходят после отмены препарата. Поскольку инозины выделяются в форме мочевой кислоты, при длительном применении рекомендуется время от времени проводить контроль уровня мочевой кислоты в сыворотке крови и моче.

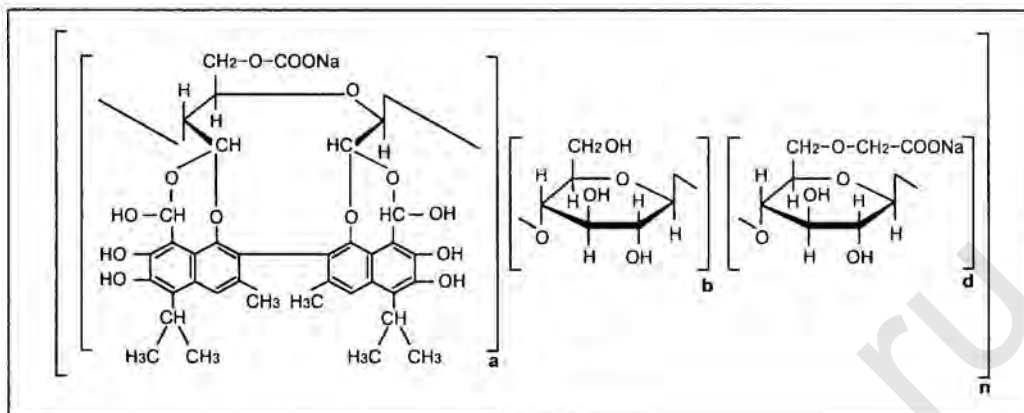
Кагоцел – гетероцепный полимер, молекулярной массой 120-130 кД, получаемый путем химического синтеза из растительного сырья – водорастворимой карбоксиметилцеллюлозы и госсипола. Содержание госсипола в кагоцеле не превышает 3% по массе. Кагоцел представляет собой гигроскопичный аморфный порошок от кремового до коричневого цвета, без запаха. Легко и медленно растворим в воде, практически нерастворим в 95% спирте, ацетоне, хлороформе (3). Госсипол (1,6,7-триокси-3-метил-5-изопропил-8-нафталальдегид) – природный полифенол, являющийся специфическим пигментом хлопчатника (*Gossypium hirsutum*). Госсипол в препарате находится в связанном виде и в процессе метаболизма не выделяется. В молекуле госсипола имеются два нафталиновых ядра, замещённые гидроксильными, альдегидными и алкильными группами. Это обуславливает его высокую биологическую активность (рисунок 13.16). Госсипол давно известен как вещество, обладающее химиотерапевтической активностью в отношении различных вирусов и бактерий (Вичканова и соавт., 1983).

Процесс получения субстанции кагоцел заключается в химическом синтезе полимера из натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы, дополнительно обработанной йодной кислотой и изопропиловым спиртом, и госсипола. Сама по себе карбоксиметилцеллюлоза интерферон-индуцирующей активностью не обладает, а с введением в молекулу низкомолекулярного полифенола госсипола образует новое соединение с высокой биологической активностью (Галегов и соавт., 2002, 2003). Таким образом, по химической структуре кагоцел – это натриевая соль сополимера (1→4)-6-0-карбоксиметил-β-D-глюкозы, (1→4)-β-D-глюкозы, (21→24)-2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбокси-метоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагепта-цикло (23.3.2.2<sup>19</sup>.0<sup>5,25</sup>.0<sup>8,27</sup>.0<sup>9,18</sup>.0<sup>12,17</sup>) дотриаконта-1,3,5(28),6,8(27),9(18), 10, 12(17), 13,15-декаена (рис. 13.17).



**Рисунок 13.16.** Госсипол (1,6,7-триокси-3-метил-5-изопропил-8-нафталальдегид) — природный полифенол, являющийся специфическим пигментом хлопчатника (*Gossypium hirsutum*). В молекуле госсипола имеется два нафталиновых ядра, замещённых гидроксильными, альдегидными и алкильными группами, обуславливающими его высокую биологическую активность. Госсипол известен как вещество, обладающее химиотерапевтической активностью в отношении различных вирусов и бактерий (Вичканова и соавт., 1983).

a=30%, b=63%, d=34%, n=530-532.



**Рисунок 13.17.** Кагоцел — это натриевая соль сополимера (1→4)-6-0-карбоксиметил-β-D-глюкозы, (1→4)-β-D-глюкозы, (21→24)-2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбокси-метоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагепта-цикло [23.3.2.2<sup>14</sup>.0<sup>21</sup>.0<sup>27</sup>.0<sup>34</sup>.0<sup>12,17</sup>] дотриаконта-1,3,5(28),6,8(27),9(18), 10, 12(17), 13,15-декаена. Кагоцел — гетероцепный полимер, молекулярной массой 120-130 кД, получаемый путем химического синтеза из растительного сырья — водорастворимой карбоксиметилцеллюлозы и госсипола. Содержание госсипола в кагоцеле не превышает 3 масс %. Госсипол в препарате находится в связанном виде и в процессе метаболизма не выделяется. Сама по себе карбоксиметилцеллюлоза интерферон-индуцирующей активностью не обладает, а с введением в молекулу полимера низкомолекулярного полифенола госсипола образует новое соединение с высокой биологической активностью (Галегов и соавт., 2002, 2003).

Рядом экспериментальных и клинических исследований была установлена мощная иммуномодулирующая активность кагоцела. Основным механизмом действия кагоцела является способность индуцировать продукцию интерферона. Он вызывает образование в организме человека так называемого позднего интерферона, являющегося смесью α- и β-интерферонов, обладающих высокой противовирусной активностью. Кагоцел вызывает продукцию интерферона практически во всех популяциях клеток, принимающих участие в иммунном ответе организма на внутриклеточные агенты: Т- и В- лимфоцитах, макрофагах, гранулоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках. При приеме внутрь одной дозы кагоцела титр интерферона в сыворотке крови достигает максимальных значений через 48 часов. Интерфероновый ответ организма на введение кагоцела характеризуется продолжительной (до 4-5 суток) циркуляцией интерферона в кровотоке. Продукция интерферона в сыворотке крови интерферона достигает высоких значений лишь через 48 часов после приема кагоцела, в то время как в кишечнике максимум продукции интерферона отмечается уже через 4 часа (Галегов и соавт., 2002, 2003).

При исследовании интерферон-индуцирующей активности препарата кагоцел *in vitro* показано, что препарат стимулирует выработку интерферона в культурах клеток мышино-го происхождения L-929 и человеческой диплоидной клеточной культуре М-19. При этом пик продукции интерферона отмечался через 12 часов индукции, а максимальные титры достигали для М-19 — 2560 ед/мл, для L-929 — 2048 ед/мл, для обеих культур клеток оптимальная концентрация кагоцела составляла 250 мкг/мл (3). При индукции кагоцелом наибольшие титры интерферона синтезируют спленоциты, клетки костного мозга (320 ед/мл), в меньшей степени лейкоциты периферической крови и тимоциты (3). При анализе антиген-

ного состава интерферонов, индуцированных препаратом кагоцел, было установлено, что под воздействием препарата в клетках М-19 вырабатывается интерферон- $\beta$ , а в культуральной суспензии лимфоцитов крови человека вырабатывается смесь интерферонов- $\alpha$  и - $\beta$  (Галегов и соавт., 2002, 2003).

Результаты проведенных исследований по определению интерферон-индуцирующей активности препарата «кагоцел» *in vivo* в зависимости от дозы и пути его введения показали, что максимальные титры интерферона (1280 ед/мл) в сыворотке крови мышей отмечались при внутрибрюшинном введении индуктора в дозе 100 мг/кг веса. При подкожном способе введения максимальная продукция сывороточного интерферона достигала 640-1280 ед/мл и отмечалась при дозе 50 мг/кг веса. При пероральном пути введения достаточно высокие титры (640-1280 ед/мл) регистрировались в кровотоке животных при дозе кагоцела 10 мг/кг веса, при этом количество вводимого вещества в 10 и 5 раз, соответственно, меньше по сравнению с парентеральными способами его введения (Галегов и соавт., 2002, 2003).

При изучении динамики накопления интерферона в крови мышей при различных путях введения кагоцела установлено, что при внутрибрюшинном и пероральном способах его введения, титры интерферона достигали максимальных значений через 48 часов (1024-2048 ед/мл). Интерферонный ответ организма животных при этом характеризовался продолжительной циркуляцией интерферона в кровотоке животных (до 72-96 часов). Характер распределения эндогенного интерферона в организме экспериментальных животных при пероральном введении препарата соответствовал характеру распределения самого кагоцела изученного при введении в организм кагоцела, меченного радиоактивным изотопом углерода  $^{14}\text{C}$ . Уже через 4 часа в кишечнике обнаруживался интерферон в концентрации более 10 000 ед/г ткани органа. В это время в сыворотке крови интерферон только начинал определяться, достигая максимума к 24-48 часам. Динамика накопления интерферона в печёночной, лёгочной ткани, а также в тимусе, повторяет динамику накопления интерферона в сыворотке крови, но уровень, определяемый в этих органах, на порядок ниже уровня активности сывороточного интерферона (Галегов и соавт., 2002, 2003).

При изучении участия иммунокомпетентных клеток в продукции интерферона было установлено, что при индукции *in vivo* наблюдалась некоторая избирательность. Среди исследованных клеток – наибольший уровень интерферон отмечался в спленоцитах, лимфоцитах крови и селезенки, наименьший – в клетках тимуса. Пик продукции интерферона лимфоцитами приходился на 2-3 сутки после индукции, по-видимому, за счет активности Т-клеток. В-лимфоциты и гранулоциты периферической крови синтезировали максимум интерферона в первые 24 часа после индукции (Галегов и соавт., 2002, 2003).

Помимо интерферон-индуцирующей активности кагоцел стимулирует выработку различными клетками других цитокинов. Для оценки цитокин-индуцирующей активности кагоцела использовали линии клеток человека: остеосаркомы МG-63, моноцитарной лейкемии J-96 и J-41, Т-клеточной линии МТ-4, аденокарциномы надпочечников SW 13 В линии клеток МG-63. Кагоцел в дозе 250 мкг/мл индуцировал биосинтез мРНК цитокинов интерферон- $\alpha/\beta$ , ИЛ-1, ИЛ-2 и ИЛ-6 (Галегов и соавт., 2002, 2003). При изучении цитокин-индуцирующей активности кагоцела на клеточной модели J-96 и родственной ей интерферон-резистентной линии клеток J-41 установлено, что кагоцел в стандартной дозе индуцировал синтез мРНК цитокинов интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\gamma$  и ИЛ-2 на клеточной культуре J-41, и не изменял конститутивный цитокиновый профиль интерферон-чувствительных клеток J-96.



Это указывает на существенные различия в реагировании клеток на действие препарата, в зависимости от их интерферон-чувствительности. При исследовании линии клеток МТ-4, в которых конститутивно экспрессируются мРНК интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\gamma$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- $\alpha$  кагоцел в стандартной дозе ингибировал экспрессию мРНК интерферона- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-10. При инфицировании этой клеточной культуры вирусом гепатита С, кагоцел восстанавливал подавленную вирусом экспрессию мРНК цитокинов: интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ингибировал экспрессию мРНК цитокинов: ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12. На клеточной культуре SW-13, конститутивно экспрессирующей мРНК цитокинов интерферона- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 и ФНО- $\alpha$ , кагоцел ингибировал экспрессию мРНК таких цитокинов как интерферон- $\alpha$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, и не оказывал влияния на экспрессию цитокинов ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18 (5, 6, 10).

Проведенные на клеточных моделях исследования демонстрируют способность кагоцела регулировать цитокиновый профиль клеток различного происхождения и модулировать его при инфицировании клеток вирусной инфекцией. Для медицинского применения кагоцел выпускается в виде таблеток 0,1 г, содержащих 0,012 г активного вещества. Другие компоненты таблеток: крахмал картофельный, кальция стеарат, сахар молочный (Галегов и соавт., 2002, 2003). Кагоцел, при назначении в терапевтических дозах, нетоксичен, не накапливается в организме. Препарат не обладает мутагенными и тератогенными свойствами, не канцерогенен и не обладает эмбриотоксическими действиями. Наибольшая эффективность при лечении кагоцелом достигается при его назначении не позднее 4-го дня от начала острой инфекции. В профилактических целях препарат может применяться в любые сроки, в том числе и непосредственно после контакта с возбудителем инфекции. Так при генитальном герпесе ряд авторов рекомендуют назначать одновременно с антибактериальной терапией по 2 таблетки 3 раза в день в течение 5 дней. Всего на курс - 30 таблеток (Полонский и соавт., 2002; Тутушкина, Шульженко, 2004; Мавров и соавт., 2005).

В одно исследование было включено 49 больных хроническим хламидиозом, которые ранее неоднократно безуспешно лечились различными антибиотиками (Мавров, Чинов, 2005). Были сформированы основная группа (26 человек) и группа сравнения (23 человека). Кагоцел был назначен 26 пациентам по 2 таблетки 3 раза в день в течение 5 дней. Все больные получали джозамицин (вильпрафен) по 1,5 г в сутки 15 дней. В основной группе клинический эффект наблюдался у 25 (96,2 $\pm$ 3,8 %) больных. Микробиологический эффект - у 100%. В группе сравнения клинический и микробиологический эффект был, соответственно, 21 (91,3 $\pm$ 5,9%) и 22 (95,7 $\pm$ 4,3%) (Мавров, Чинов, 2005). Включение индуктором интерферона кагоцела в лечебный комплекс при хронической хламидийной инфекции обосновано с точки зрения клинического и микробиологического эффекта и переносимости лечения (Мавров и соавт., 2005).

При хронической форме урогенитального хламидиоза целесообразно назначение препаратов, воздействующих на неспецифическую реактивность организма, активизирующих репаративно-восстановительные процессы. Такими свойствами обладают препараты эхинацеи. Род *Echinacea* относится к семейству *Compositae* (сложноцветные). С древних времен эхинацея употреблялась коренными жителями Америки для лечения ран, заболеваний глаз, укусов насекомых и змей, экземы, свинок и хронических инфекционных болезней. В 80-е годы, в связи с открытием иммуностимулирующих свойств эхинацеи, интерес к этому растению усилился. Как и у большинства растительных препаратов, одной действующей

субстанции у эхинацеи нет. Ее лечебный эффект обусловлен сложной уникальной комбинацией флавоноидов, эфирных масел, полиацетиленов, алкиламинов, полисахаридов и других биологически активных веществ. (Самородов и соавт., 1996; Самородов, Поспелов, 2000; Щеголева и соавт., 2000; Bergner, 1997; Wagner, 1996). Доказано, что экстракты эхинацеи стимулируют фагоцитоз, активность NK-лимфоцитов (естественных киллеров), усиливают антигел-зависимую клеточную цитотоксичность, которая обусловлена альфа-фактором некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ) (Parnham, 1996). Эхинацея обладает антибактериальным и антипротозойным эффектом, который приписывают кофеиновой кислоте и полиацетиленам. Это показывают исследования, проведенные на *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esherihia coli* и *Trichomonas vaginalis* (Schar, 1999). Экспериментальные исследования на животных показали выраженный противовоспалительный эффект полисахаридного компонента экстракта эхинацеи. Обширные клинические испытания последних лет показали безопасность и эффективность применения препаратов эхинацеи при состояниях, сопровождающихся нарушениями иммунного статуса (Jurcic et al., 1989; Parnham, 1996). Это позволило включить эти препараты в растительные фармакопеи Европы и Америки (British Herbal Compendium, 1999; Leung, Forster, 1996). Мавров и Нагорный (2002) изучали клиническую и микробиологическую эффективность лечения больных мочеполовым хламидиозом джозамицином (вильпрафеном) в соединении с эхинацином-мадаус (эхинацин по 1 таблетке (88,5 мг) 3-4 раза в день) на протяжении 20 дней. Препараты хорошо переносились, без побочных эффектов. Клинический эффект наблюдался у 23 (88,5 $\pm$ 6,2%) больных, микробиологический – у 24 (92,3 $\pm$ 5,2%).

### 13.2.2. Физические методы лечения

Наряду с медикаментозными и иными лечебными средствами, для лечения острых, подострых и хронических воспалительных процессов назначают физиотерапию. Физиотерапевтические средства можно использовать профилактически для повышения защитных сил организма, а также как важную составную часть комплексного лечения воспалительных заболеваний мочеполовых органов, обусловленных хламидиями. Используют УВЧ микроволнами сантиметрового диапазона, диатермокоагуляцию, диатермопунктуру. Физиотерапевтические процедуры нельзя назначать при подозрении на онкогенный процесс и при беременности. Больным эндометритом физиотерапию назначают в подострой и хронической стадиях.

Заслуживают внимания ранние работы, где изучалось действие физических методов патогенетической терапии при мочеполовых инфекциях (Шапошников, 1980; Стругацкий, 1981; Грищенко, Резников, 1982). В этих работах анализировались результаты комплексного лечения цервицитов, уретритов, сальпингоофоритов, простатитов, везикулитов, эпидидимитов, однако без учета их возможной хламидийной этиологии. Если учитывать общие закономерности возникновения и протекания инфекционного процесса в половых органах, то эти данные в известной степени применимы к хламидийной инфекции. Так, Грищенко и Резников (1982) показали, что у женщин с воспалительными процессами в гениталиях, независимо от этиологии воспаления, после применения комплекса физиотерапевтических методов лечения частично восстанавливается ранее нарушенная функциональная активность Т-системы иммунитета. При лечении хронического эндоцервита Нинов (1983) рекомендовал интравагинальный и интрацервикальный фонофорез 0,25-0,5% сульфата меди, сульфата цинка или нитрата серебра; электрическое поле ультравысокой частоты (УВЧ) в олигометрических дозах

8-10 мин с использованием вагинальных электродов; микроволновую терапию при помощи полостного излучателя. Экспериментально, путем гистохимического исследования, установлено, что микроволны в малых дозах стимулируют яичники. Проведенные электронно-микроскопические исследования показали, что лечебные дозы микроволн не вызывают поражения клеточных и субклеточных структур. В подострой фазе сальпингоофорита используют микроволновую терапию мощностью 20-30 Вт, при которой круглый излучатель располагают в воздушном зазоре на расстоянии 3-5 см от кожи (Нинов, 1983).

Согласно наблюдениям Николова (1980), у больных с трубным бесплодием можно достичь хороших результатов путем чередования через день интерференциального тока и микроволновой терапии через песок, что можно объяснить взаимным усилением лечебного эффекта обоих методов.

Ряд авторов рекомендуют ультразвуковую терапию. Озвучивают нижнюю часть живота и крестцовую область. Используют лабильные методы в небольших и средних дозах (0,2-0,6 Вт/см<sup>2</sup>). Каждое поле облучают 5-10 мин через день (10-15 процедур) (Грищенко и соавт., 1988). В работах Стругацкого и соавторов (1987) показано применение низкочастотного магнитного поля при обострении хронического сальпингита. Внешним индуктором воздействуют в надлобковой области, а с шестого сеанса используют влагалищный электрод. Напряжение магнитного поля – 30 мТ в импульсном либо постоянном режиме, ежедневно 15-20 мин, на курс по 10-20 процедур. При выраженном болевом синдроме применяется ди-динамический двухфазнофиксированный ток частотой 100 Гц в течение 2 мин. Процедуры проводят ежедневно, всего 15 сеансов при силе тока до появления вибрации.

Для улучшения моторной функции предстательной железы у больных хроническим простатитом Рябинский и соавторы (1983) и Цейтлин и соавторы (1984) применяли прямую электростимуляцию органа монополярным электродом, вводимым в мочеиспускательный канал до семенного бугорка (уретральная методика), либо использовали ректальный электрод. В основе действия электростимуляции лежит восстановление функционального состояния мионевральных синапсов, сокращение гладких мышц и ликвидация застоя в ацинусах.

Резников и соавторы (1989) сообщили о комплексной терапии экскреторного бесплодия, обусловленного хроническим простатитом у 28 мужчин. Авторы использовали поэтапно разные физические методы. Высокоэффективная санация простаты и задней уретры достигалась ультрафонофорезом высокодисперсных лекарственных смесей в сочетании с электромагнитным полем УВЧ, примененным битемпорально. На втором этапе проводили прямую электростимуляцию предстательной железы током силой 80 мА, напряжением 12 вольт, частотой 2,5 кГц, импульсами до 8 мс в сочетании с облучением простаты лазером длиной волны 632,8 нм.

Лазер – квантовый усилитель или генератор электромагнитного излучения оптического диапазона. Лазерное излучение – электромагнитное излучение оптического диапазона, обладающее такими свойствами, как когерентность, монохроматичность, поляризованность, направленность, что позволяет создать большую концентрацию энергии в нужном месте. Слово лазер (LASER) – это аббревиатура, начальных букв английской фразы: Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, что в переводе означает – «усиление света в результате вынужденного излучения». В названии отражен принцип лазера. Если в обычном веществе свет поглощается с преобразованием энергии в тепло, флуоресценцию или рассеивается, то в рабочем теле лазера свет усиливается за счет внешнего источника энергии. (Москвин, 2000).

Альберт Эйнштейн (1879-1955) и Поль Дирак (1902-1984) в своих фундаментальных работах заложили теоретические основы квантовой электроники, изучающей законы поглощения и испускания света. Советский физик В.А. Фабрикант в 1939 году теоретически предсказал возможность стимулированного усиления света и сформулировал необходимые для этого условия. В 1952 одновременно Н.Г. Басов, А.М. Прохоров (СССР), Ч. Таунс, Дж. Тордон, Х. Цайгер (США) и Дж. Вебер (Канада), независимо друг от друга предложили способ практической реализации генерации и усиления сверхвысокочастотных электромагнитных колебаний, и в этом же году были созданы первые квантовые усилители и генераторы в СВЧ-диапазоне (мазеры). В 1964 г. Н.Г. Басов, А.М. Прохоров и Ч. Таунс получили за свою работу Нобелевскую премию в области физики. В 1960 году Т. Мейман (США) сконструировал первый импульсный лазер в видимой области спектра (длина волны 0,6943 мкм) на основе рубинового стержня (синтетический корунд, активированный ионами  $\text{Cr}^{3+}$ ) (Майман, 1960). В 1961 году был создан первый непрерывный гелий-неоновый лазер (длина волны 0,6328 мкм) (Москвин, 2000).

В зависимости от процессов, характеризующих виды взаимодействий лазерного излучения с биообъектом, выделяют три направления медико-биологического применения лазеров:

- лазер в качестве инструмента для изучения биологических структур и процессов – это лазерная диагностика, основанная на взаимодействии излучения с биообъектом;
- луч лазера как способ воздействия на фотофизические и фотохимические процессы, происходящие в живом организме, что изменяет биохимические реакции и оказывает лечебное воздействие;
- применение лазеров, основанное на эффекте фоторазрушения биоструктур. Для этих целей используют лазерные аппараты с высокой выходной мощностью излучения, что позволяет проводить коагуляцию или рассечение тканей, а также избирательно воздействовать на различные ткани, в частности на сосудистые новообразования (Тарасов, 1985; Приезжев, и соавт., 1989; Богомолец, 1999; Буткевич, Коробов, 2000).

Из перечисленных направлений именно низкоинтенсивная лазерная терапия получила наибольшее развитие. На биологическом факультете Харьковского университета в 1964 году была организована лаборатория биофизической генетики, одной из основных задач которой стало изучение генетических различий реакций биологических объектов на воздействие микроволнового и лазерного излучений (Шагбазов, Грабина, 1996; Безлепкина, Коробов, 2000). В Алма-Ате на биологическом факультете Казахского государственного университета в 1965 году стали проводить исследования по биостимуляции лазерным излучением биологических процессов (Инюшин, 1970; Инюшин, Чекуров, 1975). С 1965 года в Институте проблем онкологии АН УССР, а в 1966 году – в Московском научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена было развернуто широкое изучение биологического и противоопухолевого действия лазерного излучения (Гамалея и соавт., 1988; Гамалея, 1972; Девятков, Беляев, 1971).

Данные, накопленные по клиническому применению низкоэнергетических лазеров, показывают, что этот метод является высокоэффективным при лечении заболеваний половой сферы человека (Авдошин, 2000; Ковалев, 200; Кульчавеня, 1992; 2000). Лазерное излучение оказывает местное сосудорасширяющее, тромболитическое, анальгезирующее действие,



улучшает микроциркуляцию и обменные процессы, стимулирует общий и местный иммунитет (Бабюк, 1992). Прохоренков и соавторы (1989) наблюдали 8 больных постгонорейным уретритом, лечившихся внутриуретральной лазеротерапией в сочетании с антибактериальными препаратами. Длина волн была 632,8 нм, мощность на конце световода – 10-20 мВт (137). Бабюк и Мавров (1994) применили гелий-неоновый лазер для внутриуретрального и внутриректального воздействия на предстательную железу у 194 больных хроническим простатитом. Лазерное излучение оказывало анальгезирующее действие и нормализовало соотношение разных популяций Т-лимфоцитов, а также снижало аутоиммунные реакции к тканям предстательной железы. Длительность ремиссии возросла в 1,5 раза, а частота рецидивов уменьшилась в 1,3 раза по сравнению с контрольной группой больных, не получавших лазеротерапию. Парашук и соавторы (2000) применили фотодинамическое воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения на микрофлору влагалища при кольпитах и цервицитах у 40 женщин с хроническим сальпингоофоритом. Была достигнута нормализация микробной экосистемы влагалища на 5-е сутки. Клинические проявления кольпита исчезли.

Мавров и соавторы (1997-2002) применили низкоэнергетические лазеры в комбинации с антибактериальными препаратами и иммуномодуляторами для лечения хронической хламидийной инфекции. Лазеротерапия использовалась местно (непосредственно на очаг поражения), на рефлексогенно-сегментарные зоны, в виде лазеропунктуры на биологически активные точки, а также для внутривенного и надвенозного облучения крови. Источником лазерного излучения был гелий-неоновый лазер ЛГН-111 с длиной волны 0,63 мкм, при мощности излучения 25 мВт и импульсный генератор инфракрасного излучения «Мустанг-017», с длиной волны 0,87-0,91 мкм, частота излучения – 1500 Гц, мощность излучения – 20 мВт.

Лазеротерапия суставного синдрома при болезни Рейтера. Поверхность сустава облучалась с двух противоположных проекций (на протяжении сеанса по 4-5 минут) на каждое поле (сканирование в режиме «сетки»). Также осуществлялось влияние двумя полями на рефлекторно-сегментарные зоны: шейно-воротниковую зону при патологии суставов верхних конечностей и пояснично-крестцовую – при поражении суставов нижних конечностей. Суммарная доза облучения за сеанс не превышала 24 Дж для красного и 2,4 Дж для инфракрасного излучения. Число процедур на курс – 7-10, интервал – 3 процедуры через день, остальные через 2 дня.

Чрескожное лазерное облучение крови. Экспозиция – 10-15 мин на 1 проекцию сосуда (кубитальная область, паховая), суммарная экспозиция – до 30 мин, ежедневно пять процедур, затем – через день, курс – 10 сеансов.

Лазеротерапия при простатитах и аднекситах. Экспозиция – 10-15 мин на 1 проекцию: у женщин – область проекции придатков матки на передней брюшной стенке и паравerteбрально на уровне Th<sub>х</sub>, Li; у мужчин – участок промежности в области проекции предстательной железы и участок брюшной стенки над лонным сочленением. Курс – 10 сеансов. Для воздействия на общее состояние организма производят облучение зоны проекции печени на переднюю стенку грудной клетки и зоны проекции бифуркации брюшной аорты (слева от пупка).

Лечение эрозий шейки матки. Прямое облучение эрозированной поверхности шейки матки проводится с помощью гелий-неонового лазера ЛГН-111 с длиной волны 0,63 мкм при мощности излучения 25 мВт. Число процедур на курс – 7-10, продолжительность одной процедуры – 20 минут, интервал – 3 процедуры через день, остальные через 2 дня.

**Лечение циститов.** Прямое облучение области шейки мочевого пузыря проводится с помощью гелий-неонового лазера ЛГН-111 с длиной волны 0,63 мкм при мощности излучения 25 мВт. Кварцевый проводник вводили в уретру пациента через катетер толщиной 2,2-3,3 мм. В течение 7-10 минут облучали область шейки мочевого пузыря, далее, равномерно извлекая катетер на 0,5 см, в течение 10-15 минут проводили облучение всей уретры. Число процедур на курс – 7-10, интервал – 3 процедуры через день, остальные через 2 дня.

У больных, получавших лазеротерапию, отмечались выраженные клинические улучшения: купировался болевой и дизурический синдромы, уменьшалось количество выделений из половых путей, эпителизировались эрозии шейки матки, нормализовались показатели крови и мочи. Все больные переносили лазеротерапию хорошо, побочных эффектов не наблюдалось. По многолетним данным Института дерматологии и венерологии АМН Украины, процент рецидивов при лечении больных хронической, осложненной урогенитальной патологией без использования лазеротерапии составляет 10-15%. В случае применения лазера рецидивы составили не более 5%. Эти данные позволяют рекомендовать низкоэнергетические лазеры для лечения больных хронической хламидийной инфекцией (Mavrov et al., 1997; Мавров, и соавт. 1998; 2000; 2002). Лазерная терапия, обладающая противовоспалительными, гипосенсибилизирующими, бактериостатическими свойствами, способностью повышать иммунную реактивность и неспецифическую резистентность организма, а также улучшать микроциркуляцию и реологические свойства крови, является патогенетически обоснованным методом лечения хламидийных инфекций. Снижение защитных сил макроорганизма, усиление вирулентности возбудителей на фоне неблагоприятных изменений во внешней природной и социальной среде является обоснованием широкого применения лазеротерапии в лечении хламидиоза, которое должно быть основано на следующих принципах:

- наличие полного этиологического диагноза (синдромный подход неприемлем);
- обязательно в комплексе с этиотропным лечением;
- назначение при хронических процессах;
- сочетание местных, общих и рефлексогенных методик с учетом патогенеза заболевания;
- расширение показаний, направленных на профилактику осложнений.

#### Противопоказания к применению лазеротерапии:

Злокачественные новообразования, доброкачественные образования со склонностью к прогрессированию; заболевания крови; активный туберкулез легких; тяжелые формы заболеваний сердечно-сосудистой системы (кризовое течение гипертонической болезни, сердечно-сосудистая недостаточность III стадии); острые нарушения мозгового кровообращения; заболевания легких с явлениями недостаточности III стадии; печеночная и почечная недостаточность в стадии декомпенсации; гипертиреоз; беременность во все сроки; лихорадка невыясненной этиологии. Для мужчин: специфический инфекционный простатит в острой и подострой стадиях; полипозный, язвенный, геморрагический проктит; кровоточащий геморрой; аденома предстательной железы с выраженным нарушением мочеиспускания. Для женщин: фиброзно-кистозная мастопатия, миома матки; зуд вульвы на фоне сахарного диабета, глистной инвазии; острый бартолинит в стадии абсцедирования; нагнаившаяся киста бартолиновой железы; опухоли и ретенционные кисты яичников.

Аутогемотрансфузия крови, облученной ультрафиолетовыми лучами, (АУФОК) как метод лечения стал применяться в клинической практике для лечения хронических инфекций с 1930-х годов (Hancock, Knott, 1934; Havlicek, 1934). Уже тогда авторы отмечали бактерицидное и стимулирующее действие этого метода. В СССР А.Н.Филатов и Г. Касумов (1937) впервые применили АУФОК при анемиях. Позже метод АУФОК вызвал интерес специалистов, занимающихся патологией урогенитальных органов человека (Бенедиктов, 1981; Грищенко, Резников, 1983; Зорин, Васильев, 1987; Грищенко и соавт., 1990).

Механизм терапевтического действия крови, облученной ультрафиолетовыми лучами, сложен и недостаточно изучен. Поглощение квантов света при облучении крови является пусковым моментом, приводящим в движение цепь взаимосвязанных превращений с большим количеством прямых и обратных связей, затрагивающих в той или иной мере практически все уровни регуляции жизнедеятельности организма. Работа Самойловой (1979) показала, что воздействие ультрафиолетового облучения (УФО) на клетки крови сопровождается поступлением во внеклеточное пространство веществ белковой и углеводной природы. Эти вещества поступают из внешнего примембранного слоя, который при УФО подвергается частичной фотохимической деструкции. При электронной микроскопии эритроцитов человека и животных, взятых из крови после облучения полным спектром УФО, наблюдается утончение поверхности мембран (Kabat et al., 1973). При облучении и реинфузии критической массы крови происходит цепная реакция передачи ее «возбужденного» состояния на весь объем крови, а также на другие органы и системы организма. Это обеспечивает поступление соответствующих сигналов к центральным регулирующим структурам, ответственным за формирование неспецифических адаптагенных реакций (Гаркави и соавт., 1977). Основным механизмом действия АУФОК при лечении инфекционной патологии заключается в повышении устойчивости организма к бактериальным и вирусным возбудителям. АУФОК обладает бактерицидным действием, дезинтоксикационной способностью, усиливает фагоцитарную активность лейкоцитов, увеличивает насыщение крови кислородом, снижает СО<sub>2</sub> и увеличивает содержание лимфоцитов, увеличивает содержание гемоглобина и эритроцитов, уменьшает вязкость крови.

Клетной (1980) впервые применил АУФОК для лечения тяжелых дерматозов и урогенитальных инфекций. Бенедиктов (1981) проводил лечение гипоменструального синдрома у 30 женщин только методом АУФОК. У 9 женщин восстановился регулярный менструальный цикл, а 3 из них забеременели. Щербинов и соавторы (1981) использовали АУФОК для лечения больных хроническим двусторонним аднекситом в стадии обострения. Авторы получили хороший эффект. Они отметили, что АУФОК оказывает общеукрепляющее действие, снимает вегетативные и невротические расстройства, улучшает трофику тканей, обладает гипосенсибилизирующим действием. Работы Грищенко и Зубенко (1985), а также Резникова (1981) показали высокую эффективность АУФОК при лечении хронических воспалительных процессов придатков матки. Показано, что активность щелочной фосфатазы, пероксидазы и содержание гликогена в нейтрофильных лейкоцитах нормализовались к 10-14-му дню от начала лечения. Зорин и Васильев (1987) применили АУФОК в комплексном лечении вялотекущих форм гонорейного уретрита. Авторы показали, что этот метод стимулировал поглотительную и бактерицидную функцию нейтрофильных гранулоцитов крови и очагов поражения.

**Методика АУФОК при лечении хламидиоза.** Аппарат для проведения аутоультрофиолетового облучения крови АУФОК-1. Воздействие УФО проводится с помощью УФ-лампы. Спектральный

диапазон УФ-облучения – 243-253 нм. Мощность излучения на выходе световода – 40 мВт. Расчетная доза АУФОК – 1,5 мл на 1 кг веса. Время экспозиции – 6-8 минут. Курс лечения – 8-12 процедур через день. При первой процедуре проводят облучение из расчета 0,5 мл на 1 кг веса. Дальнейшее повышение дозы проводят в соответствии с состоянием больного и формулой крови.

Противопоказания к АУФОК:

Порфирия, острые язвы желудка и двенадцатиперстной кишки, онкологические заболевания.

При остаточных патологических изменениях, возникших в половых органах у мужчин и женщин после перенесенной хламидийной инфекции, важную роль играет грязелечение. Наиболее целесообразным методом грязелечения, щадящим организм больных, и одновременно наиболее эффективным является мигрирующий метод. Он предусматривает применение грязевых ванн (общих, сидячих полуванн), аппликаций в виде «трусов», вагинальных и ректальных тампонов, а также грязевого раствора в виде микроклизм, влагалищных орошений. Средняя температура грязи 39-40°C, продолжительность процедуры – до 20 мин, на курс 10-12 грязевых ванн или аппликаций. Наилучшие результаты отмечены при лечении неорганическими иловыми гязями. С успехом проводят лечение в Саках, Куяльнике, Мариуполе, Бердянске, Евпатории, Железноводске, Ессентуках, Пятигорске, Сочи-Мацесте и других курортах.

### 13.2.3. Другие патогенетические средства

Комплексная терапия, проводимая в соответствии с клиническим и топическим диагнозом, стадией болезни и особенностями патологии у каждого больного, предусматривает дифференцированное использование ферментных, болеутоляющих, седативных, тонизирующих, гипосенсибилизирующих и стимулирующих средств, а также проведение целенаправленных местных процедур. В хронической стадии болезни большое значение имеет терапия, направленная на повышение защитных сил организма, которая способствует обратному развитию возникших патологических изменений и ускорению восстановительных процессов в пораженных органах и тканях.

Системная энзимотерапия (полиэнзимотерапия) основана на применении комбинированных ферментных препаратов избирательного протеолитического действия. Полиэнзимные препараты воздействуют на ключевые физиологические и патофизиологические процессы в организме, поэтому они нашли широкое применение в медицине при лечении острых, хронических воспалительных заболеваний, в том числе и обусловленных инфекциями, передающимися половым путем. В препаратах системной энзимотерапии все компоненты подобраны так, чтобы их действие взаимодополнялось и усиливалось для получения требуемого эффекта. В их состав входят протеиназы растительного и животного происхождения – трипсин и химо tripsин, которые выделяются из поджелудочной железы животных, папаин – из незрелых плодов папайи, бромелайн – из ананасов. В препаратах Вобэнзим и Флогэнзим энзимы комбинируются с рутином, который дополняет их терапевтический эффект. Рутин является флавоноидным глюкозидом растения *Sophora japonica*. Он стабилизирует эндотелий сосудов, обладает противовоспалительным действием, адсорбирует свободные радикалы. Применение комбинированных энзимных препаратов запускает фибринолиз посредством активации



плазминогена, который содействует деполимеризации, изменению качества фибрина и растворению микротромбов. Энзимы способны снижать адгезивные свойства клеток крови, повышать эластичность эритроцитов и снижать уровень холестерина и триглицеридов. Ферментные препараты ускоряют рассасывание и уменьшают интенсивность отека, расщепляют экстравазально выделенный фибрин и другие протеины, снижают их осмотический эффект в пораженной ткани. Первичный анальгетический эффект энзимных препаратов обусловлен расщеплением медиаторов воспаления протеиназами. Вторичный же анальгетический эффект объясняется снижением онкотического давления и напряжения тканей, уменьшением отека, а также улучшением микроциркуляции и оксигенации. Энзимы оптимизируют течение воспалительной реакции – укорачивают катаболическую фазу воспаления и ускоряют его анаболическую фазу. Происходит ускорение распада медиаторов воспаления (С-реактивного белка, простагландинов, лизоцима, брадикинина, гаптоглобина). Протеолитические ферменты также уменьшают инфильтрацию плазматическими клетками, усиливают элиминацию белкового детрита и фибрина из зоны воспаления. Протеиназы стимулируют и регулируют функции некоторых иммунцитов (моноцитов-макрофагов, гранулоцитов, NK-клеток и Т-лимфоцитов). Они повышают их фагоцитарную и цитотоксическую активность, индуцируют производство некоторых цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12). Протеолитические ферменты способны потенцировать действие антибиотиков, что повышает эффективность этиотропной терапии при хламидиозе. При лечении хламидийной инфекции с первых дней антибиотикотерапии в комплексном лечении можно применять Вобэнзим или Флогэнзим. Эти препараты при лечении больных хроническим хламидиозом рекомендуется принимать в максимальных дозах – 5-7 таблеток 3 раза в день на протяжении 2-4 недель, затем по 3-4 таблетки 3 раза в день 1-2 месяца (Горпинченко, Гибнер, 2002).

Если в процессе лечения больных с различными формами хламидиозов развиваются аллергические реакции, то назначают гипосенсибилизирующие, антигистаминные препараты (лоратадин, эбастин, фексофенадин) (Гущин, 2000). Применять стероидные препараты, назначаемые при воспалительных процессах в мочеполовых органах и их осложнениях или при нарушении функций эндокринной системы, при хламидийной инфекции нежелательно. Угнетая иммуногенез, они одновременно активируют хламидии, что способствует возникновению рецидивов, хронизации процесса, а возможно, и персистентной инфекции. В случаях хламидийной инфекции, осложненной реактивной спондилоартропатией, кортикостероидные препараты можно применять в пределах небольшого срока или пульс-терапии на фоне адекватного этиотропного лечения. При развитии местной аллергической реакции (в очаге инфекции) в тех же условиях допустима местная инстиляция 0,5% раствора гидрокортизона, а также кратковременное его применение с помощью фонофореза.

Высокие разовые и курсовые дозы антибиотиков при лечении хламидиоза требуют защиты печени. При длительной антибиотикотерапии ее резервы быстро истощаются, что приводит к гибели паренхиматозных клеток (Подымова, 1998). Ферменты мембран гепатоцитов не всегда способны обезвредить продукты метаболизма лекарственных средств. Поэтому необходима фармакологическая коррекция нарушенных функций печени при длительном приеме антибиотиков у больных (Мавров и соавт., 2001). Еще в 77 году нашей эры римский натуралист Плиний Младший писал о благотворном воздействии растения *Silybum* на печень. В русском языке это растение называется «расторопша» или «остро-пёстро». *Silybum* – род колючих растений семейства сложноцветных (*Compositae*), родственник бодяка и чертополоха.

Вид *Silybum marianum* наиболее богатый силимарином – комбинацией флавоноидов, в которую входят силибин, силидианин, силикристин, которые и являются действующей лечебной субстанцией этого растения. Наиболее активный из флавоноидов – силибинин. Наибольшее содержание силибинина – в плодах растения. Семена содержат также бетанин, триметиллицин и насыщенные жирные кислоты, которые усиливают гепатопротективный и противовоспалительный эффект силибинина. Действие силибинина включает несколько механизмов – антиоксидантный эффект, подавление перекисного окисления липидов, усиление первой фазы детоксикации печени (Baer-Dubowska, 1998; Bosisio, et al., 1992; Halim et al., 1997). Силибинин обладает противовоспалительным эффектом. Он подавляет синтез простагландинов и лейкотриенов, стабилизирует тучные клетки, подавляет функцию купферовых клеток, а также тормозит миграцию нейтрофилов (De La Puerta, 1996; Dehmlow et al., 1996). Кроме того, силибинин повышает синтез белка в гепатоцитах и стимулирует регенерацию печеночной ткани. Исследования на животных показали, что силибинин предотвращает превращение звездчатых клеток в миофибробласты, тормозя тем самым развитие фиброза (Fuchs et al., 1997). В Украине силибинин зарегистрирован под торговым названием легалон (капсулы по 70 и 140 мг).

Всем больным с хламидийной инфекцией проводят витаминотерапию (тиамин, рибофлавин, кислота аскорбиновая, никотиновая, витамин Р) для возмещения потери витаминов в результате применения больших доз антибиотиков.

При местной терапии необходимо постоянно соблюдать гигиену наружных половых органов и, в соответствии с топическим диагнозом, проводить целенаправленные местные процедуры. В случаях возникновения острых хламидийных уретритов местные манипуляции, как правило, не показаны. Помимо этиотропного лечения при подострых и хронических воспалительных процессах в мочеиспускательном канале его промывают поочередно растворами калия перманганата (1:8000-1:10000), этакридина лактата (1:1000), фурациллина (1:5000) ежедневно, 1 раз в сутки, на курс 5-10 промываний. В случаях торпидного течения процесса ежедневно проводят инстилляци в мочеиспускательный канал 2-3% раствора димексида с тетрациклином (100 000 ЕД/мл) или 2% масляного раствора хлорофиллипта. При широких парауретральных протоках, являющихся частым местом обитания хламидий, проводят их ежедневные промывания теми же средствами, после чего в них вводят 2% раствор колларгола или протаргола. Небольшие протоки прижигают серебра нитратом, напаянным на тонком зонде, и разрушают диатермокоагуляцией. Больным с выраженным поражением предстательной части мочеиспускательного канала и семенного бугорка ежедневно в течение 10 дней назначают инстилляци через катетер по 5 мл следующего состава: 2% раствора желатина 50 мл, ретинола (масляный раствор) 500 ЕД, инсулина 200 ЕД, тетрациклина гидрохлорида 500000 ЕД, 0,5% раствора новокаина 20 мл. При очаговом поражении мочеиспускательного канала, вызванном хламидиями, а также при везикулите, простатите и эпидидимите в комплексной терапии применяют те же методы местного лечения, что и при воспалительных процессах той же локализации, возникающих при других урогенитальных инфекциях. При наличии мягкого инфильтрата в мочеиспускательном канале проводят инстилляци растворов серебра нитрата (0,25%), протаргола или колларгола (2%) через день, вводят тампоны с 2% раствором протаргола в глицерине и осторожно бужируют мочеиспускательный канал при отсутствии острого воспалительного процесса в предстательной железе, семенных пузырьках и др. В тех же

случаях, при наличии переходного и твердого инфильтрата, в мочеиспускательный канал вводят металлические бужи возрастающего диаметра через 1-2 дня, затем его промывают. Показано также сочетание бужирования с диатермией.

При хламидийном уретральном адените, везикулите, простатите и эпидидимите всегда требуется проводить местное лечение задней части мочеиспускательного канала. При грануляционном уретрите слизистую оболочку мочеиспускательного канала обрабатывают 0,5% раствором серебра нитрата или 2-5% раствором протаргола в глицерине. В случае необходимости под контролем уретроскопа обрабатывают грануляции и тушируют семенной холмик 10-20% раствором серебра нитрата. При уретральном адените проводят бужирование мочеиспускательного канала и массаж на буже с последующими промыванием, тампонадой по Вашкевичу, тепловыми процедурами. Больным колликулитом с затяжным течением назначают 0,5% раствор гидрокортизона в виде инстилляции в мочеиспускательный канал через катетер по 3 мл 1 раз в сутки (не более 4-5 дней). При остром простатите применяют теплые сидячие ванны (38-40°C) в течение 5-10 мин и микроклизмы (39-40°C) с болеутоляющими средствами (экстракт красавки и др.). При лечении хронического простатита используют массаж (12-15 процедур через день), тепловые процедуры (диатермия, индуктотермия) ежедневно, 10-12 дней; фонофорез гидрокортизоновой (гидрокортизон 0,125 г, ланолин 25 г, вазелин 25 г), тетрациклиновой или эритромициновой мазей на область промежности, через день, не более 10 сеансов, грязелечение. Фонофорез чередуют с ультразвуком, который направлен на паравертебральные зоны пояснично-крестцовой области, или с использованием синусоидальных модулирующих токов (амплипульстерапия). Применение этих процедур в комплексном лечении простатита, часто возникающего при хламидийной инфекции у мужчин, способствует эффективному купированию воспалительного процесса.

При остром хламидийном эпидидимите показаны иммобилизация мошонки (ношение суспензория), новокаиновая блокада, в случаях реактивной водянки яичка – пункционная эвакуация жидкости, при абсцедировании придатка яичка – вскрытие абсцесса. В случаях хронического эпидидимита добавляют тепловые и физиотерапевтические процедуры (компрессы, соллюкс, диатермию, УВЧ и др.), применяют стимулирующие средства, грязелечение. Одновременно проводят лечение сопутствующих поражений мочеполовых органов.

Местное лечение хламидийного уретрита у женщин проводят теми же средствами и методами, что и у мужчин. Санируют также парауретральные протоки. Больным острым бартолинитом рекомендуют соблюдать покой, назначают свечи с экстрактом красавки, теплые сидячие ванны с калия перманганатом (1 столовая ложка 2% раствора на 1 л воды, 38-39°C), новокаиновые блокады с антибиотиками 1 раз в сутки. В подострой и хронической стадиях болезни используют электрофорез антибиотиков, УВЧ на область железы. При абсцессе показано вскрытие, а при рецидивах — удаление железы с последующим облучением этого участка УФ-лучами в субэритемных дозах. При вульвите и кольпите применяют теплые сидячие ванны с антисептиками, ежедневно в течение 15-20 мин вечером перед сном, спринцевание растворами калия перманганата (1:10000) или фурациллина (1:5000) 2 раза в день, седативные средства. В случаях хронического течения процесса показаны диатермия, УВЧ, грязевые аппликации. Локализованные воспалительные очаги (малые железы и лакуны преддверия влагалища) тушируют 2% раствором серебра нитрата или делают диатермокоагуляцию.

При местном лечении хламидийного вагинита у девочек хороший эффект дает ежедневное введение во влагалище с помощью мягкого катетера 5-8 мл 2-3% раствора димексида с тетрациклином (100000 ЕД/мл) или 3-5 мл 1-2% раствора хлорофиллипта. Курс лечения 8-10 дней. Применяют тепловые процедуры (парафин, озокерит, грязелечение) в сочетании с влагалищным или внутриматочным электрофорезом растворов калия йодида (2-5%), ихтиола (5%). Местное лечение хронического хламидийного эндоцервицита проводят аналогично таковому воспалительных процессов шейки матки другой инфекционной природы. Канал шейки матки, предварительно обработанный 10% раствором натрия гидрокарбоната для растворения слизистой пробки, смазывают 1-2% спиртовым раствором хлорофиллипта и тушируют 3-5% раствором димексида или 1% раствором серебра нитрата. Один раз в 2-3 дня назначают ванночки с 3% раствором хлорофиллипта. Курс лечения – 10-12 процедур. В хронической стадии заболевания с успехом применяют следующие физиотерапевтические процедуры: интравагинальный или интрацервикальный электрофорез цинка, меди или серебра, электрическое поле УВЧ, микроволновую терапию, бальнеоклиматогелиотерапию.

Местное лечение эрозии шейки матки обычно проводят после снятия острых проявлений воспалительного процесса в верхних отделах половых органов. При наличии свежей, не кровоточащей эрозии, применяют тампоны с облепиховым, вазелиновым маслом, хлорофиллиптом. Во время менструаций ванночки, смазывание и введение тампонов противопоказаны.

Большое значение имеют патогенетические методы лечения экстрагенитальных хламидиозов, которые способствуют активной мобилизации защитных, адаптационных, компенсаторных и восстановительных механизмов организма. В соответствии с локализацией этих форм инфекции и опытом врачей различных специальностей, проводящих лечение, в систему комплексной терапии вводят требуемые коррективы. Необходимо подчеркнуть, что в разработке оптимальных методов лечения урогенитальной и ассоциированной с ней хламидийной инфекции другой локализации должны принять участие заинтересованные специалисты различного профиля.

### 13.3. КОНТРОЛЬ ИЗЛЕЧЕННОСТИ

Критериями излеченности являются: исчезновение клинических симптомов заболевания, элиминация возбудителя. Излеченными считаются только те больные, у которых клиническое выздоровление сочетается с этиологическим излечением. Научно обосновано диспансерное наблюдение больных, которое проводится в течение 6 месяцев с полным клинико-лабораторным обследованием, и через 4-6 недель (при клиническом рецидиве – ранее) после завершения лечения, далее через 2-3 месяца. При оценке клинических показателей (в зависимости от локализации перенесенного заболевания) используют соответствующие инструментальные методы обследования (уретроскопию, кольпоскопию и др.). Лабораторное обследование реконвалесцентов предусматривает: исследование мочи, оценку лейкоцитарной реакции и цитологической картины соскобов доступной слизистой оболочки, установление наличия или отсутствия хламидий в мочеполовых органах с помощью различных методов, прежде всего молекулярно-биологических, основанных на амплификации нуклеиновых кислот.

Прогноз урогенитальных хламидийных поражений при раннем установлении этиологического диагноза, своевременном, адекватном лечении больных и половых партнеров – благоприятный. В случаях неадекватной терапии и восходящей хламидийной инфекции воз-



можно хроническое течение воспалительного процесса, рецидивы и развитие осложнений, нередко приводящих к нарушению половой функции, бесплодию, развитию реактивной спондилоартропатии.

### 13.4. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Антибактериальные химиопрепараты – тетрациклины, фторхинолоны, макролиды, используемые для лечения хламидийных инфекций, не являются специфическими относительно хламидий. Они имеют более или менее широкий спектр действия против патогенных и непатогенных бактерий, включая и представителей нормальной флоры. Узконаправленных антибиотиков против хламидий не существует, таких как спектиномицин, специально созданный компанией UPJOHN для гонококков, батумин, полученный в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины для лечения только стафилококковых инфекций (Скрипаль, 1997). К началу XXI века состояние генетики, молекулярной биологии и биоорганической химии подошло к теоретическому обоснованию и практической реализации целенаправленного воздействия на определенный возбудитель, что является прообразом будущей терапии инфекционных заболеваний (Uhlmann, Peuman, 1990; Bonfils et al., 1992; Stein, Cheng, 1993; Rapoport et al., 1996; Егоров и соавт, 1997; Скрипаль, 1997). Имеются два подхода к разработке и применению таких препаратов: блокирование экспрессии генов (препараты антигеннаправленного действия) и блокирование трансляции информационных РНК (антисмысловые препараты).

Препараты антигеннаправленного действия блокируют экспрессию соответствующих генов, которые кодируют важные для жизни данного микроорганизма продукты. Эти препараты представляют собой олигонуклеотиды, комплементарные определенным последовательностям на одной из нитей ДНК. Такие олигонуклеотиды могут блокировать экспрессию генов двумя путями. Они прикрепляются за счет Хугстеновских связей к двухцепочной спирали ДНК в комплементарном месте и образуют трехцепочную структуру ДНК – триплекс, блокируя тем самым процесс транскрипции. Олигонуклеотиды антигеннаправленного действия могут взаимодействовать за счет Уотсон-Криковских связей с комплементарными последовательностями на нетранскрибируемой нити ДНК во время прохождения по одной из нитей ДНК транскрибирующего комплекса, блокируя их транскрипцию или репликацию (Бабичев и соавт, 1993; Fox, 1991; Conkim et al., 1992; Скрипаль, 1997). Чтобы антигеннаправленные олигонуклеотиды были устойчивыми к действию ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая снимает с матрицы естественные олигонуклеотиды, их необходимо модифицировать, вводя в состав интеркалирующие, алкилирующие или другие группы, которые бы усиливали взаимодействие между матрицей и комплементарным ей олигонуклеотидом. Такая модификация приводит к тому, что олигонуклеотид может заблокировать не только процесс транскрипции, но и процесс репликации, вызвав этим прекращение размножения микроорганизма и его гибель. Недостатком всех модификаций, направленных на усиление прикрепления олигодезоксирибонуклеотидов к геномной ДНК, является то, что они значительно снижают их селективность относительно последовательностей-мишеней (Панченко и соавт., 1991; Бабичев и соавт, 1993; Скрипаль, 1997).

Антисмысловые олигодезоксирибонуклеотиды блокируют трансляцию информационной РНК (иРНК) на стадии синтеза белка. Они комплементарны последовательностям

иРНК, которые несут информацию о необходимых для жизни данного микроорганизма белках и взаимодействуют с ними за счет Уотсон-Криковских связей, блокируя их трансляцию на рибосомах. Модуляция системы трансляции с помощью таких антисмысловых олигонуклеотидов приводит к гибели микроорганизмов (Marcus-Sekwa, 1988; Коробочная и соавт., 1995; Skripal, 1995). Антисмысловая технология применения олигонуклеотидов имеет свои недостатки. В первую очередь, это сложности в выборе иРНК-мишени, которая должна быть уникальной и присущей лишь конкретному микроорганизму или их группе, но не другим микроорганизмам, а тем более она должна отсутствовать у человека. Недостатком также является необходимость высокой концентрации антисмысловых олигонуклеотидов, которая должна достигать 50 микромолей, чтобы стать губительной для микроба, а это уже является токсичным и для макроорганизма (Скрипаль, 1997). Тем не менее перспективным направлением является разработка antimicrobial средств, действие которых направлено на нуклеиновые кислоты, в частности на рибосомальные РНК (рРНК) отдельных возбудителей. Группа исследователей из Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под руководством академика И.Г. Скрипаля провела фундаментальные исследования по разработке новых антибактериальных препаратов узконаправленного действия по отношению к молликутам (микоплазмам) на основе антисигнатурных олигодезоксирибонуклеотидов (Скрипаль, 1997).

Так же, как и микоплазмы, хламидии являются суперпаразитами. Многие вещества, необходимые для их существования, они не способны синтезировать сами, в частности, предшественников нуклеиновых кислот. Необходимые для себя нуклеотиды хламидии получают из окружающей среды, которой для них является внутриклеточная среда человека, теплокровных и холоднокровных животных, а также простейших. Используя собственные ДНК-азы и РНК-азы и также ферменты клетки-хозяина, хламидии расщепляют нуклеиновые кислоты хозяев до нуклеотидов или до фрагментов определенной величины и активно их усваивают. Фрагменты ДНК и РНК, которые попали в хламидийную клетку, подлежат дальнейшей деградации нуклеазами до нуклеотидов, из которых синтезируются собственные нуклеиновые кислоты. Хламидии могут активно транспортировать в клетку небольшие фрагменты нуклеиновых кислот. В перспективе это позволит создать антихламидийные средства на основе синтетических нуклеиновых кислот с четко определенной мишенью. В качестве последней могут служить рибосомальные РНК (рРНК), которые в эволюционном отношении являются наиболее консервативными биологическими молекулами, но одновременно несут в себе отпечаток видоспецифичной или штаммоспецифичной индивидуальности в виде так называемых сигнатурных последовательностей. Эта своеобразность рРНК используется систематиками и молекулярными генетиками для изучения родственности и филогенетических связей между отдельными организмами и их группами, а также для их видовой идентификации с помощью так называемых рибосомальных зондов (см. раздел 2.1. Таксономия). Сигнатурные последовательности рРНК у разных микроорганизмов и их своеобразность могут служить мишенями для антисигнатурных последовательностей с целью сверхспецифичной antimicrobial терапии. Антисигнатурные олигонуклеотиды направлены против рибосомальных РНК – наиболее консервативных в эволюционном отношении биологических молекул, что исключает возможность развития устойчивости микроорганизмов к этим веществам. Антисигнатурные олигодезоксирибонуклеотиды, защищенные от действия нуклеаз интеркалирующими или другими вставками, остаются стабильными в организме человека на

протяжении длительного времени, достаточного для оказания антимикробного действия (Бабичев и соавт., 1993; Егоров, 1997; Панченко и соавт., 1991; Bonfils et al., 1992; Fathi et al., 1994; Skripal, et al., 1997; Stein, Cheng, 1993; Uhlmann, Peyman, 1990; Yarmoluket al., 1996).

Хламидии (в отличие от микоплазм) не способны активно поглощать синтетические олигонуклеотиды. Этому мешает их клеточная стенка. Данное препятствие может быть преодолено с помощью избирательного адсорбционного эндоцитоза, который обеспечивается соответствующими рецепторами на поверхности клеток. Используя высокую селективность рецепторов относительно своих лигандов, а также наличие в клетке специализированного механизма транспорта таких веществ, можно при модификации этими лигандами антисигнатурных олигонуклеотидов осуществлять активную доставку последних в клетку (Михайлов, 1989). Известно, что хламидии не способны синтезировать многие вещества, которые необходимы для их жизнедеятельности. Такие вещества можно использовать для доставки в хламидийную клетку антисигнатурных олигонуклеотидов. Если присоединить олигонуклеотид к такому веществу, то он сможет проникнуть внутрь клетки с помощью активного избирательного транспорта. Использование олигонуклеотидов, ковалентно присоединенных к лигандам рецепторов бактериальных клеток, является перспективным направлением создания терапевтических средств с принципиально новым механизмом действия (Скрипаль, 1997).

## ГЛАВА 14. ПРОФИЛАКТИКА

Методы специфической профилактики хламидийных инфекций (вакцины) пока не стали достоянием практического здравоохранения. Состояние научных исследований в этой области изложено в разделе 10. «Вакцины против хламидийных инфекций». Меры профилактики хламидийных инфекций основаны на организации борьбы с распространением, а также на медицинской, социально-экономической, семейной, социальной реабилитации больных хламидиозами. Для профилактической работы ключевое значение имеет диспансерный метод оказания помощи: строгий учет и диспансеризация больных, обследование половых партнеров и выявление источников заражения, обязательное привлечение половых партнеров к лечению не только по клиническим, но и по эпидемиологическим показаниям. Профилактические мероприятия должны предусматривать лечение больных и санацию носителей, а также меры индивидуальной защиты от заражения. Для проведения профилактики урогенитальных хламидиозов с учетом своеобразия их этиологии, патогенеза и эпидемиологии, вполне пригодны организационные формы, а также принципы общих и индивидуальных лечебно-профилактических мероприятий, применяющихся при других инфекциях, передающихся половым путем.

### 14.1. ОРГАНИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ С ХЛАМИДИЙНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Для борьбы с хламидиозами необходима четкая организация лечебных мероприятий и эффективная профилактическая система, охватывающая все профильные службы здравоохранения – венерологическую, акушерско-гинекологическую, урологическую, офтальмологическую, терапевтическую (Тайц и соавт., 2000). Следует ускорить практическое применение

новых научных достижений, усовершенствованных методов диагностики и лечения с использованием новых лекарственных средств, приборов, аппаратов, методов социально-психологической, медицинской, функциональной и профессиональной реабилитации. Медицинская помощь может быть оказана в виде: амбулаторного обследования и лечения; стационарного обследования и лечения с одновременной терапией других заболеваний; проведения противоэпидемических мероприятий, патронажа на дому и при необходимости – лечения в санаториях. С консультированием по поводу генитального хламидиоза тесно связаны вопросы регуляции рождаемости, планирования семьи (Проценко, 1998; Мавров, Тунда, 1999; Мерзляков и соавт., 1999; Бабюк и соавт., 2000; Калюжна, 2001; Козлюк, Квашенко, 2000; Маврова, 2001; Кубанова и соавт., 2001; Проценко и соавт., 2001; Курило, 2002).

Эффективность борьбы с хламидийными инфекциями зависит от объективной информации об общей распространенности, степени распространения в отдельных регионах и социальных группах населения. Необходимо изучение причин и факторов, которые способствуют возникновению и распространению хламидиозов, требуется максимальное выявление отдельных лиц и групп населения, подвергающихся повышенному риску заражения. В этом плане решающее значение имеет четко налаженная медицинская статистика. Наиболее важны следующие статистические показатели: заболеваемость – частота возникновения новых случаев хламидиоза за определенный период; уровень распространенности – число больных хламидиозом, имеющих на определенный момент. Полезным может быть сопоставление с заболеваемостью хламидиозом общих показателей здоровья населения, таких как материнская смертность, неонатальная и перинатальная смертность, смертность детей в возрасте до 1 года; рождаемость, фертильность – число деторождений у женщин репродуктивного возраста (от 15 до 44 лет). Сравнение этих показателей в разные периоды и в разных регионах позволяет оценить влияние хламидиоза на здоровье в данной популяции (Мавров, Тунда, 1999; Гарина, 1999).

Непрерывное и детальное изучение эпидемической ситуации на определенной территории или в определенном социуме дает возможность определить интенсивность эпидемического процесса, характеризующегося одновременным возникновением случаев хламидиоза, связанных с общим источником инфекции или путями его передачи, позволяет выявить очаги этого заболевания. Так, распространение хламидиозов, возникающих в результате половых контактов, может приводить к формированию цепи эпидемических очагов, возникающих последовательно один за другим. Концентрация внимания на изучении сексуальных отношений в определенной группе позволяет принимать меры воздействия на факторы, влияющие на развитие эпидемического процесса и способствующие его прекращению. Исходя из полученной информации, составляются программы, формируется политика, а также проводится реорганизация структур в системе здравоохранения (Bogatireva et al., 1998; Cates, Dallabetta, 1999; Скрипкин и соавт., 1999; Мавров, 2002; Бобрик, 2002).

Поскольку многие хламидийные инфекции затрагивают интимную, сексуальную сферу жизни индивидуума, то социальные и эмоциональные барьеры могут препятствовать притоку информации, важной для изучения эпидемиологии генитальных хламидиозов. Противоречия между требованиями общества и правами отдельных его членов порождают различные этические проблемы. Проведение эпидемиологического надзора, исследование эпидемических очагов, установление источников заражения предполагают соблюдение конфиденциальности, поскольку люди опасаются вторжения в их личную жизнь. В ряде случаев, из-за неоправданной стыдливости, пациенты не склонны обследоваться.



Поэтому в данной ситуации требуются деликатность и конфиденциальность, уважение достоинства человека и соблюдение его прав. Если необходимо специальное обследование, его можно производить только при добровольном согласии пациента (принцип информированного согласия) (Мавров, и соавт., 1996; Бернацкий и соавт., 1996; Хара, 1999; Лосева, 1999; Проценко, 1998).

В основе организации борьбы с распространением генитального хламидиоза лежит диспансерный метод, сутью которого является активное наблюдение за состоянием здоровья населения. В Украине, России и других странах СНГ существует единая система диспансеризации больных венерическими заболеваниями, ведения учетно-отчетной документации, что обеспечивает органы здравоохранения достоверными сведениями о заболеваемости, позволяет обоснованно планировать подготовку и распределение кадров, развертывание специальной медицинской сети, снабжение медикаментами (Должанский, 1998; Козлюк, Глухенький, 2001; Мавров и соавт., 2000). Диспансерная работа, выявление и привлечение к лечению источников заражения и половых партнеров, санитарно-просветительная работа и другие меры профилактики венерических болезней в полной мере относятся к хламидиозу, передаваемому половым путем (Мавров, 2002).

#### 14.1.1. Общественная профилактика генитального хламидиоза

Можно условно выделить три уровня общественной профилактики: первичная, направленная на устранение факторов риска и предупреждение заболевания; вторичная, имеющая целью раннее выявление и лечение заболевших для предотвращения прогрессирования болезни и ее дальнейшего распространения; третичная профилактика предполагает облегчение течения болезни и снижение уровня осложнений. Первичная профилактика осуществляется на государственном уровне, вне системы здравоохранения (Мавров, Тунда, 1999; Кубанова и соавт., 2001; Бобрик, 2002).

Задачи здравоохранения в области общественной профилактики генитального хламидиоза:

- выявление и учет больных;
- выявление источников заражения;
- обследование членов семьи больного и других лиц, находящихся с ним в контакте;
- бесплатное лечение;
- своевременное клиническое и лабораторное обследование больных, окончивших лечение;
- регулярное проведение профилактических осмотров работников декретированных профессий;
- санитарно-просветительная работа среди населения.

Организация диспансерных методов работы, методика обследования, перечень контингентов обследуемых, порядок приема больных в поликлиниках, госпитализация и выписка из стационара, учет работы и оформление медицинской документации, законодательные меры достаточно полно изложены в нормативных документах по организации борьбы с венерическими болезнями, в инструкциях по лечению и профилактике венерических заболеваний

и хорошо известны врачам лечебно-профилактических учреждений (Хара, 1998; Мавров и соавт., 2000). Учет больных и отчетность являются существенными элементами диспансерной работы по борьбе с хламидиозом. Правильно организованный учет дает возможность провести анализ заболеваемости, ее динамики и территориального распространения, полового, социального и профессионального состава больных. Данные учета и отчетности необходимы для определения качественных показателей работы кожно-венерологических учреждений. Они позволяют оценивать в конкретном цифровом выражении важнейшие разделы эпидемиологической, диагностической, лечебной, профилактической и организационно-методической работы. Обязателен учет каждого случая хламидиоза. Его достоверная регистрация служит показателем размеров распространения инфекции и основанием для принятия соответствующих мер. Наряду с сохранением основополагающих принципов диспансерной системы необходимо развивать другие организационные формы, направленные на максимальное сохранение тайны больного. Одной из реальных форм является создание системы анонимного обследования. При этом должна быть усилена ответственность за разглашение тайны больного (Radcliffe, Clarke, 1998; Mathews et al., 2002; Patel et al., 1994; Van de Laar et al., 1997; Мавров, 1996; Бернацкий, 1996; Хара, 1998; World Health Organization, 1999; Лосева, 1999).

В общей системе организационных мероприятий в борьбе с венерическими болезнями важен учет качественных показателей, которые позволили бы объективно оценивать эпидемиологическую и диспансерно-профилактическую работу при лечении хламидиоза. Наряду с анализом заболеваемости по качественным показателям особое значение имеет анализ данных о средних сроках, затрачиваемых на установление диагноза, об использовании коечного фонда, путях выявления больных хламидиозом, полноте и оперативности санации очагов инфекции, возникающих вокруг этих больных (Гарина, 1999; Мавров, Тунда, 1999).

При анализе путей выявления хламидиоза больных разделяют на две основные группы, каждая из которых состоит из нескольких подгрупп. Больные, выявленные среди самостоятельно обратившихся в лечебно-профилактические учреждения: (к дерматовенерологу; к врачам других специальностей – терапевту, хирургу, гинекологу, урологу, оториноларингологу, терапевту). Больные, выявленные активно при проведении диспансерных мероприятий в эпидемических очагах (при обследовании предполагаемых источников заражения и половых контактов; при различных видах профилактических обследований; при обследовании декретированных контингентов; массовых обследованиях различных групп населения; больных в соматических стационарах; беременных; направленных на аборт; доноров). Снижение удельного веса больных, активно выявленных при диспансерной работе, и повышение этого показателя при профилактическом обследовании населения свидетельствует о серьезных недостатках в выявлении источников заражения и половых контактов, а также в оперативной санации очагов инфекции (Мавров, Тунда, 1999; Козлюк, Глухенький, 2001).

При изучении путей выявления больных хламидиозом установлены следующие закономерности. Число самостоятельно обратившихся и выявленных активно среди всех больных, примерно одинаково. Однако среди мужчин преобладают лица, обратившиеся самостоятельно, а среди женщин – выявленные активно (по аналогии с гонореей). У мужчин заболевание несколько чаще, чем у женщин регистрируется как свежая форма, а у женщин – как хроническая. Среди женщин удельный вес выявленных в качестве источников заражения выше, чем среди мужчин (Волкославская, 1999; Мавров, 2002).

Низкий удельный вес активно выявленных при диспансерной работе следует оценивать как недостаток активного выявления источников заражения, а также о слабой работе по охвату профилактическим обследованием наиболее уязвимых контингентов. Это может быть связано также с низким качеством лабораторной диагностики хламидиоза. Среди женщин, больных хламидиозом, оптимальным следует считать примерно равное соотношение обратившихся самостоятельно и выявленных активно. При этом женщин, впервые обратившихся в гинекологические учреждения по поводу заболевания, диагностированного как хламидиоз, следует относить к числу самостоятельно обратившихся, а выявленных при обследовании беременных – к активно выявленным. Особого внимания требует снижение удельного веса лиц, самостоятельно обратившихся к венерологам, поскольку это может вызвать необходимость проведения дополнительных организационных мероприятий, направленных на расширение возможностей для беспрепятственного обращения больных к врачам этого профиля. Оценка деятельности кожно-венерологического учреждения по санации эпидемических очагов венерических заболеваний включает оценку полноты и оперативности выявления источников заражения, половых и бытовых контактов, а также аналогичную оценку привлечения к обследованию, а при необходимости – и лечения источников заражения и контактных лиц (Волкославская, 1999; Гарина, 1999; Хара, 1998; Мавров, Тунда, 1999).

При обнаружении половых контактов основным является умело построенный и целенаправленно проводимый опрос больного. Внимательное, чуткое отношение врача к больному должно создавать между ними атмосферу личного доверия. Беседа с больным всегда носит строго индивидуальный характер. Учитывают социальную и личностную характеристику больного, наблюдают за его поведением, внешним видом. При этом можно использовать следующую, в достаточной степени условную, классификацию личности больных (Кукигуров, 1998; Федоренко, 1995; Мавров, Тунда, 1999; Сырнева и соавт., 2001).

Лица аморально-паразитарного образа жизни, без определенных занятий. У этой категории больных отсутствуют основные понятия о морально-этических нормах. Для них характерны непризнание правовых норм поведения (наличие в прошлом судимостей), беспорядочная половая жизнь, злоупотребление алкоголем, наркотиками, безразличное отношение к своему заболеванию, злостное уклонение от лечения. Среди указанной группы нередко встречаются лица, отличающиеся повышенной сексуальностью. Многие из них неоднократно болели венерическими заболеваниями, имели многочисленные случайные половые контакты, которые не всегда могут назвать.

Лица аморального поведения. У них есть постоянное место жительства, работа, нет судебно-правовых конфликтов с обществом, они знают об общепринятых нормах поведения, однако не имеют твердых нравственных принципов и убеждений. Им присущи беспорядочная половая жизнь, злоупотребление алкоголем. Обычно они знают свои половые контакты, но нередко в состоянии алкогольного опьянения вступают в половые сношения со случайными лицами.

Лица с повышенной сексуальностью. Хорошо понимают нравственные требования общества, но не всегда выполняют их. Нередко имеют семью, но вступают в многочисленные внебрачные связи. Обычно осторожны в выборе своих партнеров, хорошо их знают.

Проститутки – лица без нравственных принципов и устоев, торгующие своим телом. Обеспеченность не отвращает их от легкого образа жизни, асоциального полового поведения.

Наркоманы – лица, злоупотребляющие наркотическими средствами. У них нарушается активное внимание, расстраивается мышление (становится непоследовательным, образным, чувственным). Изменяются мотивы и побуждения, снижается способность моторной реализации психических импульсов.

Гомосексуалисты – лица, имеющие нетрадиционное половое влечение к представителям своего пола. Встречаются как среди мужчин, так и среди женщин. Для некоторых гомосексуалистов характерна крайняя неразборчивость в выборе своих половых партнеров. Развращенность, беспорядочная половая жизнь, которую обычно ведут гомосексуалисты, являются причинами того, что они нередко инфицируются и становятся источником распространения болезней, передающихся половым путем.

Лица, заразившиеся случайно. Воспитаны на убеждениях, требующих соблюдения моральных норм, обладают нравственными принципами. Однако при определенных обстоятельствах (командировки, пребывание на курорте, алкогольное опьянение и пр.) однократно нарушили их, допустив случайные половые связи.

Пострадавшие лица – заразившиеся от супруга (супруги) или сожителя (сожительницы).

При санации очагов инфекции необходимо учитывать, что не всегда у привлеченных к обследованию лиц можно обнаружить возбудитель заболевания. Учитывая это, лица, заведомо (повторно) являющиеся источниками заражения (при заболевании одного из партнеров), подлежат соответствующему лечению, даже если у них возбудитель инфекции обнаружить не удается.

Эпидемиологический анализ осуществляется постоянно, с использованием возможностей компьютерной техники. Он определяет заболеваемость – количество зарегистрированных больных в той или иной группе населения за определенный период времени. Однако ориентация на заболеваемость как на отправную точку при осуществлении надзора бесперспективна. На заболеваемость влияют распространенность и частота случаев инфекции. Распространенность – общее число больных, нуждающихся в лечении в данный момент на определенной территории. Частота включает в себя два понятия: 1) истинную частоту – действительное число больных в области, районе, городе, определенной местности; 2) частоту регистрации – число выявленных больных, поставленных на учет в медицинских учреждениях. Разность между частотой истинной и частотой регистрации заболевших хламидиозом может быть значительной (Мавров, Тунда 1999; Maupaud, McCormick, 2001). Поэтому надзор, нацеленный только на болезнь, заведомо запаздывает и в принципе не может быть успешным, так как не реализуется его важнейшая упреждающая, профилактическая функция. Фактически надзор за заболеваемостью направлен не на причину, а на следствие. Исходя из этого, оперативный анализ складывающейся эпидемиологической ситуации подразумевает не только сбор и обработку информации, но также и аналитическую деятельность специалистов с учетом миграции населения, факторов риска, анализа заболеваемости в различных возрастных или социально-профессиональных группах (рис. 14.1 и 14.2). Здесь важно лабораторное обеспечение эпиднадзора с привлечением новых чувствительных и специфичных методов исследований. Необходим также ретроспективный анализ заболеваемости (год, полугодие). При помощи ретроспективного эпидемиологического анализа можно выявлять факторы социальной среды, которые влияют на заболеваемость в различных группах населения, оценивать эффективность проводимых профилактических и противоэпидемиологических мероприятий, составлять прогноз заболеваемости (Мавров, 2002).



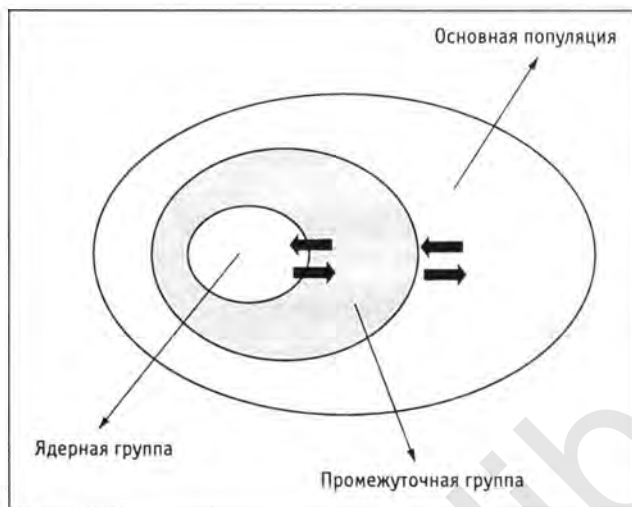


Рисунок 14.1. «Популяционная» модель распространения инфекций, передающихся половым путем (Cates W., Dallabetta G, 1999)

Статистические данные дают заболеваемость на 100000 населения. Однако эпидемиологические исследования показывают, что распространенность хламидиоза в популяции распределена неравномерно. Четко выделяется ядерная группа (группа повышенного риска) – незначительная часть населения с высоким распространением заболевания, которая играет ведущую роль в динамике эпидемического процесса (проститутки, наркоманы и т.д.). Далее идет промежуточная группа, в которой заболеваемость относительно высока. Это относительно благополучные в социальном плане слои населения, которые, в силу тех или иных причин, могут иметь связи с представителями ядерных групп (например, бизнесмены, которые пользуются услугами проституток). И, наконец, основная популяция, где заболевание распространено относительно меньше. Наряду с общими закономерностями, в каждой группе эпидемический процесс протекает со своими особенностями, которые могут быть «потеряны» при анализе заболеваемости в целом в общей популяции.

Службы здравоохранения смогут охватить лишь небольшую часть заразившихся хламидиозом, если не проводить активного выявления и скрининга групп риска или всего населения.

При проведении оперативного и ретроспективного анализа заболеваемости большой интерес представляют очаги, одновременно возникшие на разных территориальных участках, а также множественные очаги с одновременно возникшими в них случаями заболевания и носительства, т. е. очаги, где не менее двух больных или носителей болезни появилось в пределах максимального инкубационного периода. Анализируют заболеваемость в зависимости от вида возбудителя, его биохимических свойств, клинической формы и тяжести течения заболевания, что помогает ориентироваться в отношении возможных источников инфекции и путей передачи. Ежемесячно ситуация подвергается детальному разбору на производственных совещаниях у главного врача кожно-венерологического диспансера, где принимаются определенные решения, касающиеся перечня и объема профилактических и лечебных противоэпидемических мероприятий с учетом материального обеспечения для



в стационаре (определяется продолжительность диагностического и лечебного периодов согласно стандартам оказания дерматовенерологической помощи (Мавров, 2000)). Важным в деятельности кожно-венерологических лечебных учреждений является своевременное и полное лечение больных хламидиозом в строгом соответствии с инструкциями. Если по тем или иным показаниям приходится отступать от инструкции, в истории болезни следует обосновать изменение терапевтической тактики.

Активное диспансерное наблюдение за каждым больным хламидиозом, за своевременностью его лечения с последующим контролем – важный раздел диспансерной работы. Больных после окончания лечения переводят под наблюдение врача амбулатории диспансера сроком от 2 до 6 месяцев, в зависимости от формы заболевания, после чего лиц, получивших полноценную терапию, при благоприятных результатах комплексного клинико-лабораторного обследования снимают с учета. Врач диспансера (кабинета), ответственный за прием больных хламидиозом, должен иметь четкие данные обо всех больных, находившихся на лечении (активный учет) и переведенных под контрольное наблюдение. На больных хламидиозом, проживающих в районе обслуживания диспансера и получающих лечение, заполняют контрольную карту диспансерного наблюдения (форма 030/у), которую хранят в специальной картотеке. В ней содержатся полные сведения (диагноз, данные об источнике заражения и контактах, о регулярности явки пациента в диспансер по назначению лечащего врача).

Акушеры-гинекологи должны проводить активную работу по выявлению и лечению больных хламидиозом. Обследованию на хламидиоз подвергаются беременные, страдающие воспалительными заболеваниями половых органов, женщины с первичным и вторичным бесплодием, а также направляемые на аборт. При обнаружении у обследуемых хламидиоза лечение проводят акушеры-гинекологи в соответствии с методиками, утвержденными МЗ Украины (2001) (см. раздел 13. Лечение хламидийных инфекций). Сведения о выявленных больных хламидиозом женщинах (форма 089/у), источниках их заражения, половых контактах, сообщают в районные дерматовенерологические учреждения по месту жительства больных для привлечения их к обследованию и лечению.

Профилактическое медицинское обследование отдельных контингентов населения. Работники пищеблоков и молочных кухонь при поступлении на работу подлежат осмотру дерматовенерологом с проведением лабораторных исследований на генитальный хламидиоз, как они обследуются на сифилис и гонорею. В дальнейшем их осматривает дерматовенеролог 1 раз в квартал, а соответствующие лабораторные исследования проводят по медицинским показаниям. Работники детских учреждений (ясли, сады, ясли-сады, дома ребенка, детские дома, школы-интернаты, летние оздоровительные учреждения, лесные школы, детские санатории и др.), связанные непосредственно с обслуживанием и питанием детей, при поступлении на работу подлежат осмотру дерматовенерологом с проведением лабораторных исследований на хламидиоз. В дальнейшем осмотр венерологом, исследование крови на сифилис и отделяемого на гонококк производят 1 раз в квартал. Работники детских больниц, детских отделений больниц и родильных домов, связанные непосредственно с обслуживанием и питанием детей, при поступлении на работу подлежат осмотру венерологом с проведением лабораторных исследований на наличие хламидий. Далее осмотр проводится 1 раз в 6 месяцев, а соответствующие лабораторные исследования – по медицинским показаниям.

Педагоги и воспитатели школ-интернатов, детских домов, лесных школ и других учебно-воспитательных учреждений с круглосуточным пребыванием в них детей подлежат осмотру венерологом с проведением лабораторных исследований на хламидии при поступлении на работу и в дальнейшем – 1 раз в квартал. Работники предприятий по санитарно-гигиеническому обслуживанию населения (банщицы, педикюрши, маникюрши, парикмахеры, косметологи, работники прачечных, бельевых) при поступлении на работу подлежат осмотру венерологом, им проводят лабораторное исследование отделяемого половых органов на хламидии. В дальнейшем венеролог осматривает их 1 раз в 6 мес. Лабораторные исследования проводят по медицинским показаниям. Горничные, уборщицы, заведующие этажами гостиниц и общежитий, работники плавательных, спортивных и гигиенических бассейнов и спортивных залов, проводники пассажирских поездов дальнего следования, бортпроводники пассажирских авиалиний при поступлении на работу подлежат осмотру венерологом, лабораторному исследованию на хламидиоз. В дальнейшем осмотр венеролога проводится 1 раз в квартал, лабораторные исследования – по медицинским показаниям. Водители такси, автомашин, выполняющие междугородные перевозки, при поступлении на работу подлежат осмотру венерологом и лабораторным исследованиям на хламидиоз. В дальнейшем осмотр венерологом проводится 1 раз в квартал, лабораторное обследование – по медицинским показаниям.

Эффективность выявления хламидиоза среди перечисленных групп населения во многом зависит от правильной системы организации этой работы. Опыт свидетельствует о целесообразности создания централизованных медицинских хозрасчетных профилактических поликлиник, укомплектованных квалифицированными врачебными кадрами. Контроль за их работой осуществляют кожно-венерологический диспансер и санитарно-эпидемиологическая станция. При этом обращают внимание на наличие списков лиц, подлежащих медосмотру, и регулярность их представления, наличие графика прохождения медосмотра, оперативность информации о лицах, не прошедших медосмотр, наличие карт лиц, подлежащих периодическим осмотрам, медицинских карт амбулаторного больного (форма 025/у), порядок их хранения и качество ведения. При профилактике хламидиоза большое значение имеет клиничко-лабораторное обследование лиц без определенного места жительства, нигде не работающих, ведущих аморальный образ жизни, гомосексуалистов, лиц, помещенных в медицинский вытрезвитель, находящихся в специальных приемниках-распределителях.

В комплексе мероприятий по профилактике хламидиоза видное место занимает санитарно-просветительная работа, являющаяся обязательной частью деятельности кожно-венерологического диспансера и служебной функцией всего медицинского персонала этого учреждения. Основная задача кожно-венерологического диспансера в области санитарного просвещения заключается в ознакомлении широких кругов населения, а также посетителей диспансера с путями распространения хламидиоза, его проявлениями и последствиями; с мерами личной и общественной профилактики; с необходимостью своевременного обращения заболевшего к врачу, со значением полноценного лечения и недопустимости самолечения. Особое внимание необходимо уделить санитарному просвещению молодежи. Важно, чтобы молодежь основные сведения о гигиене пола, взаимоотношениях полов получала от врачей и педагогов, а не из сомнительных источников. С этой целью для юношей и девушек (раздельно) в старших классах общеобразовательной школы, техникумах, высших учебных заведениях врачи должны читать лекции, посвященные медицинским аспектам данной проблемы, а педагоги, психологи – нравственным и воспитательным аспектам (Козлюк, Глухенький, 2001; Крячкова и соавт., 2001; Кравченко, Степаненко, 2002).



### 14.1.2. Индивидуальная профилактика хламидиоза

Первичная и вторичная профилактика не исключают, а дополняют друг друга, поскольку индивидуум находится в определенной социальной среде, а любые организационные мероприятия замыкаются на конкретном человеке. Индивидуальную профилактику хламидиоза проводят в соответствии с общепринятыми методами, применяемыми на пунктах личной противовенерической профилактики (Кравченко, Степаненко, 2002).

Внебрачные сексуальные связи, случайная половая встреча всегда опасны, особенно, если половое сношение произошло в состоянии опьянения (как это часто бывает), ибо алкоголь повышает половое возбуждение и в то же время снижает бдительность. Поэтому после полового сношения со случайным партнером рекомендуется обратиться к врачу за советом и для профилактического осмотра.

Существует ряд мер предосторожности, которые уменьшают вероятность заражения. Прежде всего, перед половым сношением нужно тщательно вымыть половые органы и не вступать в половой контакт, если на них замечены какие-либо ссадины, царапины, трещины и т.п. Женщины, помимо обычного туалета наружных половых органов, должны спринцевать влагалище теплой водой или слабым раствором борной кислоты (1–2 чайные ложки на 3 стакана воды). Половой член и мошонку перед половым сношением смазывают каким-либо веществом, содержащим жир, лучше всего вазелином. Сразу же после полового контакта желательно помочиться, стараясь выпустить мочу сильной струей и основательно вымыть половые органы (женщины, кроме того, должны спринцеваться).

Презервативы являются основным средством индивидуальной профилактики. Современные латексные кондомы являются абсолютно непроницаемыми для хламидий (Lytle, 1997, 1999). Многочисленные исследования подтвердили эффективность кондомов для предотвращения заражения вирусными и бактериальными инфекциями, включая и хламидиоз (Zenilman et al., 1995; Crosby, 1998; Crosby et al., 2002). Для проведения личной профилактики необходима информация о правильном применении презервативов. Презервативы необходимо хранить в прохладном, темном месте, избегать попадания на них солнечных лучей. Надевать презерватив нужно до начала какого-либо генитального сношения во избежание контакта с отделяемым, в котором могут быть возбудители инфекции. Для смазывания презервативов должны использоваться только водные кремы. Презерватив следует надевать аккуратно (чтобы предотвратить разрыв) следующим образом: взять за кончик и натягивать на половой член (в состоянии эрекции), оставляя пространство для якулята и следя, чтобы там не оставалось много воздуха. Использование презервативов, содержащих сперматоцидные вещества, обеспечивает лучшую защиту от инфицирования. Еще больший эффект достигается при введении сперматоцидов во влагалище. После эякуляции необходимо соблюдать осторожность, чтобы презерватив не соскользнул до извлечения полового члена из влагалища. Извлекать половой член следует еще в состоянии эрекции, поддерживая презерватив у основания (Crosby, Yarber, 2001; Мавров, 1999; Мавров, 2002). Женский презерватив был разработан в 1980-х и появился на рынке в 1996 году. Это контрацептивное устройство используется женщинами для защиты от нежелательной беременности и ИППП, включая ВИЧ-инфекцию. Исследования показали, что эффективность женских презервативов так же высока, как и других барьерных методов контрацепции. Показано, что он эффективен для предупреждения заражения ИППП, включая хламидиоз, *in vitro*, однако имеются ограниченные данные о его эффективности *in vivo*.

Не выявлено никаких серьезных местных побочных эффектов или аллергических реакций, и женский презерватив может использоваться со спермацидами, смазками и пенами любого типа (Reseau, 1997).

Индивидуальная профилактическая обработка эффективна в том случае, если она проводится в ближайшие часы после сексуального контакта. Личная профилактика может быть осуществлена как на пунктах индивидуальной профилактики (работающих круглосуточно), так и самостоятельно лицом, подвергшимся опасности заражения венерической болезнью в результате случайной половой связи. В последнем случае аутопрофилактика производится с помощью индивидуальных портативных (карманных) профилактических средств в соответствии с прилагаемой к ним инструкцией (Кравченко, Степененко, 2002).

Профилактическая помощь на пунктах индивидуальной профилактики должна оказываться круглосуточно и безотказно. Профилактические мероприятия по предупреждению болезней, передающихся половым путем, могут быть проведены также повсеместно и круглосуточно в кожно-венерологических диспансерах, имеющих стационар, силами среднего медицинского персонала (Мавров, 2002).

#### Методика оказания профилактической помощи мужчинам.

1. Посетитель выпускает мочу и моет руки водой с мылом.
2. Половой член, мошонку, лобок, бедра, промежность тщательно обмывают теплой водой с мылом.
3. После обсушивания салфеткой те же места тщательно протирают ватным тампоном, пропитанным раствором (1:1000) ртути дихлорида (сулемы) или 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата (гибитана).
4. Производят промывание передней части уретры раствором (1:6000) калия перманганата или 0,05% раствором гибитана, пропуская при этом не менее 0,5 л промывной жидкости.
5. В уретру с помощью глазной пипетки вводят 6-8 капель 2-3% водного раствора протаргола или 1-2 мл 0,05% гибитана и зажимают на 2-3 мин наружное отверстие уретры. После выпуска раствора рекомендуют не мочиться в течение 2-3 ч.
6. Посетителю выдают марлевую салфетку для защиты половых органов от загрязненного белья, которое при первой же возможности рекомендуется сменить.

Для аутопрофилактики у мужчин применяют гибитан в соответствии с пунктами 1, 2, 3, 5.

#### Методика оказания профилактической помощи женщинам.

1. Посетительница выпускает мочу и моет руки водой с мылом.
2. Половые органы, лобок, промежность, бедра тщательно обмывают теплой водой с мылом.
3. После обсушивания салфеткой те же места тщательно обмывают ватным тампоном, пропитанным раствором (1:1000) ртути дихлорида (сулемы) или 0,05% раствором хлоргексидина биглюконата (гибитана).
4. Производят спринцевание влагалища раствором калия перманганата (1:6000) или 0,05% раствором гибитана, для чего используют 150-200 мл жидкости.

5. По окончании спринцевания в уретру вводят с помощью глазной пипетки 8-10 капель 1-2% раствора серебра нитрата. Через зеркало Куско этим же раствором протирают влагалище и влагалищную часть шейки матки, а по удалении зеркала – преддверие влагалища (обращая особое внимание на крипты и парауретральные протоки).
6. Посетительнице выдают марлевую салфетку для защиты половых органов от загрязненного белья, которое затем рекомендуется сменить.

Аутопрофилактику женщины проводят в соответствии с пунктами 1-4, применяя гибитан; затем в уретру вводят 1-5 мл 0,05% раствора гибитана.

Указанные меры предохранения от заражения урогенитальным хламидиозом не всегда на 100% эффективны, однако в большинстве случаев они могут существенно снизить вероятность возникновения заболевания.

### 14.1.3. Профилактика хламидиоза среди несовершеннолетних

Молодые люди особенно уязвимы в отношении негативных последствий инфекций, передаваемых половым путем (Cowan, 2002). Это связано с рядом биологических, психологических и поведенческих особенностей детей и подростков – перестройкой гормонального фона, анатомо-физиологических особенностей половых органов, незнанием симптомов ИППП, незрелостью иммунной системы, употреблением алкоголя и наркотиков, принятием нравственных устоев общества (Крячкова и соавт., 2001). В молодежной среде такие факторы как бедность, миграция, нарушение социальных связей особенно способствуют распространению ИППП и, в частности, хламидиоза (Holmes, 1994; Маврова, Ткачук, 1996; Маврова и соавт., 2002). В то же время имеются данные, что просветительная профилактическая работа по предотвращению возникновения и распространения ИППП среди подростков может быть эффективной, поскольку у них пока не установились стереотипы рискованного полового поведения. Важно, чтобы подростки осознали опасность половых инфекций до начала половой жизни (Kirby, et al. 1994). Хотя все согласны с необходимостью полового воспитания детей и подростков, среди врачей, педагогов и психологов нет единого мнения о характере такого воспитания – с какого возраста начинать, как часто проводить занятия, и насколько глубокой и откровенной должна быть информация. Определенная группа специалистов считает, что чрезмерное фиксирование внимания детей на вопросах пола порождает раннюю сексуальность и способствует экспериментированию (Халемин и соавт., 2001; UNAIDS, 1997; Grunseit, 1997; Oakley, et al. 1995; Lewis, Knijp, 2001; Кубанова и соавт., 2001; Кунгуров и соавт., 2001). Grunseit (1997), проанализировав 69 образовательных программ в области сексуального здоровья в разных странах, пришла к выводу, что половое воспитание не вызывает увеличения сексуальной активности. Программы позволяют отдалить момент начала половой жизни, защитить сексуально-активную молодежь от ИППП, включая ВИЧ-инфекцию, и от беременности. Кроме того, программы полового воспитания дают возможность научиться ответственному и безопасному поведению.

Образование в области сексуального здоровья следует проводить до начала половой жизни. Половое воспитание должно быть по-разному ориентировано на мальчиков и девочек, следует применять различные программы и методы. Модели полового воспитания должны быть индивидуализированы, учитывать принадлежность к социальной группе и восприятие

моральных принципов. В одних случаях необходимо проповедовать воздержание и отказ от половой жизни вне брака, в других – фиксировать внимание на способах безопасного секса, использовании презервативов и методов индивидуальной профилактики. (Mullen et al., 2002; Oakley, et al. 1995). Формальное знание и понимание риска ИППП еще не означает, что половое поведение человека изменится. В особенности это относится к подросткам с их незрелой психикой. Социологические исследования юношеской сексуальности показывают значительную роль опыта и обучения, культурологической среды и традиций. Причем, имеются значительные различия в формировании сексуальных представлений у мальчиков и девочек (Прохоренков и соавт., 1996; King, Wright, 1993; Wight et al., 1998; Bandura, 1992). Весьма эффективным методом является моделирование типичных ситуаций с учетом особенностей макросоциальной среды, чтобы подростки могли научиться принимать оптимальное решение в каждом случае (Fisher, Fisher, 1992; Кравец, Лосева, 2001; Кунгуров и соавт., 2001). Единственный эффективней способ полового воспитания, позволяющий охватить большинство подростков, это включение его в обязательную программу школ и других учебных заведений. Для этого надо специально готовить педагогов и воспитателей. Другой эффективный путь – использование средств массовой информации – прежде всего, телевидения (Yzer et al., 2000; Анон, 2000; Кубанова и соавт., 2001; Проценко, 1998). В университетах с целью формирования у студентов навыков самовоспитания и самосознания по сохранению и укреплению здоровья рекомендовано создание кафедр валеологии для обучения студентов немедицинских специальностей. Кроме изучения основных функций человеческого организма и условий для его оптимального развития, в учебную программу включены вопросы полового и сексуального развития и воспитания в семье и в обществе. Значительная часть времени уделяется знакомству с заболеваниями, передаваемыми половым путем, влиянию их на здоровье вообще и на репродуктивную функцию в частности, информации о противозачаточных средствах (Архипова, и соавт., 1998).

Научная оценка эффективности программ полового воспитания для предотвращения ИППП затруднена из-за отсутствия объективных методов изучения полового поведения, поскольку большинство методов основано на расспросе и анкетировании и имеет элемент субъективизма. Основными количественными критериями действенности программ профилактики является статистика заболеваемости и аборт (Aral, Peterman, 1996; Peterman et al., 2000). Изучение полового поведения позволяет понять степень распространенности рискованного поведения в популяции и определить места приложения программ профилактики ИППП и общих социальных программ. Для этого необходимо разработать методы формализации полового поведения, которые можно было бы анализировать математически (McGarrigle et al., 2002).

По данным Центрального научно-исследовательского кожно-венерологического института МЗ Российской Федерации, за последние 20 лет XX века в России характеристики полового поведения заметно изменились. Начало половой жизни сместилось на более ранний возраст, увеличилось число добрачных партнеров. Интенсифицировалась внебрачная половая жизнь, в особенности у женщин. Увеличилось общее число партнеров у лиц, не состоящих в браке. Значительно большее распространение, чем раньше, получил анальный и оральный секс. Подобное свободное сексуальное поведение является рискованным в отношении заражения ИППП (Кунгуров и соавт., 1998; Кравченко, и соавт., 1999; Кубанова и соавт., 2001).



Необходимо изучать половое поведение как в популяции в целом, так и в отдельных группах людей. Изучение полового поведения в определенных популяциях предполагает систематический сбор, анализ и интерпретацию информации, связанной с сексуальной жизнью людей. Эти данные должны быть доступны органам, определяющим политику в области здравоохранения. Особое значение имеет определение размера и характера групп риска, подразделение их по возрасту, полу, сексуальной ориентации и этнической принадлежности. Важно динамическое наблюдение за такими показателями, как число половых контактов, тип половых сношений, степень использования презервативов и лекарственных средств индивидуальной профилактики. Эти данные необходимо постоянно сопоставлять с заболеваемостью в данных популяционных группах (UNAIDS/WHO, 2000; Fenton et al., 2001). В последние годы предложены новые подходы к изучению полового поведения в популяции с помощью анализа пользователей Интернетом, посещающих определенные веб-узлы, хотя репрезентативность таких опросов может быть недостаточной (Rosset al., 2000; Elford al., 2001). Метод «outreach» – это работа с группами повышенного риска в их микросоциальной среде (проститутки, гомосексуалисты, наркоманы). В этом случае профилактические образовательные программы и медицинское обслуживание адаптированы и приближены к условиям среды. Общение с сообществом не допускает доминирующей роли одной из сторон и происходит «на равных» в условиях строгой конфиденциальности (Кубанова, Лосева, 2000; Лосева и соавт., 1999; 2001). Программы воздействия на уровне сообщества обладают большим потенциалом и доказали свою эффективность в профилактике ИППП среди разных целевых групп: гомосексуалисты, «секс-работники», подростки из бедных кварталов, водители, солдаты, учащиеся и студенты. При их осуществлении используются различные методологии (Бобрик, 2002):

- Использование формальных и неформальных лидеров;
- Обучение равных равными – привлечение представителей целевой группы;
- Специальные рекламные акции – раздача презервативов, футболок, информационные акции на дискотеках и в барах, видеоролики перед началом киносеанса, листовки, буклеты, оформление стен в туалетах клубов;
- Должным образом организованное половое воспитание в учебных заведениях;
- Программы в средствах массовой информации;
- Социальный маркетинг – использование рыночных технологий, например, для целевого продвижения презервативов и увеличения их доступности.

Сегодня хламидийная инфекция значительно распространена не только у взрослых, но и у детей. Особого внимания заслуживают хламидиозы у беременных женщин и детей различного возраста. В частности, хламидийная инфекция в период беременности повышает риск перинатальной смертности новорожденных детей, инфицирование новорожденных при родах и развитие тяжелых заболеваний у детей. Оптимальные организационные формы и методы диагностики, лечения и профилактики хламидийной инфекции нуждаются в совершенствовании. Рост урогенитального хламидиоза среди детей и подростков обусловлен целым рядом медицинских, социальных и личностных факторов (Крючкова и соавт., 2001). К большому сожалению, следует подчеркнуть, что в акушерско-гинекологических, урологических, а в ряде случаев и кожно-венерологических учреждениях не проводится эпидемиологический

надзор за больными, не подвергаются направленному лечению сексуальные контакты, что способствует распространению инфекции (Черданцева и соавт., 1999; Малова, 2001; Маврова, 2002; Комов, 2001).

Широкое распространение хламидийной урогенитальной инфекции на фоне резких социально-экономических перемен, произошедших в обществе за последние годы, остро ставит вопросы эпидемиологического контроля и профилактики ЗППП. В сложившейся ситуации имеются недостатки: отсутствует координация программ здравоохранения в области сексуального здоровья и профилактики ИППП; ограничены ресурсы медицинских служб; стремительно увеличивается число случаев предоставления внебольничной лечебной помощи специалистами и неспециалистами, а также случаи самолечения. Имеются существенные пробелы в сексуальном воспитании, назрела необходимость новых инициатив в пропаганде здорового образа жизни и сексуального здоровья; отсутствует система взаимодействия дерматовенерологов, акушеров-гинекологов, педиатров, центров планирования семьи по организации диагностики, лечения, реабилитации и профилактики ИППП, особенно среди детей и подростков (Лузан, Давыдова, 2001; Комов, 2001; Кравец, Лосева, 2001; Курило, 2002). Дети и подростки с хламидийной инфекцией требуют пристального внимания, специального лабораторного и эпидемиологического обследования с целью выяснения причин заболевания, наличия возможных очагов инфекции у членов семьи, других факторов, способствующих инфицированию ребенка. При разработке мероприятий по лечению и профилактике хламидийной инфекции у несовершеннолетних необходимо учитывать, что хламидии способны поражать эпителий препубертатного влагалища, еще не подверженного влиянию эстрогенов и вызывать истинные вагиниты у детей. Поэтому целесообразно проводить обследование на наличие хламидийной инфекции детей из семей, где у родителей выявлен мочеполовой хламидиоз (Мерзляков и соавт., 1999; Маврова и соавт., 2002).

Симптомы хламидиоза у детей различного возраста разделяются на две основные группы: обусловленные воспалением в мочеполовых органах и расстройство функций глаз, суставов, дыхательной и нервной системы. При диагностике хламидийной инфекции у детей ограничиваться только одним методом нельзя. Монодиагностика неизбежно приводит как к гипердиагностике, так и к гиподиагностике. Поэтому для диагностики хламидиоза следует использовать не отдельные лабораторные тесты, а их комплексы. При этом важно учитывать фазы овуляторного менструального цикла у девушек-подростков. Для цитологических методов исследования особое значение имеет забор клеточного материала в лютеиновой фазе менструаций, а забор крови для серологических исследований – в начале менструации (Маврова, 2001). Профилактика хламидиоза детского и подросткового возраста включает несколько направлений: устранение факторов риска и предупреждение инфицирования; раннее выявление и лечение заболевших; информация и обучение. Внутриутробное инфицирование плода хламидиями и развитие хламидийных поражений легких и других органов обуславливает организацию обследования беременных женщин на наличие хламидийной инфекции и проведение профилактики неонатальных хламидийных поражений.

#### 14.1.4. Реабилитация больных генитальным хламидиозом

Под реабилитацией больных хламидиозом подразумевается комплекс медицинских, социальных, педагогических и других мероприятий, направленных на восстановление или компенсацию нарушений мочеполовых органов, а также социальных функций и трудоспособности больных.

Реабилитационные мероприятия проводятся при всех формах хламидиоза. При этом важными являются: как можно более раннее начало (с момента установления диагноза), непрерывность, комплексный характер, индивидуальный подход. Реабилитационные мероприятия следует проводить как во время лечения, так и на протяжении всего периода наблюдения за больным.

Реабилитация больных с заболеваниями мочеполовых органов представляет собой сравнительно новое направление в медицине. Различают медицинскую, социально-экономическую, социально-психологическую, функциональную, семейную и сексуальную реабилитацию больных этого профиля (Подшивалов, Коломиец, 1999). Все типы реабилитации тесно взаимосвязаны и являются неотъемлемым компонентом комплексного лечения. Существует несколько этапов реабилитации после установления диагноза. Во время обследования выявляют отягощающие факторы, которые могут способствовать развитию осложнений и функциональных нарушений. Проводится параллельное лечение сопутствующих заболеваний, обнаруженных при диагностике хламидиоза, а также социально-психологическая реабилитация. С больными проводят беседы, разъясняют характер и объем предполагаемого лечения, возможные последствия. Психологическая реабилитация в ряде случаев осуществляется с привлечением психоневролога или психолога. Программа медицинской реабилитации в период пребывания больного в стационаре составляется в соответствии с характером заболевания и предполагаемого лечения. Дифференциальный подход к выбору метода терапии, адекватного особенностям патологического процесса, позволяет осуществить щадящую терапию и избежать осложнений, вызывающих функциональные нарушения.

Восстановление репродуктивной функции имеет важное психологическое и социальное значение и обеспечивает полную медицинскую и социальную реабилитацию больных с первичным и вторичным бесплодием. Значительную группу нуждающихся в реабилитации составляют больные с хроническими воспалительными заболеваниями половых органов. Своевременное лечение при остром и подостром свежем воспалительном процессе способствует полному восстановлению трудоспособности, профилактике хронических процессов, бесплодия. Понятие «воспалительные заболевания половых органов» включает в себя множество болезней, отличающихся как этиопатогенетически, так и по клиническому течению. Общей их чертой является продолжительное течение, часто они быстро переходят в хроническую форму с периодами ремиссий и обострений. Нередко больные подвергаются оперативному вмешательству по поводу воспалительных заболеваний гениталий, что может сопровождаться негативными последствиями, например, потерей трудоспособности. Реабилитация больных после хирургического лечения является наиболее сложной. В этих случаях она касается разнообразных аспектов, связанных как с техникой хирургических вмешательств на половых органах, так и с решением ряда вопросов нейроэндокринного характера. К ним относятся: выбор оптимального срока операции, рационального ее объема, метаболической реабилитации в ближайшие часы, дни и недели после операции, а также влияние операции на восстановление здоровья.

Если нельзя относительно быстро устранить нарушения в половых органах, а у больных наблюдаются выраженные вегетососудистые, нейроэндокринные и другие расстройства, то в таких случаях требуется специальная терапия. Лечение должно ориентироваться на поддержание оптимального уровня постоянства внутренней среды организма и на предупреждение дальнейшего повреждения половых органов в результате осложнений; показаны санаторно-курортное и другие виды общеукрепляющего лечения.

Необходима постоянная коррекция психологических нарушений, причем не только у самого больного, но и у супруга (супруги), родителей. В целях скорейшей реабилитации больных в семье врачу следует стремиться к установлению контактов с родственниками (женой, мужем, родителями, детьми). В некоторых случаях приходится прибегать к обследованию контактных лиц, назначать им соответствующее лечение, санировать источники инфекции, устранять клинические и психические нарушения, которые нередко сопровождают хламидийную инфекцию.

Результаты наблюдений показали, что высокотревожные личности (по шкале реактивной тревожности) с урогенитальными инфекциями нередко характеризуются субъективно переживаемыми эмоциями – чувством напряжения, беспокойства, озабоченности, нервозности, которые сопровождаются активизацией функций вегетативной нервной системы. Высокотревожные пациенты характеризуются в личностном плане как субъекты, склонные в широком диапазоне ситуаций к неадекватной самооценке, и реагируют на оценку их окружающими выраженным состоянием тревожности с соответствующей симптоматикой. Такие больные требуют особого внимания и осторожного подхода. Низкотревожные пациенты, наоборот, не склонны воспринимать как угрозу своему престижу оценку их окружающими. Это следует учитывать при социально-трудовой адаптации и реабилитации больных, что позволит уменьшить влияние окружающей среды, в частности факторов, способствующих распространению заболеваний, передающихся половым путем (Федоренко, 1995; Бабюк и соавт., 2000).

Профессиональная реабилитация заключается в экспертной оценке состояния здоровья больного с точки зрения возможности выполнения им определенного вида деятельности для дальнейшего соответствующего трудоустройства, по возможности равноценного. В процессе профессиональной реабилитации важная роль принадлежит юристу, разъясняющему больным их права, порядок оформления соответствующих документов по инвалидности, трудоустройству, возможности получения ими помощи из средств социального обеспечения. Если пациент вследствие тяжелой формы хламидиоза (болезнь Рейтера) является временно нетрудоспособным по своему обычному роду деятельности, но может без ущерба для лечения выполнять другую работу, то он временно, по заключению врачебно-консультативной комиссии, переводится на эту работу. Если временная работа оплачивается ниже, чем постоянная, то на период перевода (но на срок не более 2 месяцев) выдается больничный листок.

Больные, страдающие осложненными формами хламидиоза и других урогенитальных заболеваний, направляются в стационар для лечения до полного выздоровления. Благодаря применению современных методов лечения хламидиоз редко приводит к инвалидности. Лишь некоторые осложнения при хламидийной урогенитальной инфекции – артрит, болезнь Рейтера, стриктуры уретры и прямой кишки, элифантиаз половых органов при венерической лимфогранулеме, поражения сердечно-сосудистой и нервной систем, внутренних органов, а также осложнения, связанные с хирургическим лечением ряда гинекологических и урологических заболеваний (внематочная беременность, орхоэпидидимит), могут привести к утрате трудоспособности.

Санаторно-курортное лечение проводится, как правило, с целью долечивания и реабилитации больных с различными заболеваниями половых органов. Особенно широко используется курортное лечение при длительно текущих воспалительных процессах половых органов. Рекомендуются грязелечение на курортах: Анапа, Бердянск, Евпатория, Ейск, Железноводск, Куюльник, Мариуполь, Одесса, Пятигорск, Саки, Сергеевка, Славяногорск.



## 14.2. МЕТОДЫ БОРЬБЫ С ГЕНИТАЛЬНЫМ ХЛАМИДИОЗОМ

Проблема борьбы с хламидиозами, передающимися половым путем, включает широкий круг вопросов, имеющих отношение не только к службе здравоохранения, но и к деятельности административных, правоохранительных органов, системы просвещения населения, других ведомств, обеспечивающих необходимые условия для здорового образа жизни общества. Чтобы предотвратить опасность, которую представляет хламидиоз, требуются объединенные усилия эпидемиологов, клиницистов, лабораторных работников, психологов, педагогов, специалистов по профилактике и лечению бесплодия, выявлению антенатальной патологии, планированию семьи.

Борьба с хламидиозом должна вестись в четырех основных направлениях (Мавров, 2002):

1. Просвещение населения относительно риска заражения хламидиозом и ознакомление с методами, его уменьшающими.
2. Выявление инфекции у лиц без симптомов и у тех, кто обращается за помощью к врачам: урологам, акушерам-гинекологам, терапевтам, невропатологам, инфекционистам, педиатрам и другим специалистам.
3. Эффективная диагностика и лечение больных и инфицированных.
4. Обследование и лечение лиц, бывших в половом и бытовом контакте с больными и инфицированными.

### 14.2.1. Анализ ситуации

В последние годы отмечается существенный рост числа случаев заражения хламидиозом. Распространению хламидиоза способствуют социальные и поведенческие факторы, а также факторы медико-биологического характера:

- падение уровня жизни части населения, безработица, особенно среди молодежи;
- распространение алкоголизма и наркомании;
- рост преступности и вовлечение в криминальную среду молодежи;
- неконтролируемая государством порнография и проституция;
- снижение укрепляющей роли семьи, раннее начало половой жизни;
- отсутствие государственной программы полового и семейного воспитания.
- ослабление государственного контроля над профилактикой венерических болезней, невозможность работы старыми диспансерными методами;
- миграция населения;
- неэффективность традиционных методов санитарного просвещения;
- снижение доступности специализированной венерологической помощи.

Неудовлетворительное положение с заболеваемостью хламидиозом обуславливает необходимость пересмотреть и усовершенствовать систему организации борьбы с данным заболеванием. В связи с этим возникает необходимость повышения знаний по различным аспектам

хламидийных инфекций венерологов и врачей смежных специальностей. В течение последнего десятилетия подготовка персонала по диагностике, лечению хламидиоза не соответствует современным требованиям с учетом разнообразия форм заболеваний, вызываемых хламидиями и растущей сложностью проблем. Действующие учебные планы и программы подготовки врачей по венерологии недостаточно полно с учетом современного состояния проблемы отражают ее содержание, не отвечают существующим требованиям к подготовке врачей.

#### 14.2.2. Эпидемиологический надзор за хламидиозом

Система эпидемиологического надзора включает комплексные профилактические и противозидемические мероприятия по целенаправленному выявлению заболевших, обязательному обследованию и лечению сексуальных партнеров. С целью ограничения распространения инфекции среди населения необходимо проводить лабораторное обследование для выявления больных в группах риска, предупреждать сексуальных партнеров о необходимости воздерживаться от опасного секса, дабы уменьшить риск заражения в будущем.

Для предупреждения передачи инфекции необходима оперативная и полная санация эпидемических очагов хламидиоза. Оценка деятельности по санации эпидемических очагов включает учет полноты и оперативности выявления источников заражения, половых контактов.

Решения, принимаемые на собраниях у главного врача КВД, включают в себя следующие компоненты:

1. Оценку результатов эпидемиологического анализа.
2. Постановку задач по перечню и объему противозидемических мероприятий.
3. Планирование лечебно-профилактических мероприятий с учетом материального обеспечения и их реализации.
4. Обеспечение высокого качества санитарного просвещения с использованием средств массовой информации.
5. Контроль выполнения и оценку качества работы.

#### 14.2.3. Лечебно-профилактическая помощь больным, страдающим хламидиозом

Осуществляется комплексно, включая этиотропную терапию, применение препаратов, потенцирующих действие антибиотиков, средств, способствующих разрешению патологических процессов, усиливающих защитные факторы организма, восстанавливающих пораженную анатомическую структуру и функцию пораженных органов. При разработке различных методов лечения больных хламидиозом необходимо учитывать разнообразнейшие параметры: цикл развития возбудителя, спектр его чувствительности к различным препаратам антибактериального действия, фармакокинетические особенности антибиотиков при использовании различных доз и способов их введения.

В ряде случаев лечение может быть затруднено нарастанием устойчивости хламидий к антибактериальным препаратам, одновременным инфицированием несколькими половыми инфекциями, иммунодефицитами, применением внутриматочных средств для предохранения от беременности, которые рекомендуется удалять сразу после начала антибактериальной терапии.

Эффективность должна быть наиболее важным критерием выбора имеющихся схем лечения больных хламидиозом. Схемы лечения должны обеспечивать, по крайней мере, 85% излеченности. Схемы, эффективность которых приводится ниже, применять не рекомендуется, поскольку они могут привести к селекции нечувствительных штаммов хламидий, что быстро ограничит их применение. Оправданным является лечение несколькими антибиотиками для предотвращения быстрого развития лекарственной устойчивости и в случаях смешанного инфицирования. При лечении смешанных венерических заболеваний применяют метод двухэтапного этиологического лечения больных. При этом учитывается роль нескольких видов микроорганизмов в развитии инфекционного процесса, а также разнообразность уровней чувствительности к антибиотикам различных компонентов в ассоциации.

При обследовании и лечении больных с хламидиозом необходимо проводить мероприятия, которые направлены на недопущение внутрибольничной инфекции. С этой целью следует обеспечить стационарные и поликлинические отделения кожно-венерологических диспансеров оборудованием и способами дезинфекции и стерилизации медицинского инструментария, а медицинских работников – способами индивидуальной защиты, следить за строгим соблюдением правил противозидемического режима при оказании лечебной помощи больным.

Профилактика хламидиоза должна основываться, прежде всего, на изменении поведения, ведущего к риску заражения. При разработке профилактических мер для групп населения, подвергающихся риску заболевания, необходимо учитывать специфику образа их жизни, психосоциальные и поведенческие факторы.

Клиницисты, оказывающие помощь больным хламидиозом, должны иметь ресурсы для просвещения людей относительно риска заражения и выбора правильного поведения, в особенности сексуального. Оценка поведения должна проводиться с учетом анамнеза больного. Пациентов следует знакомить с методами, снижающими риск заражения, включая воздержание, тщательный выбор полового партнера, специальные рекомендации по организации своего секса – индивидуальная профилактика на пунктах профилактики венерических болезней, применение презервативов и спермацидных средств, периодическое обследование у врача.

В системе профилактических мероприятий по борьбе с хламидиозом имеет значение четко организованная и правильно проводимая личная профилактика, включая выбор дислокации пунктов индивидуальной профилактики венерических заболеваний, информацию об их функционировании, рекомендации по правильному применению презервативов.

Своевременное выявление и точное сообщение о каждом случае является неотъемлемой частью мероприятий по борьбе с хламидиозом. Группы лиц с большой частотой заболеваемости ИППП должны подвергаться массовому обследованию. Уже сейчас необходимые исследования, а также коррекция поведения вышеозначенных лиц проводятся некоторыми благотворительными учреждениями, которые оказывают нуждающимся необходимую психологическую поддержку. Особое внимание следует обратить на молодежь, наиболее подверженную заражению хламидиозом и особенно уязвимую для осложнений. Необходимо вырабатывать ответственное отношение к сексуальному поведению и обеспечить существенное усвоение санитарно-гигиенических навыков у молодежи в период полового созревания путем соответствующего обучения. Это будет способствовать восприятию методов первичной и вторичной профилактики и, таким образом, приведет к созданию, по мере роста детей, такой социальной среды, которая будет в меньшей мере способствовать передаче хламидиоза половым путем (Всемирная организация здравоохранения, 1996).

#### 14.2.4. Научные исследования

Эффективность борьбы с хламидиозом обеспечивается при условии интенсивного развития приоритетных научно-исследовательских направлений для решения проблем, связанных с вышеозначенным заболеванием. Прежде всего, это углубленные клинико-эпидемиологические исследования, усовершенствование методов диагностики, изучение патогенеза, разработка эффективных и рациональных методов терапии, усовершенствование системы организационных и профилактических мероприятий.

Научно-исследовательские разработки по проблемам хламидийных инфекций следует проводить в следующих направлениях:

- установление закономерностей распространения хламидиоза, определение в популяции групп риска в отношении инфицирования и возникновения осложнений;
- генотипирование и изучение циркуляции хламидий в различных регионах Украины, спектра вызываемой ими патологии;
- выяснение механизмов взаимодействия хламидий с организмом хозяина, в частности, с иммунной системой, лежащих в основе патогенеза хламидиозов;
- изучение современных аспектов патологии, определение факторов, способствующих распространению инфекции из урогенитального источника;
- проведение комплексных исследований значения хламидий при хронических процессах в мочеполовых органах, объективная оценка роли бессимптомного течения процесса в распространении инфекции;
- изучение феномена персистенции хламидий, механизмов формирования, факторов реактивации персистентных инфекций (экспериментальные модели, естественные системы);
- изучение иммунобиологии хламидий, взаимодействие их с другими возбудителями ИППП, выяснение влияния хламидийной инфекции на его течение и передачу ВИЧ-инфекции и развитие СПИДа;
- комплексное изучение новых представителей *Chlamydiales* и вызываемой ими инфекционной патологии (эпидемиологические, микробиологические, иммунологические и клинические исследования);
- поиск новых доступных методов диагностики, основанных на методах молекулярной биологии. Совершенствование ранней диагностики, разработка экспресс-методов, в том числе для обследования больших групп населения с повышенным риском инфицирования;
- разработка, конструирование, апробация и внедрение в практику современной отечественной диагностической аппаратуры, автоматизированных диагностических комплексов и приборов для лабораторной диагностики хламидиоза;
- разработка рациональных и сокращенных методов лечения хламидиоза и смешанных инфекций, целенаправленный поиск средств специфической терапии (создание вакцинных препаратов), нетрадиционных методов терапии;
- разработка общих методологических подходов и методов контроля за распространенностью БППП. Введение форм учета и внедрение в практику единой системы эпидемиологического надзора за этими заболеваниями.



В связи с широким распространением хламидийных инфекций, их негативным влиянием на здоровье нации, в особенности на подрастающее поколение, необходимо увеличить ассигнования на борьбу с хламидиозом, а также координировать деятельность по реализации комплексной программы на государственном уровне.

## ГЛАВА 15. БОЛЕЗНЬ РЕЙТЕРА

(раздел написан Бондаренко Г. М.)

### 15.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВЕНЕРИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА

Венерическая форма болезни Рейтера – хроническое заболевание, склонное к рецидивам, характеризующееся одновременным поражением мочеполовой системы, суставов, глаз, а также нередко кожи, слизистой оболочки и внутренних органов.

Первые упоминания о классической триаде относятся к концу XVI века (Miehle, 1981; Атог, 1983), сделанные одним из врачей Христофора Колумба после возвращения из второго плавания к берегам Америки. В 1776 году Stoll был первым, кто описал триаду после перенесенной дизентерии. В 1819 году Brodie описал 5 больных с уретритом, полиартритом и конъюнктивитом и сделал предположение об урогенной, инфекционной этиологии этих поражений. В 1899 году Vidal и Terson сообщили о заболевании, характеризующемся уретритом, артритом, конъюнктивитом, «бленнорейной кератодермией» и лимфаденитом.

В 1916 году немецкий военный врач Reiter описал случай сочетания негонококкового уретрита, полиартрита и конъюнктивита после перенесенной дизентерии, назвав его «*spirochaetosis arthritica*». За 2 недели до публикации Reiter, во Франции появилась статья Fiessinger и Leroy, наблюдавших сочетанные поражения уретры, суставов и глаз у французских военнослужащих во время эпидемии дизентерии. После этого данный синдром получил название «синдрома Рейтера-Фесинджера-Леруа», или уретроокулосиновияльного синдрома, что до сегодняшних дней закрепилось в мировой литературе. Сам Reiter в 1963 году предложил классическую триаду (уретрит, артрит, конъюнктивит) называть болезнью Рейтера, если она возникла после инфекции уретры, а синдромом Рейтера – когда она является следствием ревматических заболеваний. Мы считаем правильным называть эти сходные по клинической картине и имеющие все признаки болезни симптомокомплексы болезнью Рейтера, указывая при этом этиологический фактор (постэнтероколитическая форма и венерическая форма болезни Рейтера).

Постэнтероколитическая форма БР чаще наблюдается в летне-осенний период, причем на фоне вспышек острых кишечных инфекций, и может принимать эпидемический характер. В то же время заболеваемость венерической формой БР имеет главным образом спорадический характер.

В литературе описаны две крупные эпидемии болезни Рейтера. Первая описана Raponen в 1948 году в Финляндии, когда после энтерита, вызванного *Shigella flexneri*, симптомы реактивного артрита появились у 344 человек. При наблюдении данных пациентов в последующие 20 лет различные проявления артропатий отмечались более чем у четверти больных (Saïranen et al., 1969). Noer в 1966 году описал возникновение БР у 9 человек из группы в 602, заболевших дизентерией. При этом у 5 больных БР суставной синдром сохранялся при последующем наблюдении в течение 13 лет (Noer, 1969).

В Международной классификации болезней 10-го пересмотра (МКБ-10) узаконен термин «болезнь Рейтера», отнесенный к рубрикам M0 2.3 «Инфекционные артропатии» и «Другие венерические болезни».

Согласно классификации ревматических болезней, болезнь Рейтера (БР) отнесена к группе спондилоартритов (спондилоартропатий), то есть артритов, сочетающихся с поражением позвоночника. Общими признаками этих артритов являются также серонегативность по ревматоидному фактору, ассоциация с HLA-B27, внесуставные поражения. В группу спондилоартритов, наряду с венерической формой БР, входит первичный спондилоартрит – анкилозирующий спондилоартрит (болезнь Бехтерева) и вторичные: постэнтероколитическая форма болезни Рейтера, артриты при хронических заболеваниях кишечника (неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, болезнь Уиппла), псориазическая артропатия, ювенильный хронический спондилоартрит, острый передний увеит, энтезопатии, Sapho-синдром и недифференцированный спондилоартрит.

Точных данных о заболеваемости болезнью Рейтера нет. Однако очевидно, что БР в настоящее время является одним из самых частых видов острых артритов у мужчин и женщин молодого возраста (20-30 лет), хотя описаны и случаи заболевания у детей и лиц пожилого возраста (Sieper, Braun, 1995; Bahiri, 1999; Calin, Taugog, 1998; Лысенко с соавт., 1992). Соотношение женщин и мужчин в группе больных болезнью Рейтера составляет от 1:7 до 1:100 (Ковалев, 1988; Братанова, 1986; Молочков, Ильин, 1998), при постэнтероколитической форме БР – от 1:1 до 1:10 (1, 10, 180), а среди детей – 1:5 (Ильин и соавт., 1992). По данным Ильина, это дает основание предположить генетически обусловленную связь с полом, передающуюся, по-видимому, по отцовской линии по рецессивному типу (Ильин, 1991). Вас и соавт. считают, что большая частота БР у мужчин связана, возможно, с меньшим, по сравнению с женщинами, уровнем гуморального иммунного ответа на хламидийный антиген. Однако другие авторы полагают, что различие в заболеваемости мужчин и женщин объясняется недостатками диагностики, а также тем, что многие большие группы больных БР наблюдались в военных госпиталях (Pollock, Handsfield, 1984; Sieper, Braun, 1995). Так, в исследованиях Братановой говорится о соотношении 65% мужчин и 35% женщин (Братанова, 1986).

В Институте дерматологии и венерологии АМН Украины за последние 5 лет находилось на стационарном лечении 168 больных болезнью Рейтера. Из них мужчин было 115 (68,5%), женщин – 53 (31,5%). Таким образом, соотношение больных женщин и мужчин в среднем составило 1:2. Однако в возрастной группе до 20 лет (17,3% больных) соотношение женщин и мужчин в среднем было 1:9. В группах 21-30 лет (29,8% больных) и 31-40 лет (25,6% больных) это соотношение составило в среднем 1:2. В группе старше 41 года (27,3% больных) соотношение женщин и мужчин было равным (Бондаренко, 2002).

По нашему мнению, связь БР с полом кажется доказанной. Для всех ревматических болезней характерен половой диморфизм. Это, возможно, связано с различным гормональным статусом больных, который проявляется как в частоте встречаемости БР у мужчин и женщин (подобная картина наблюдается и у детей), так и более легком течении БР у женщин (Кузьмина, 1991; Гусева, 1993; Moxley et al., 2002). Также очевидно, что возрастные гормональные изменения у женщин, сопровождающиеся остеопорозом, приводят к большей частоте болезни Рейтера у женщин в возрастной группе старше 41 года.

Еще в 1948 году Morton отмечал, что у 10-14% больных БР родственники страдают ревматическими заболеваниями. Причем, по свидетельству ряда авторов, не прямой генетический

эффект был более выражен у двоюродных братьев, по сравнению с родственниками первой степени (Ковалев, Ильин, 1980; Насонова, Бунчук, 1997). По данным Института дерматологии и венерологии АМН Украины, более чем у 20% больных болезнью Рейтера ближайшие родственники страдают различными воспалительными заболеваниями опорно-двигательного аппарата (Бондаренко, 2002).

Большинство авторов-венерологов сообщают, что среди больных негонококковыми уретритами мужчин болезнь Рейтера регистрируется в 1-4% случаев (Catterall, 1975; Ильин, 1991; Мавров, 1994; Sieper, Braun, 1995; Calin, Taurog, 1998). В трехлетнем исследовании (1988-1990) в Норвегии было показано, что заболеваемость хламидийными артритами составляет 4,6 на 100 000 населения в возрасте от 18 до 60 лет. При этом урогенитальная инфекция в 36% случаев была асимптомной (Noer, 1969). В подобном исследовании в Германии обнаружено, что 0,7% (700 на 100 000) HLA-B27-позитивного населения Берлина страдает реактивными урогенными артритами. При экстраполяции этих цифр на все население Германии заболеваемость венерической формой БР составляет 0,01% (10 на 100 000) (Noer, 1969). Группа экспертов ВОЗ (World Health Organization, 1996) утверждает, что примерно 10% больных с хламидийной инфекцией мочеполовых органов могут иметь поражение суставов, глаз и сердца.

Болезнь Рейтера встречается в большинстве регионов мира, однако чаще регистрируется в Северной Америке и островных государствах Европы. В странах континентальной Европы, Северной Африки и Азии преобладают постэнтероколитические реактивные артриты (Ивашкин и соавт., 1991). На территории Украины и европейской части бывшего СССР с равной частотой наблюдаются как венерическая, так и постэнтероколитическая формы БР (Ковалев, 1988; Агабабова, 1991; Мавров, 1994; Насонова, Бунчук, 1997).

О распространенности БР в мире можно судить по частоте носительства антигена HLA-B27. Этот антиген относится к I классу антигенов главного комплекса гистосовместимости, которые выявляются на поверхности большинства клеток организма, в том числе лимфоцитов, и участвуют в реализации иммунного ответа. Ассоциация HLA-B27 различна среди разных видов спондилоартропатий: от 50% при псориатическом до 80% при реактивных артритах (в том числе БР), и более 95% при первичном анкилозирующем спондилите (Lopez-Larrea et al., 1998). При кишечной форме болезни Рейтера частота HLA-B27 колеблется от 22 до 80% (Calin, Taurog, 1998). Ассоциация HLA-B27 и венерической формы болезни Рейтера составляет, по данным разных авторов, 40-50% (Kvien et al., 1994; Calin, Taurog, 1998).

В последние годы проведены исследования, целью которых было объяснить взаимосвязь спондилоартропатий и HLA-B27. Выдвигаются 3 основные теории:

1. Теория артритогенного пептида, рассматривающая HLA-B27 или тесно ассоциированные с ним молекулы как рецептор для микробных антигенов, что способствует их распространению в организме заболевшего. В частности, таким антигеном может быть так называемый модифицирующий фактор, представляющий собой гликопептид клеточной стенки ряда кишечных бактерий. Считают, что при связывании с HLA-B27 «модифицирующий фактор» замещает b2-микроглобулин, входящий в состав молекулы HLA-B27, что способствует повреждению молекулы HLA-B27 антителами, направленными против этого гликопептида (Sullivan et al., 1987; Давтян и соавт., 1991). При этом происходит нарушение функции цитотоксических Т-лимфоцитов в процессе иммунного ответа на внутриклеточную инфекцию, что способствует ее персистенции (Linssen et al., 1987; Hermann et al., 1993).

2. Генетическая теория, авторы которой считают, что ген, кодирующий HLA-B27, сцеплен с другими генами, комбинация которых с HLA-B27 определяет восприимчивость индивидуума к БР или отдельным ее клиническим проявлениям (Calin, 1987). Так, имеются данные о высокой корреляции наличия в организме HLA-B27 и сакроилеита, иридоциклита. При этом HLA-B27 ингибирует антибактериальный CD8<sup>+</sup>-иммунный ответ, и преобладающий CD4<sup>+</sup>-иммунный ответ вызывает заболевание (Sercarz et al., 1993).
3. Теория молекулярной мимикрии была впервые предложена Ebringer для объяснения связи между кишечным микроорганизмом *Klebsiella pneumoniae* и анкилозирующим спондилоартритом (Ebringer et al., 1988). Суть теории в том, что в составе клеточной стенки ряда грамотрицательных бактерий (рода *Chlamydia*, *Yersinia*, *Salmonellae*, *Shigellae*, *Campylobacter*) содержатся фрагменты белков, имеющих структурное сходство с отдельными участками HLA-B27 (Бревертон, 1990). Считают, что перекрестнореагирующие антитела способны оказывать повреждающее действие на собственные, в данном случае – на синовиальные клетки организма, несущие молекулы HLA-B27. Подобное перекрестное реагирование препятствует осуществлению иммунного ответа на внутриклеточные микроорганизмы и их элиминации, способствуя персистенции инфекции. Существует и другая версия этой гипотезы, при которой не сам HLA-B27, а его производные пептиды, представляемые молекулами II класса главного комплекса гистосовместимости, становятся мишенью для аутоиммунного воздействия CD4<sup>+</sup> Т-клеток в результате перекрестного реагирования (Hayden, Davey, 1994). «Теория молекулярной мимикрии» является на сегодняшний день наиболее вероятной, однако данный механизм еще остается до конца не изученным.

HLA-B27 распространен повсеместно в мире, однако его частота различается в различных популяциях населения. Так, у коренных жителей северных районов земного шара (арктические и субарктические регионы Евразии и Северной Америки) HLA-B27 превалирует (20-50%), в то время как практически отсутствует у коренных жителей Полинезии (0-3%), Центральной и Южной Америки (0%), Экваториальной и Южной Африки (0-2%), Австралии (0%) (Khan, 1997). Среди населения западной и южной Европы частота обнаружения HLA-B27 низкая (2-6%). Среди славянских народов частота HLA-B27 составляет 7-14%. В то же время среди коренных жителей Кавказа, где анкилозирующий спондилит очень распространен, HLA-B27 обнаруживается всего у 0,1-0,8% (Braun, 1998).

Наибольшая в мире частота носительства HLA-B27 отмечается у индейцев племени гаида (50%), компактно проживающих на островах Королевы Шарлотты в канадской провинции Британская Колумбия. При этом у 4% мужского населения развивается анкилозирующий спондилоартрит (Khan, 1997).

Одним из доказательств того, что HLA-B27 и SpA связаны между собой, является высокая (20-50%) частота обнаружения их у близнецов и близких родственников, болеющих SpA (Brown, 1997).

В последние годы, с развитием молекулярных методов исследования, данные о структуре и функции HLA-B27 значительно расширились. Так, в настоящее время известно, по крайней мере, 20 субтипов HLA-B27 (HLA-B2701-HLA-B2720), отличающихся друг от друга по одному или более аминокислотным остаткам (Khan, 2000). Наиболее распространенным субтипом в мире является HLA-B2705, который, по-видимому, явился родоначальником остальных субтипов HLA-B27. Достоверно доказана ассоциация со спондилоартропатиями



только у 7 из субтипов HLA-B27 (B27-02-05,07,08,09). При этом отмечаются значительные этнические и географические различия в частоте их встречаемости и в ассоциации со спондилоартропатиями (Lopez de Castro, 1998). Опыты на животных (трансгенные мыши и крысы) достоверно показали вовлечение в патологический процесс суставов при артритогенных субтипах HLA-B27 (Hammer et al., 1990; Khare et al., 1995). При этом полностью экстраполировать эти данные на спондилоартропатии у людей нельзя.

Как нам представляется, теории, объясняющие взаимодействие HLA-B27 и БР, еще недостаточно обоснованы. Так например, они не объясняют, почему поражаются преимущественно суставы нижних конечностей, если HLA-B27 присутствует на поверхности всех нуклеарных клеток организма, или почему венерическая форма БР все-таки развивается у 50-60% B27-негативных больных. Так, в исследовании Vas диагноз БР был подтвержден клиническими и микробиологическими (обнаружена ДНК *S. trachomatis* в синовиальной жидкости) методами у 12 больных. При этом HLA-B27 был обнаружен только у 20% больных (Vas et al., 1995).

Доказательством этого является развитие БР у лиц, в фенотипе которых нет гена B27. Правда, при этом у них обнаруживаются другие антигены системы HLA (B7, B22, B35, B42, B60 и др.), перекрестнореагирующие с B27 (Calin, 2000).

Были проведены исследования по изучению клинического течения БР в зависимости от носительства того или иного антигена системы HLA. По данным Ковалева, у 75% больных с затяжным, хроническим течением БР определяются антигены B27 и B35, с легким течением болезни – B27+B10, с увеитом – A1+B27, с поражением кожи – B27+B8 (Ковалев, 1988). По данным Братановой, клиническая картина БР у B27-позитивных больных, по сравнению с B27-негативными, отличается тяжелым течением с постоянным вовлечением в процесс сакроилеарных сочленений и нередким поражением дистальных отделов аорты (Братанова, 1986). При этом при сочетании B27+A2 процесс протекает еще тяжелее, а при сочетании B27+B35 – легко, без поражения позвоночника. Ряд авторов считают, что антиген B27 обуславливает предрасположенность не к артритам вообще, а к хроническому течению артритов или к поражению позвоночника, крестцово-подвздошных сочленений кератодермией или цирцинарным баланитом (Leirisalo-Repo et al., 1994; Flat et al., 2002).

Calin обнаружил, что анкилозирующий спондилоартрит развивается у 75% монозиготных и у 12% дизиготных близнецов, имеющих предрасположенность к этому заболеванию. При этом только 27% из этих двух групп – HLA-B27-позитивны (Calin, 2000). На основании этого автор делает вывод, что связь спондилоартропатий с HLA-B27 составляет не более 50%. В исследованиях Hohler было показано, что частота возникновения анкилозирующего спондилоартрита среди монозиготных близнецов мужского пола значительно превышает такую среди женского пола (Hohler, 2000).

Около 80% больных ВИЧ-инфекцией имеют антиген HLA-B27. На первом месте среди ревматологической патологии у больных ВИЧ стоят серонегативные спондилоартропатии, в том числе болезнь Рейтера (Mody, 1999; Cuellar, Espinoza, 2000). При этом болезнь Рейтера у таких больных протекает особенно тяжело, с вовлечением в патологический процесс практически всех суставов, с кожными высыпаниями и неврологическими проявлениями (Alman et al., 1994).

Приведенные эпидемиологические и молекулярно-биологические данные свидетельствуют о том, что на сегодняшний день нельзя достоверно утверждать, что HLA-B27 является

предрасполагающим и патогенетическим фактором болезни Рейтера. Более того, на сегодняшний день известно, по крайней мере, 20 серотипов антигена B27, при этом связь с артритом прослеживается только у 7 из них. Более вероятно, что HLA-B27 не играет прямой роли в развитии болезни, но тесно связан с геном иммунного ответа и может являться важным фактором изучения распространенности болезни Рейтера в различных регионах мира (Laivoranta et al., 1995; Zanelli et al., 2000).

## 15.2. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА

Многочисленные клинические наблюдения свидетельствуют о том, что развитию венерической формы болезни Рейтера предшествует урогенитальная инфекция (Шаткин, Мавров, 1983; Ковалев, 1988; Ильин, 1991; Агабабова, 1991; Inman et al., 2000). При этом роль *C. trachomatis* (серовары D-K, являющиеся наиболее частыми возбудителями негонококковых воспалительных процессов у мужчин и женщин), как основного этиологического фактора при БР, не вызывает сомнений. Инфекционную природу БР подтверждает высокая частота (до 90%) обнаружения хламидий у половых партнеров больных БР (Ковалев, 1988; Братанова, 1986; Calin, Taurog, 1998). Более того, данное заболевание на сегодняшний день рассматривается как наиболее тяжелое осложнение урогенитального хламидиоза.

Имеются данные об этиологической роли в развитии БР и таких возбудителей заболеваний, передающихся половым путем как микоплазмы (*Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*) и *Neisseria gonorrhoeae*. Триггерными агентами энтеропатической формы болезни Рейтера являются кишечные бактерии рода *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* и *Campylobacter*. Кроме того, и другие виды хламидий (не являющиеся возбудителями негонококковых уретритов) могут вызывать симптоматику БР (*Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* и *Chlamydia trachomatis*, серовары L1-L3).

*Chlamydia pneumoniae* – распространенный возбудитель воспалительных заболеваний дыхательных путей (пневмония, бронхит, синусит) (Grayston, 1992). В последнее время появляются также данные об участии этого возбудителя в этиопатогенезе атеросклероза (Kuo et al., 1995), рассеянного склероза, болезни Альцгеймера и других заболеваний (Wimmer, Habert, 2000). Ряд публикаций последних лет указывает на то, что *Chlamydia pneumoniae* может быть триггерным агентом при реактивных артритах во время локализации первичного воспалительного очага в дыхательных путях (Braun et al., 1994; Moling et al., 1996). По статистике, доля реактивных артритов, вызванных *C. pneumoniae*, составляет 7-10%.

Ряд исследователей обнаруживают антигены *Chlamydia pneumoniae* в синовиальной ткани, а специфические антитела к этому возбудителю – при воспалительных заболеваниях дыхательной системы (Hannu et al., 1999; Moling et al., 1996). Braun и соавт. (1994) обнаружили антигены *C. pneumoniae* методом иммунофлуоресценции в синовиальной жидкости у 5 из 70 больных с реактивными артритами. При этом только у 3 были симптомы предшествующего воспалительного процесса верхних дыхательных путей.

В литературе имеются лишь единичные сообщения о связи *C. psittaci* (возбудителя пситтакоза) (Vhoral, Thomas, 1982) и *C. trachomatis*, серовары L1-L3 (возбудителя венерической лимфогранулемы) (Keat et al., 1983) с развитием реактивных артритов.

Возбудителей заболеваний, передающихся половым путем, в том числе и венерической формы болезни Рейтера, обнаруживают и при других заболеваниях опорно-двигательного

аппарата. Например, при ревматоидном артрите (Wilkinson et al., 1998; Horowitz et al., 2000; Gilroy et al., 2001), первичном анкилозирующем спондилоартрите (Lange et al., 1998), ювенильном артрите (Taylor-Robinson et al., 1998). Однако частота выявления хламидий и микоплазм в урогенитальном тракте этих больных обычно не превышает таковую в популяции больных без заболеваний суставов. Поэтому рассматривать эти инфекции в качестве триггерных на фоне современных данных об их этиопатогенезе нельзя.

По статистике, в 15-20% случаев БР предшествует гонорейный уретрит (Ильин, 1991; Liebling et al., 1994). Однако БР чаще возникает тогда, когда гонококки полностью элиминированы из организма, при этом противогонококковая терапия не влияет на предотвращение БР. Существует предположение, что гонококки способствуют активации ранее существующей у больного латентной инфекции. Часто гонорея приобретает в виде смешанной инфекции вместе с хламидиозом, что становится пусковым фактором БР.

Частота выявления *C. trachomatis* в урогенитальном тракте при БР колеблется от 32% до 100%. Причем, эти различия часто связаны с уровнем чувствительности способов диагностики и с приемом антибиотиков пациентами до проведения исследования (Мавров, 1994). Ковалев обнаружил антигены *C. trachomatis* в урогенитальном тракте у 41,9% больных (1988), Ильин – у 32,7% (при острой атаке БР – у 88,2%) (1991), Братанова – у 50% (1986), Бакулев – у 63,2% (1996), Дубенский – у 84,7% (2001).

Серологические признаки хламидийной инфекции при БР обнаруживают значительно чаще, чем самих возбудителей в урогенитальном тракте. При этом титр антител к хламидиям при БР всегда выше, чем при локальной урогенитальной инфекции. Так, Шубин с соавт. (1982) с помощью реакции связывания комплемента (РСК) находили антитела к хламидиям у 77% больных с БР. Ковалев (1988) с помощью реакции микропреципитации с хламидийным антигеном (МПП) обнаружил хламидийные антитела в среднем у 43,1% больных (при этом у 57,4% – больных I стадии и у 30,6% – больных II стадии БР). Кяшас (1990) с помощью реакции прямой геагглютинации обнаружил иммунологические признаки хламидиоза у 63% из 207 больных БР. С помощью реакции непрямой микроиммунофлюоресценции (РНИФ) Silveira и соавторы (1993) обнаружили хламидийные антитела у 62,1% больных БР. Vas и соавт. (1996) с помощью иммуноферментной методики (ELISA) обнаружили антихламидийные IgM и IgA в сыворотке крови у 81% больных хламидийными реактивными артритами. Larsen и соавт. (1994) обнаружили антитела против хламидийных белков Omp2 и липополисахарида у 40% больных реактивными артритами с помощью иммуноблоттинга. Fendler и соавт. (2001) с помощью детекции противохламидийных антител иммунофлюоресцентным методом обнаружили антитела у 63% больных венерической формой БР.

В исследованиях Erlacher и соавт. (1995) были проведены сравнительные обследования урогенитального тракта и сыворотки крови 234 больных с недифференцированными артритами при отсутствии экстраартикулярной симптоматики. Исследования урогенитального тракта были положительны у 44% больных (15% *Chlamydia trachomatis*, 14% *Mycoplasma hominis*, 28% *Ureaplasma urealyticum*), по сравнению с 63% позитивных результатов исследований антител (22% *Chlamydia trachomatis*, 21% *Mycoplasma hominis*, 20% *Ureaplasma urealyticum*). При этом у менее половины больных с положительными результатами антител были обнаружены возбудители в урогенитальном тракте. Авторы делают вывод о преимущественном использовании урогенитальной детекции триггерной инфекции при реактивных артритах.

Об инфекционной (хламидийной) этиологии болезни Рейтера свидетельствует обнаружение антител и антигенов хламидий в суставной жидкости и периартикулярных тканях пораженных суставов. Антитела могут иметь большое значение для профилактики реинфекции, но в большинстве случаев они играют незначительную роль в высвобождении организма от хламидий (Inman et al., 1987; Fendler et al., 1998; Gaston, 2000).

Впервые это удалось Schachter и соавт. в 1966 году, выделившим хламидии из пунктата суставов у 4 больных (Schachter et al., 1966). В 1973 году Шаткин и Мавров изолировали хламидии из суставной жидкости путем адаптации хламидий к эпителиальным клеткам оболочек куриных эмбрионов у 1 из 4 больных, при этом у 2 больных были неидентифицированные образования, похожие на хламидии (Шаткин, Мавров, 1983). Штаммы хламидий AP-23 и CP-1 были идентифицированы и изучены в сравнении с другими штаммами хламидий. Была получена экспериментальная модель хламидийного артрита и установлено, что при внутрисуставном введении хламидий (штаммы AP-23 и CP-1), у подопытных животных возникает хронический артрит, сопровождающийся появлением хламидий в синовиальной жидкости и синовиальной оболочке до 18-20-го дня после заражения. Патоморфологические изменения, выявляемые при динамическом изучении срезов суставных тканей, пораженных патологическим процессом, были сходными с хроническими артритами при БР у людей. При этом авторам удалось доказать, что так называемые суставные штаммы хламидий отличаются по своим биологическим, генетическим и морфологическим свойствам от штаммов, выделенных из уретры при отсутствии артрита. Это положение в определенной степени объясняет развитие БР не у всех больных урогенитальным хламидиозом, а только у 1-4%. Однако целый ряд авторов отрицают возможность культивирования хламидий, выделенных из суставов больных БР (Keat et al., 1987; Hughes et al., 1991; Rahman et al., 1992).

В 1983 году Keat обнаружил антигены хламидий в биоптатах синовиальной оболочки больных БР с помощью иммунофлуоресцентной методики и электронной микроскопии (Keat, 1983). Шубин и соавт. (1986) выявили антигены хламидий у 33 из 57 больных БР. При этом лишь у 3 из этих больных хламидии имели типичные морфологические структуры, тогда как у 30 определялись мелкие образования, характерные для персистентной инфекции в культурах клеток (L-формы). Schumacher и соавт. (1988) при помощи электронной микроскопии (при исследовании биоптатов синовиальной ткани 5 больных БР с давностью заболевания менее 4 недель) в четырех случаях обнаружили схожие с хламидиями образования. Иммуноцитохимическая идентификация хламидийных антигенов с помощью противохламидийных антител показала наличие хламидий у 2 пациентов с давностью артрита менее 4 недель и ни у одного из пациентов с более продолжительным заболеванием. Naganaga и соавт. (1995) обнаружили хламидии в 6 образцах синовиальной ткани и 2 образцах синовиальной жидкости у больных, как с острыми, так и с хроническими формами хламидийных артритов. Исследование проводилось с помощью иммуноэлектронной микроскопии. При этом были обнаружены aberrantные формы хламидий со сниженным синтезом МOMP и ЛПС, даже после проведенных курсов антибиотикотерапии (1 месяц терапии доксициклином гидрохлоридом). В синовиальной ткани хламидийные включения обнаруживались внутри фибробластов и макрофагов.

Ряд исследователей обнаруживали хламидийные ДНК и РНК в синовиальной жидкости и синовиальных тканях (Rahman et al., 1992; Hummer et al., 1992; Bas et al., 1995). Так, Hammer и соавт. (1992) обнаружили хламидийные РНК методом ПЦР в синовиальной ткани больных



хламидийными и недифференцированными артритами. Branigan и соавт. (1996) с помощью ПЦР у 14 из 18 больных БР обнаружили РНК хламидий. Beutler и соавт. (1995) методом гибридизации *in situ* обнаружили хламидийные РНК у больных БР и ни одного больного с остеоартритом. Vas и соавт. (1995) обнаружили хламидийные ДНК в синовиальной ткани и синовиальной жидкости у больных реактивными артритами методом ПЦР. При этом хламидийные ДНК были также обнаружены в синовиальной жидкости у 41% пациентов с недифференцированными серонегативными олигоартритами без урогенитальной инфекции в анамнезе.

Nikka и соавт. (1997) при обследовании 12 пациентов с хламидийными реактивными артритами обнаружили ДНК хламидий у 4 больных методом лигазной цепной реакции (ЛЦР). При этом с помощью ПЦР не было выявлено ни одного положительного результата. Berlau и соавт. (1998) исследовали синовиальную ткань 4 больных с реактивными артритами с помощью методов гибридизации *in situ* и прямой иммунофлюоресценции (ПИФ). В результате ДНК *Chlamydia trachomatis* были обнаружены у 2 больных. Метод ПИФ во всех 4 случаях дал отрицательный результат.

Другие исследователи утверждают невозможность детекции хламидийного антигена и ДНК в синовиальной жидкости. Так, Poole и соавт. (1992) при обследовании 10 пациентов с урогенитальными реактивными артритами и 17 с недифференцированными реактивными артритами ни у одного из больных не обнаружили хламидии методами ПЦР и ПИФ. В работе Wordsworth и соавт. (1990) также представлены отрицательные результаты исследования синовиальной ткани 18 больных БР методом ПЦР.

Имеются единичные сообщения об обнаружении *C. trachomatis* в синовиальной жидкости у детей. Так Лысенко и соавторы (1995) методом прямой иммунофлюоресценции обнаружили хламидии у двоих детей с упорным течением БР.

В исследованиях Панасюка и соавт. (1998) была показана возможность инфицирования хламидиями клеток соединительной ткани, в частности хондроцитов суставного хряща и фибробластов кожи человека. Инфицирование культур хондроцитов суставного хряща и фибробластов кожи человека проводили *in vitro* экспериментальным штаммом хламидий CP-1, серийно пассированным в желточных мешках куриных эмбрионов. Оценка результатов проводилась методом прямой иммунофлюоресценции.

Hengy и соавт. (2000) провели ПЦР-исследование синовиальной ткани на наличие урогенитальных инфекций у больных с артритами височно-нижнечелюстного сустава. При этом *C. trachomatis* была обнаружена в 42%. На основании этого авторы делают предположение о том, что данный артрит является следствием урогенитальной инфекции.

Braun и соавт. (1997) исследовали ДНК *C. trachomatis* и *C. pneumoniae* в биоптатах синовиальной ткани крестцово-подвздошных сочленений и коленных суставов и в синовиальной жидкости больных с различными спондилоартропатиями, в том числе реактивными артритами. Длительность суставного синдрома у этих больных в среднем составила 5,3 года. Ни в одном случае не была обнаружена ДНК хламидий. Авторы делают заключение о возможном включении аутоиммунных механизмов развития артритов на поздних стадиях заболевания.

Inman и Chiu (1998) представили экспериментальную модель хламидийного артрита. Исследования проводились на лабораторных крысах Lewis. Клеточные культуры синовиоцитов, взятые из коленных суставов этих лабораторных животных, были культивированы с *Chlamydia trachomatis*, при этом наблюдался выраженный фагоцитоз последних. Далее зараженные клетки вводили здоровым животным интраартикулярно и внутримышечно.

При использовании иммунофлюоресцентной методики хламидийные антигены были обнаружены в синовиальной ткани, печени и селезенке всех 12 крыс через 7 дней после внутрисуставного заражения. Через 50 дней хламидии были обнаружены в 9 из 12 препаратов селезенки и печени, и только в 1 препарате синовиальной ткани. При внутримышечном введении не было диагностировано ни одного случая артрита при отрицательных результатах исследования на хламидийный антиген синовиальной ткани, печени и селезенки. Данное исследование доказывает возможность существования *Chlamydia trachomatis* в клетках синовиальной ткани с развитием артрита и диссеминацией во внутренние органы.

Некоторые авторы в качестве инфекционного агента, вызывающего болезнь Рейтера, рассматривают генитальные микоплазмы. Урогенитальные микоплазмы широко распространены и часто являются причиной или ассоциируют с различными воспалительными заболеваниями мочеполовой системы (Мавров, 1994; Молочков, Ильин, 1998; Taylor-Robinson et al., 1994; Razin et al., 1998). Микоплазмы обнаруживают в половых органах и синовиальной жидкости больных БР и их половых партнеров (Erlacher et al., 1995; Li et al., 1997). Однако другие авторы отрицают возможность микоплазменной природы БР (Ковалев, Ильин, 1993; Calin, Taurog, 1998), аргументируя свое мнение следующими фактами: микоплазмы обладают слабыми антигенными свойствами (так как не имеют клеточной стенки) и вряд ли могут запустить иммунопатологический процесс в организме.

Чаще всего микоплазмы диагностируют у больных с ревматоидным артритом. При этом заболевании различные виды микоплазм обнаруживают с частотой от 7 до 88% (Прозоровский и соавт., 1995; Johnson et al., 2000). Что касается БР, то выявление генитальных микоплазм, патогенных для человека, из суставной жидкости является достаточно редким фактом и не согласуется с высокой частотой обнаружения патогенных микоплазм в мочеполовой системе.

В последнее время появились данные о контаминации хламидий (*C. pneumoniae* и *C. trachomatis*) различными видами микоплазм. Koehler и соавт. (1999) изучали взаимодействие *M. hominis* и *M. fermentans* с *C. pneumoniae* и *C. trachomatis* на культуре клеток. При этом обнаружилось, что увеличение числа микоплазм вызывало угнетение роста и размножения хламидийных клеток. Возможно, микоплазмы не играют прямой роли в развитии реактивных артритов, а являются лишь часто выявляемым сопутствующим микроорганизмом при инфекционных артритах, вызванных хламидийной инфекцией.

Следует подчеркнуть, что если микоплазменная этиология БР вызывает сомнение у большинства исследователей, то бесспорным признается тот факт, что сочетание микоплазм с другими инфекциями (хламидиоз) значительно повышает риск возникновения БР (Calin 1990).

Таким образом, многочисленные исследования подтверждают этиологическую роль *C. trachomatis* в возникновении венерической формы болезни Рейтера.

Исследования иммунитета у пациентов с БР позволили установить угнетение клеточного иммунитета: уменьшение количества Т-лимфоцитов при незначительном увеличении В-лимфоцитов, увеличение уровня иммуноглобулинов классов А, М, G и циркулирующих иммунных комплексов, нарушение интерферонпродуцирующей функции клеток периферической крови (угнеталась выработка эндогенных  $\alpha$ - и  $\gamma$ -интерферонов) (Ковалев, 1988; Дачива и соавт., 1991; Бакулев, 1996).

Причиной слабого клеточного иммунного ответа может быть высокая концентрация неутилизованных фосфолипидов (в частности фосфатидилинозитидов), приводящая к нарушению ранней активности Т- и В-лимфоцитов (Дубенский, 1993).

Доказательством участия иммунных реакций в развитии БР является наличие циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), возникающих в организме в ответ на длительное антигенное раздражение при персистирующей инфекции (Espínosa et al., 1982; Ковалев, 1988; Бакулев, 1996). ЦИК приводят к активации комплемента и оказывают хемотаксическое действие на лейкоциты. Под влиянием гидролаз лейкоцитов и лимфокинов происходит демультивация антигенов простаты и серозных оболочек. В настоящее время существуют доказательства антигенного сродства между различными микроорганизмами, вызывающими БР. Так, обнаружены ЦИК, содержащие антитела к липополисахариду клеточной стенки грамотрицательных кишечных бактерий (Phillips, 1982). Сходные липополисахариды обнаружены также у сальмонелл и хламидий, что, возможно, объясняет кажущуюся полиэтиологичность БР (Агабабова, 1991).

Отложение циркулирующих иммунных комплексов в тканях – важное звено в механизме патогенетического процесса. Ковалев (1988) выявил отложение ЦИК и С3-комплемента в ткани предстательной железы, пораженных суставов и глаз. Им также были обнаружены антитела к ткани предстательной железы у 96,7% больных II стадии БР, к синовиальной оболочке сустава у 88,7%, к сосудистой оболочке глаза у 30,6% и к коже – у 14,5%. Margó и соавт. (1995) обнаружили с помощью ПИФ в кожных высыпаниях больных БР отложения IgG, IgM, С3-комплемента и специфический липополисахарид хламидий.

Обнаружение антител к собственным антигенам, выявление отложений иммунных комплексов в паренхиме предстательной железы и других органов позволило Ильину и Ковалеву (1980) выделить аутоиммунную стадию БР, следующую за инфекционно-токсической. В инфекционно-токсической стадии урогенитальный очаг становится исходным пунктом диссеминации возбудителя и поражения суставов, глаз и других органов. Во второй, аутоиммунной стадии, формируются персистирующие очаги аутоиммунного воспаления в предстательной железе, суставах и других органах. Учитывая современные данные о патогенезе болезни Рейтера (возможность диагностики возбудителя в синовиальной ткани на поздних стадиях и развитие иммунопатологического процесса на ранних стадиях заболевания), разделение на инфекционно-токсическую и аутоиммунную стадии – достаточно условно и может быть заменено описанием характера течения БР (острое, подострое, хроническое, хроническое рецидивирующее).

В патогенезе БР существенную роль играют нарушения обменных процессов. В исследованиях Маврова и соавт. (1989) было показано значительное увеличение уровня клеточного кальция в эритроцитах на фоне нормального содержания в сыворотке крови и его уменьшение в лимфоцитах. Нарушения кальциевого обмена при длительном течении процесса носят необратимый характер, что способствует развитию различных поражений опорно-двигательного характера. Изменение содержания кальция может оказывать влияние как на иммунные процессы, так и на динамику суставных поражений.

Клиническая картина БР разворачивается на фоне дисбаланса оксидантного гомеостаза организма. Основой биохимического механизма повреждения межзачаточного вещества соединительной ткани при заболеваниях суставов является специфическое действие протеаз на биологические субстраты. Избыточная протеолитическая активность при ревматических заболеваниях приводит к разрушению хрящевого матрикса, других суставных тканей, эластических волокон сосудов, кожи и внутренних органов (Насонова, Бунчук, 1997).

По данным Андерсоне и Милтинша (1990), при БР имеет место интенсификация перекисного окисления липидов клеточных мембран эритроцитов, ведущая к нарушениям их

структурной целостности, барьерной и транспортной функций. Свободнорадикальные механизмы повреждения мембран клеток способствуют выходу и активации внутриклеточных протеолитических энзимов.

Бакулев (1996) обнаружил существенные изменения в обмене протеогликанов и системе «протеазо-специфические ингибиторы» и их взаимосвязь с клиническими проявлениями заболевания. Показана ведущая роль активации пептидогидролаз в развитии клинических симптомов БР и усугубление сдвигов в системе «протеазо-специфические ингибиторы» по мере утяжеления суставного синдрома при БР. Также выявлено повышение концентраций уроновых кислот, гексоз и N-ацетилнейраминовой кислоты в крови и избыточное содержание суммарных и сульфатированных уроновых кислот и гексоз в моче, что говорит о нарушении метаболизма основного вещества соединительной ткани при БР.

При гистоморфологическом исследовании синовиальной оболочки при БР в острой стадии выявлена гипертрофия и умеренно выраженная гиперплазия синовиоцитов, гиперемия кровеносных сосудов, выраженный отек субсиновиальных тканей, лимфоцитарно-плазмоцитарная инфильтрация. Патологии костной и хрящевой ткани выявлено не было. В поздней стадии БР обнаружена мало выраженная гиперемия и отек, диффузные лимфоцитарные инфильтраты субсиновиальных тканей, пролиферация фибробластов и фиброцитов, небольшая дисплазия хрящевой ткани и эрозивные изменения костной ткани (Кузманова и соавт., 1991; Inman, Chiu, 1998). Таким образом, гистоморфологические изменения при БР неспецифичны. Однако другие авторы считают, что при БР патоморфологические признаки хронического синовита отличаются от синовитов при ревматоидном артрите и болезни Бехтерева более поверхностной локализацией (Молочков, Ильин, 1998).

Исследования клеточного состава синовиальной жидкости при БР также неспецифичны и характерны для большинства реактивных артритов: умеренный лейкоцитоз (до 50 000 в 1 мм<sup>3</sup>) и нейтрофилез, повышение содержания общего белка и  $\alpha$ -глобулинов, С3-комплемента (Стефанов, Бойкинов, 1991).

В биоптатах кожных поражений выявлена гистологическая картина, характерная для пустулезного псориаза в сочетании с признаками лейкокластического васкулита (Margo et al., 1995).

Как показывают некоторые исследования, иммунный ответ периферической крови (моноклеарных клеток) на триггерные микроорганизмы у больных БР обычно значительно слабее, чем иммунный ответ синовиальной жидкости (Hassell et al., 1997). Т-клеточный иммунитет часто выявляется в суставах больных с индуцированными хламидийными реактивными артритами (Inman et al., 1987; Bas et al., 1996; Gaston et al., 1996). CD4<sup>+</sup>-клетки играют главную роль в контроле хламидийной инфекции за счет выработки ими  $\gamma$ -интерферона (Kotake et al., 1999; Gaston, 2000), хотя были обнаружены и протективные CD8<sup>+</sup>-клетки (Thoma-Uszynsky et al., 1998; Wucherpfennig, 2001). Так, в работе Hassell и соавт. (1994) при исследовании Т-клеточного иммунного ответа синовиальной жидкости при БР обнаружен лишь специфичный CD4<sup>+</sup>-ответ, в то время как CD8<sup>+</sup>-ответ был неспецифичен.

В работе Wilkinson и соавт. (1998) при обследовании иммунного ответа синовиальной жидкости при хламидийных артритях было показано, что при позитивном результате ПЦР на наличие хламидийного антигена в суставе выявлялся слабый Т-клеточный ответ. Напротив, при негативном ПЦР-исследовании на хламидии был продемонстрирован высокий уровень синовиального Т-клеточного иммунитета.



Vas и соавт. (1996) отмечают значительное повышение внутрисуставной продукции антитламидийных IgA и IgG в синовиальной жидкости больных хламидийными артритами, что указывает на наличие хламидийного антигена в суставе.

При контакте Т-лимфоцитов с бактериальным антигеном в суставе они активируются, вырабатывая цитокины, которые контролируют воспаление и деструкцию тканей в суставе. У синовиальных  $TH_1$   $CD4^+$  Т-лимфоцитов, полученных из суставов, обнаружена спонтанная продукция  $\gamma$ -интерферона, который считается основным противовоспалительным цитокином, фактором элиминации хламидий, а также продукцией фактора некроза опухолей- $\alpha$  (Gaston, 2000). Как известно,  $\gamma$ -интерферон (ИФН- $\gamma$ ) предотвращает внутриклеточное размножение хламидий в инфицированных хламидиями эпителиальных клетках (Beatty et al., 1994). Это происходит путем продукции индоламин-2,3-диоксигеназы – фермента, катализирующего разрушение триптофана – аминокислоты, необходимой для жизненного цикла хламидий. Кроме того, ИФН- $\gamma$  индуцирует синтез оксида азота в макрофагах, что также является ингибирующим рост хламидий фактором (Stagg, 1998). Высокие дозы  $\gamma$ -интерферона полностью ингибируют рост хламидий, в то время как низкие, наоборот – индуцируют образование aberrантных форм включений, характерных для персистирующей инфекции (Shemer, Sarov, 1985).

В исследованиях Rodel и соавт. (1998) было показано, что в культуре синовиоцитов, инфицированных *Chlamydia trachomatis*, происходит продукция  $\beta$ -интерферона.  $\beta$ -интерферон является антагонистом  $\gamma$ -интерферона и его секреция приводит к ингибированию продукции  $\gamma$ -интерферона, а следовательно к развитию хламидийного артрита.

Другим антагонистом  $\gamma$ -интерферона является продуцент  $TH_2$   $CD4^+$  Т-лимфоцитов – интерлейкин-10 (ИЛ-10). Доказано, что он также присутствует в суставах, больных хламидийными артритами. В моделях хламидийной инфекции у животных показано, что освобождение организма от хламидий зависит от соотношения между продукцией  $\gamma$ -интерферона и ИЛ-10. Мыши, дефицитные по гену ИЛ-10, избавляются от хламидийной инфекции быстрее, чем нормальные животные (Yang et al., 1996). В другом исследовании, уже на людях – больных хламидийными реактивными артритами, было показано, что в синовиальной жидкости отмечаются высокие уровни ИЛ-10 при достаточно высоких уровнях  $\gamma$ -интерферона, что может приводить к персистирующей инфекции (Kotake et al., 1999). Есть данные о схожем антагонизме при реактивных хламидийных артритах между  $\gamma$ -интерфероном и ИЛ-4, ИЛ-12, ИЛ-17 (Simon, et al., 1994; Burmester, et al., 1995).

На модели хламидийной инфекции генитального тракта было показано, что нейтрализация ИЛ-12 ассоциировалась с уменьшением инфильтрации инфицированных тканей  $CD4^+$  Т-клетками, системным уменьшением продукции  $\gamma$ -интерферона и непрерывным увеличением количества бактерий. Напротив, нейтрализация ИЛ-4 не оказывала эффекта ни на подобные иммунные реакции, ни на клиренс хламидий (Perry et al., 1997). Rasmussen и соавт. (1997) на модели эндоцервикальной хламидийной инфекции показали, что *C. trachomatis* может вызывать продукцию ИЛ-1, ИЛ-6 и ИЛ-8, обладающих хемотаксическими и противовоспалительными функциями.

Другим ингибитором роста и развития хламидий, а следовательно, персистенции хламидий в суставах, является фактор некроза опухолей- $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ), вырабатываемый активированными макрофагами. Этот цитокин вместе с ИЛ-1, вырабатываемые в самом начале воспалительного процесса, активируют полиморфнонуклеарные лейкоциты, благодаря чему увеличивает

ся продукция простагландинов, коллагена и секреция ИЛ-6 и ИЛ-8. ФНО- $\alpha$  действует опосредованно, через активацию  $\beta$ -интерферона, блокирует репродукцию хламидий путем усиления экспрессии мембранных белков клеток, и, возможно, угнетения образования триптофана (Perr et al., 1997).

В работе Darville и соавт. (2000) на модели лабораторных животных было показано, что ранняя секреция высоких доз ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и ИФН- $\gamma$  эпителиальными и нуклеарными клетками ассоциировала с коротким течением инфекции. В свою очередь, длительная секреция высоких уровней ИФН- $\gamma$  значительно снижала процент осложнений при хламидийной инфекции.

Поскольку иммунитет при хламидийной инфекции требует клеточного ответа типа ТН<sub>1</sub> (выработка  $\gamma$ -интерферона, ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15), то вероятно, одновременное наличие высокого уровня активности ТН<sub>2</sub>-звена Т-лимфоцитов указывает на недостаточный ТН<sub>1</sub>-ответ на хламидии, что может приводить к персистенции хламидий в суставе (Yin, et al., 1997; Kotake et al., 1999).

Суставы являются поверхностными структурами и в связи с этим часто подвергаются микротравматизации, приводящей к незначительно выраженным воспалительным изменениям, с поступлением в суставную полость компонентов плазмы и реакцией на них синовиальных клеток. Значительная часть покровных синовиальных клеток (синовициты А) являются активными фагоцитами и способны захватывать инфекционный или любой другой антигенный материал, циркулирующий в крови и протекающий через синовиальную мембрану (Zvaifler, 1985). Очевидно, что в крупных суставах и суставах, выполняющих опорную функцию весомой нагрузки (нижние конечности и позвоночник), а также подвергающихся незначительным травмам, степень захвата антигенного материала будет больше. Соответственно, уровень поступления клеточных элементов крови будет выше в воспаленные суставы. Эти факторы могут объяснить то, что при БР поражаются в основном крупные суставы нижних конечностей и позвоночник, а также развивается воспалительный процесс в суставах, ранее подвергшихся травматизации (Olivieri et al., 1989). Таким образом, сустав можно рассматривать как потенциальный очаг местной антигенной стимуляции.

При исследованиях, посвященных распознаванию Hsp60 Т-клетками, обнаружено, что Hsp60, выделенный у *S. trachomatis*, был практически идентичен Hsp60 *S. pneumoniae*. Поскольку инфекция, вызываемая *S. pneumoniae*, широко распространена, то у большинства больных, впервые инфицированных *S. trachomatis*, иммунная система уже будет сенсibilизирована для ответа на Hsp60 *S. trachomatis* благодаря предыдущему инфицированию *S. pneumoniae* (Gaston, 2000). Это в определенной степени подтверждается исследованиями клинического течения трахомы в эндемичных районах. Ранние стадии трахомы при первичном заражении характеризовались относительно слабыми клиническими симптомами, в то время как у людей старшего возраста, перенесших повторное инфицирование, обнаруживались осложнения в виде рубцов роговицы и слепоты при малом проценте выделения культуры хламидий из пораженных тканей (Grayston et al., 1975). При реактивных артритах в редких случаях в анамнезе имеется предшествующая симптоматическая инфекция урогенитального тракта, однако возможно предшествующее инфицирование *S. pneumoniae*, которое может быть сенсibilизирующим событием. С другой стороны, возможно перекрестное реагирование по типу «молекулярной мимикрии» между Hsp60 *S. trachomatis* и человеческим Hsp60, который может распознаваться Т-клетками человеческого организма как аутоантиген

вследствие схожести их структуры. Непосредственно в пораженном суставе это может приводить к аутоиммунному процессу разрушения суставных тканей (Gaston et al., 1989).

Еще один из возможных механизмов персистирующей инфекции был показан в работах Jendro и соавт. (2000) и Geng и соавт. (2000). В этих исследованиях на культуре клеток человеческих моноцитов/макрофагов было показано, что инфицированные *Chlamydia trachomatis* макрофаги могут не только стимулировать образование Т-клеток, но и вызывать их апоптоз (запрограммированная гибель клетки). Ojcius и соавт. (1998) наблюдали апоптоз эпителиальных клеток и макрофагов, вызванный *Chlamydia psittaci*. Ранее этот механизм был описан только для вирусов, в частности для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (Badley et al., 1996). Авторы предполагают, что выявленное угнетение Т-клеточного иммунитета путем апоптоза может приводить к развитию персистирующей хламидийной инфекции, в частности при хламидийных артритах.

Одним из возможных механизмов индукции апоптоза макрофагами является выработка ими ФНО- $\alpha$ . Perfettini и соавт. (2000) в своей работе показали, что при генитальной инфекции мышей *C. trachomatis* в состоянии апоптоза находилось большее количество эпителиальных клеток, чем у неинфицированных мышей. При этом при добавлении антител против ФНО- $\alpha$  уровень апоптоза значительно уменьшался. В другом исследовании было показано, что при генитальной инфекции, вызванной *C. trachomatis*, регистрировались различные уровни ФНО- $\alpha$  в зависимости от тяжести инфекции, наличия осложнений (Darville et al., 1997). Очевидно, что относительно низкие уровни выработки ФНО- $\alpha$  будут способствовать персистенции, а высокие, наоборот, эрадикации хламидийной инфекции. Вероятно, этот факт будет иметь большое значение при лечении хламидийных артритов, поскольку терапия анти-ФНО- $\alpha$  антителами должна предотвращать Т-клеточный апоптоз и способствовать эрадикации хламидий из сустава (Weinblatt et al., 1999).

Пути распространения хламидий из мочеполовых органов до конца не изучены, но в последнее время появляется все больше данных в пользу гематогенного переноса инфекции.

В исследованиях Gerard и соавт. (1998) на модели культуры человеческих моноцитов периферической крови была показана возможность персистирования *Chlamydia trachomatis*. У микроорганизмов отмечалась массивная экспрессия белка Hsp60 при сниженной продукции белков хламидийной клеточной стенки. При этом хламидии имели внутриклеточную локализацию, атипичную форму, были метаболически активны, но не продуцировали новых ЭТ. Более того, в работе Kohler и соавт. (1997) было показано, что инфицированная хламидиями культура моноцитов не может быть реактивирована до продуктивной стадии ни путем добавления триптофана, ни удалением  $\gamma$ -интерферона.

В работах Beutler и соавт. (1995) были обнаружены включения *Chlamydia trachomatis* в моноцитах/макрофагах в синовиальной ткани больных реактивными артритами. Авторы делают предположение о том, что эти клетки являются переносчиками хламидий при гематогенной диссеминации.

Schmitz и соавт. (1993) на культуре моноцитов периферической крови *in vitro* также показали возможность персистирования *C. trachomatis* в моноцитах (методом ПЦР), при этом инфекция была непродуктивной, при сохраненной экспрессии белков клеточной стенки МОРР и ЛПС. Авторы делают вывод о том, что инфекция моноцитов периферической крови хламидиями, вероятно, может являться формой диссеминации хламидийной инфекции из урогенитального очага.

Однако в работе Nikkari и соавт. (1997) при исследовании мононуклеарных клеток периферической крови от 12 пациентов с реактивными артритами, вызванными *Chlamydia trachomatis*, ни в одном случае не были обнаружены хламидийные ДНК (использовались методы ПЦР и ЛЦР).

При проведенном в Институте дерматологии и венерологии АМН Украины исследовании методом ПЦР мононуклеарных клеток периферической крови у 8 из 20 больных (40%) обнаружена ДНК *Chlamydia trachomatis*. Все 8 больных были с хронической или с хронической рецидивирующей формой течения болезни Рейтера со средней продолжительностью заболевания 61,3 месяца. В группе ПЦР-негативных больных более 70% (7 человек из 12) составили больные с острой и подострой формами болезни Рейтера с продолжительностью болезни до 6 месяцев (Бондаренко и соавт., 2002). Вероятно, при острой и подострой форме БР длительность диссеминации хламидийной инфекции из мочеполовой системы относительно непродолжительна. Также возможно, что количество микроорганизмов в моноцитах невелико, что не позволяет определить их с помощью существующих методов диагностики.

При хронической или хронической рецидивирующей форме БР периодические рецидивы болезни могут быть связаны как с активацией урогенитальной (конъюнктивальной) инфекции и, как следствие – новой волной диссеминации хламидий в суставы, так и с активацией персистирующей хламидийной инфекции внутри суставов (вызванной разного рода «стрессовыми» иммунологическими воздействиями). В результате, вероятно, происходит выделение в кровяное русло значительно большего количества хламидий из различных очагов предшествующих диссеминаций. Это позволяет диагностировать их практически у 100% больных с данными формами болезни Рейтера. Таким образом, данное исследование доказывает гематогенный путь распространения *Chlamydia trachomatis* (в моноцитах периферической крови из первичного очага в мочеполовой системе в другие органы и системы) при венерической форме болезни Рейтера.

Вполне очевидно, что многие аспекты патогенеза болезни Рейтера на сегодняшний день остаются невыясненными. Обобщая вышеизложенное, патогенез болезни Рейтера можно представить следующим образом. Хламидийная инфекция из мочеполовой системы вместе с макрофагами/моноцитами периферической крови переносится в «предрасположенные» суставы. «Предрасположенность» опорно-двигательного аппарата может быть связана как с наследственными факторами (в том числе носительством HLA-B27), так и предшествующими травмами суставов. Возникает острый артрит, связанный с воспалительной реакцией поверхностных слоев синовиальной оболочки, с течением времени переходящий в хронический процесс более глубоких слоев суставной ткани. Острая хламидийная инфекция под действием различных иммунологических и биохимических факторов макро- и микроорганизма переходит в состояние персистенции. Периодические рецидивы артрита могут быть связаны как с активацией урогенитальной (бронхолегочной, конъюнктивальной) инфекции и, как следствие – новой волной диссеминации хламидий в суставы, так и с активацией персистирующей хламидийной инфекции внутри сустава, вызванной разного рода «стрессовыми» иммунологическими воздействиями.

### 15.3. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ТЕЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА

Клиническая картина венерической формы болезни Рейтера состоит из воспалительно-го поражения мочеполовых органов, поражения суставов и глаз. Нередко наблюдается поражения кожи и слизистой оболочки половых органов и полости рта, кишечника, сердечно-сосудистой системы, почек и других органов.



В настоящее время в мире нет единой классификации и номенклатуры БР. Все имеющиеся многочисленные классификации можно разделить на этиологические, по клиническим проявлениям, по этапам патогенеза, степени активности воспалительного процесса и характеру течения (Агабабова, Сидельникова, 1981; Keat, 1983; Шубин, 1984; Ковалев, 1988; Ильин, 1991; Завирюхин, 1993; Бакулев, Слесаренко, 2002).

### **Классификация болезни Рейтера:**

- I. Этиология возбудителя урогенитальной инфекции.
- II. Клинические проявления: характеристика поражений мочеполовой системы, опорно-двигательного аппарата, глаз, кожи и слизистой оболочки, висцеральные проявления. Обязательно указание локализации процесса, топики поражения и характера течения.
- III. Активность процесса:

*Активная:*

I степень – Незначительные и непостоянные боли в пораженных суставах, усиливающиеся при движениях. Нормальная конфигурация суставов или легкий отек мягких тканей. Отсутствие или незначительный суставной выпот. Ускорение СОЭ до 20 мм/час, СРБ – отрицательный и «1+»).

II степень – Умеренно-интенсивные боли в суставах, ограничение активных движений. Утренняя скованность. Эритема, гипертермия кожи и отек мягких тканей в проекции суставов. Выпот в полости суставов. Субфебрилитет. Ускорение СОЭ от 21 до 40 мм/час, СРБ – «1+» или «2+».

III степень – интенсивные боли в суставах в покое. Резкое ограничение активных и пассивных движений из-за сильной болезненности и значительного суставного выпота. Скованность, продолжающаяся до середины дня и более. Фебрильная температура тела. Ускорение СОЭ более 41 мм/час, СРБ – «3+» или «4+».

*Неактивная (ремиссия):* отсутствие островоспалительной активности.

### IV. Характер течения:

- 1) Острое течение (продолжительность суставной атаки до 6 месяцев).
- 2) Подострое (продолжительность суставной атаки от 7 до 12 месяцев).
- 3) Хроническое (продолжительность атаки более 12 месяцев без продолжительных ремиссий).
- 4) Хроническое рецидивирующее (обязательно с указанием количества рецидивов).

При формулировке диагноза болезни Рейтера необходимо указывать этиологический фактор, клинические синдромы, активность процесса, характер течения заболевания и номер рецидива. Например:

Диагноз: «Болезнь Рейтера (урогенитальный хламидиоз, хронический тотальный уретрит, хронический паренхиматозный простатит, фаза обострения; острый артрит правого голеностопного и левого коленного сустава; острый левосторонний конъюнктивит; острый циркулярный баланит), атака I, активность II, острое течение».

Диагностические критерии БР были сформулированы в работах Ковалева и Ильина (Ковалев, 1988; Ковалев, Ильин, 1993). Клинические признаки БР были разделены на основные, дополнительные и лабораторные, в соответствии с их диагностической значимостью. К основным признакам были отнесены негонококковый уретрит/простатит, реактивный асимметричный артрит, конъюнктивит, баланит и кератодермия. К дополнительным – мужской пол, возраст до 40 лет, связь заболевания с половым инфицированием, острое начало заболевания, ранние мышечные атрофии, отсутствие фиброзного анкилозирования, псориазиформные высыпания на коже и эрозивные поражение слизистой оболочки полости рта. К лабораторным критериям относятся антиген HLA-B27, наличие аутоантител к ткани предстательной железы, *S. trachomatis*, отсутствие ревматоидного фактора и повышение СОЭ. С нашей точки зрения, данный диагностический алгоритм наиболее полно отражает многообразные проявления БР и облегчает диагностический поиск. Использование данных критериев позволяет врачу избежать ошибок диагностики БР, число которых достигает 80% (Ковалев, Ильин, 1993).

### 15.3.1. Поражения мочеполовой системы

Наиболее часто заболевание начинается с хламидийного (или хламидийно-трихомонадного, хламидийно-уреаплазменного и т.п.) уретрита (58-71,3%), реже – с конъюнктивита (15,4%), или высыпаний на коже (13,3%) (Pollock, Handsfield, 1984; Братанова, 1986; Бажанов, Петухова, 1990; Ковалев, Ильин, 1993). Уретрит возникает обычно на 1-3 недели раньше других проявлений болезни, преимущественно после половой связи (Ивашкин и соавт., 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Молочков, Ильин, 1998; Дубенский, 1999; Carlin, Keat, 2001). Степень выраженности уретрита значительно варьирует. Однако чаще отмечается подострый процесс. Примерно у половины больных уретрит протекает малосимптомно (Keat, 1983; Ковалев, Ильин, 1993). У 64-100% больных мужчин, страдающих БР, уретрит осложняется простатитом, у 22,4% – везикулитом, у 3% – эпидидимитом (Шаткин, Мавров, 1983; Kvien et al., 1994; Calin, Taurog, 1998; Дубенский, 1999).

Воспалительные заболевания урогенитальной сферы у женщин с БР представлены уретритами, циститами, кольпитами, эндоцервицитами, сальпингоофоритами и проктитами (Братанова, 1986; Ковалев, Ильин, 1993; Молочков, Ильин, 1998; Calin, Taurog, 1998). В большинстве случаев данные воспалительные процессы протекают без клинических проявлений.

Клинические проявления воспалительных процессов мочеполовой системы подробно описаны в предыдущих разделах этой монографии, поэтому подробно останавливаться на них мы не будем.

### 15.3.2. Поражение опорно-двигательного аппарата

Поражение суставов обычно возникает одновременно с уретритом или через 1-3 месяца после начала заболевания (Братанова, 1986; Ковалев, 1988; Carlin, Keat, 2001). У 20-25% больных артрит является первым проявлением болезни (Ковалев, Ильин, 1980; Агабабова, 1991; Calin, 2000). Возможно легкое течение в виде полиартралгий или тяжелое в виде часто рецидивирующих синовитов с деформацией суставов, повышением температуры тела и нарушением функции. Процесс обычно носит множественный и несимметричный характер,

захватывая большинство суставов нижних и верхних конечностей и позвоночника (симптом «лестницы» и симптом «спирали»). Воспалительный процесс в большинстве случаев начинается с поражения коленных (65-71,7%) и голеностопных суставов (52-57,1%), мелких суставов стоп (26-29%) (Мавров и соавт., 1989; Вербенко, Кацман, 1989; Calin, Taugog, 1998; Дубенский, 1999). При поражении суставов пальцев стоп и кистей часто наблюдается поражение всех суставов одного пальца, сопровождающееся равномерным отеком мягких тканей, что придает пальцу вид «сосиски».

В среднем, в дебюте заболевания возникает асимметричный артрит 1-5 суставов преимущественно нижних конечностей. При отсутствии адекватного лечения возможно симметричное поражение суставов, поражение илиосакральных сочленений и поясничного отдела позвоночника, суставов верхней половины туловища. Полиартриты выявляются у 21-65,8% больных, моноартриты – у 7,9-68%, олигоартриты – у 26,3-76% (Doury et al., 1983; Kvien et al., 1994; Wollenhaupt et al., 1995). По сводной статистике, мелкие суставы стоп поражаются в среднем в 35-40% случаев, голеностопные – в 44-57%, коленные – в 48-70%, тазобедренные – в 12-15%, крестцово-подвздошные сочленения и поясничный отдел позвоночника – в 33-71%, суставы кистей – в 36-40%, лучезапястные – в 40-45%, локтевые – в 16-23%, плечевые – в 15-41% (рис. 15.1).

Обычно острый артрит суставов конечностей отличается остротой воспаления, протекает с выраженным отеком периартикулярных тканей, их болезненностью, умеренной гиперемией и гипертермией, наличием выпота в полости сустава. Во многих случаях нарушается общее состояние: повышается температура тела, возникает общая слабость.

Братановой (1986) описано клиническое течение болезни Рейтера у женщин. Особенности течения БР у женщин является медленное прогрессирование суставного синдрома без формирования эрозий, частое вовлечение в процесс суставов рук, многоочаговый характер урогенитального синдрома с преобладанием субклинических форм, редкость осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы.

Болезнь Рейтера у детей, по мнению большинства авторов, практически не имеет отличий от клинических проявлений у взрослых (Ильин и соавт., 1992; Лысенко и соавт., 1995). Отличиями являются: меньшая встречаемость всех составляющих триады БР, более легкое течение.

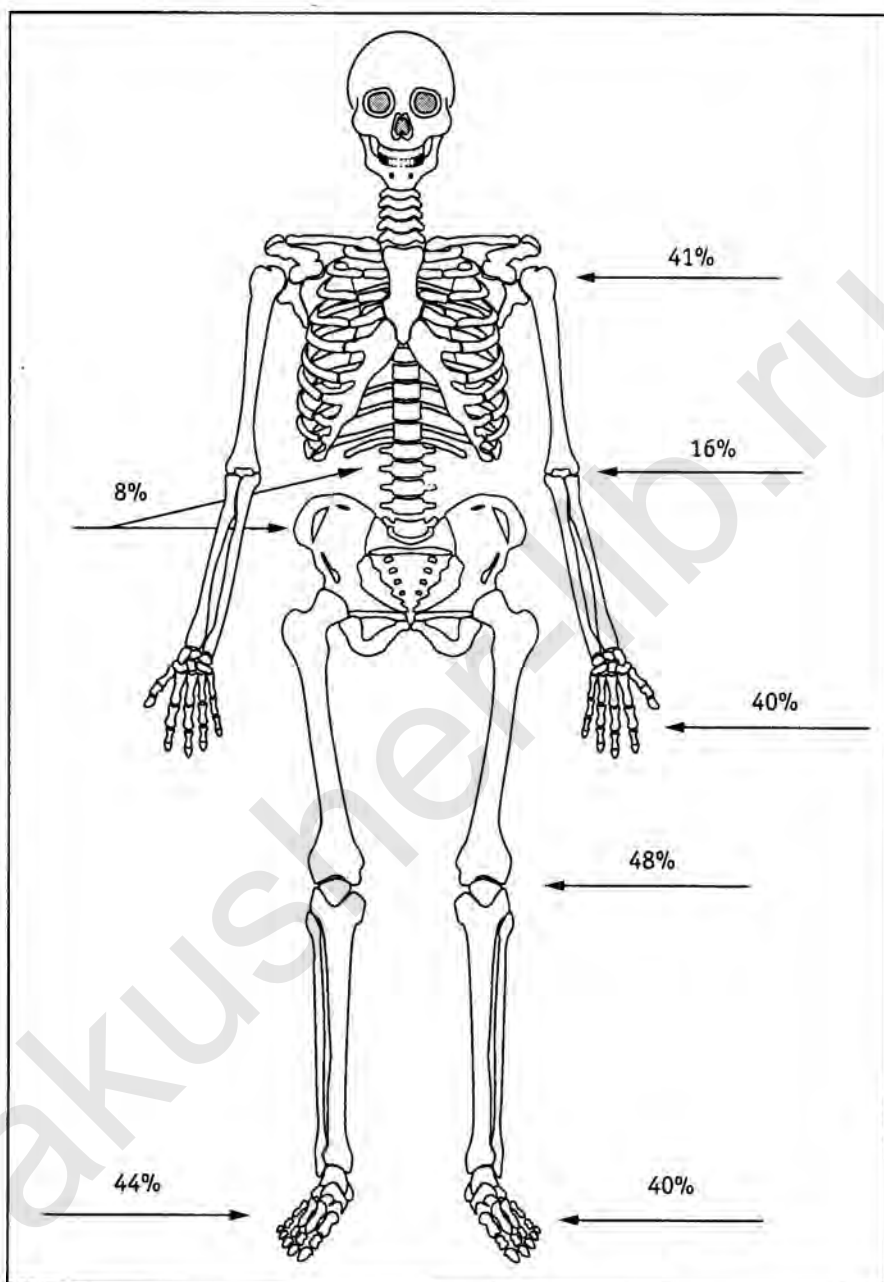
Другим важным признаком БР является поражение связочного аппарата и бурс: тендиниты, бурситы, тендосиновиты. У 20-28% больных диагностируются энтезопатии, обусловленные преимущественно подпяточным или ахиллобурситом (Мастбаум, 1993; Toivanen, 1998; Carlin, Keat, 2001).

Ранняя атрофия мышц – характерный признак БР, развивается у 48-76% больных в течение первых 2-3 месяцев заболевания. У большинства больных появлению атрофий предшествуют мышечные боли.

### **Рентгенологические изменения опорно-двигательного аппарата**

Обязательно исследование всех суставов нижних конечностей, илиосакральных сочленений и кистей, даже при отсутствии клинической симптоматики:

На ранних этапах – двусторонний асимметричный артрит дистальных отделов нижних конечностей со склонностью к эрозированию костей, периоститы в местах прикрепления связок и сухожилий к костям стоп, остеопороз и кистовидные просветления костной ткани.



**Рисунок 15.1.** Частота поражения отдельных суставов при болезни Рейтера.

Мелкие суставы стоп поражаются в 35-40% случаев, голеностопные – в 44-57%, коленные – в 48-70%, тазобедренные – в 12-15%, крестцово-подвздошные сочленения и поясничный отдел позвоночника – в 33-71%, суставы кистей – в 36-40%, лучезапястные – в 40-45%, локтевые – в 16-23%, плечевые – в 15-41% (Doury P. et al., 1983; Kvien T.K. et al., 1994; Wollenhaupt J. et al., 1995).



При хроническом течении – эрозивные изменения дистальных эпифизов, преимущественно плюсневых костей, или эпифизов фаланг 1-го пальца стопы; сужение межсуставных щелей суставов, образование остеофитов подвздошных, лонных костей, седалищных бугров, кальцинаты в мягких тканях. У 25% больных БР формируются характерные «рыхлые пяточные шпоры». Рентгенологические признаки сакроилеита по Kellgren, как правило, I-II стадии и лишь в единичных случаях, на поздних стадиях болезни, выявляется анкилозирование, чаще одностороннее, сакроилеальных сочленений (Martel, 1979; Ковалев, Ильин, 1993; Смирнов, 1995; Helliwell et al., 1998).

Эрозивные изменения суставов при болезни Рейтера, как правило, протекают доброкачественно, отсутствует склонность к фиброному анкилозированию и остеолиту.

Дополнительными методами исследования поражений суставов являются компьютерная томография и ядерно-магнитно-резонансная томография, которые необходимы в диагностически трудных случаях, особенно на ранних стадиях развития сакроилеита.

Повторное рентгенологическое исследование для оценки динамики воспалительного процесса показано через 6 месяцев для суставов конечностей и через 12 месяцев для суставов таза и позвоночника.

### 15.3.3. Поражение органов зрения

Поражение глаз при БР является одним из ранних симптомов и развивается у 55,5-94% больных, в 35-68% случаев на 2-10-й день после уретрита (Ковалев, Ильин, 1984; Stenberg, Mardh, 1991; Elnifro et al., 1999). В дебюте заболевания это чаще двусторонний конъюнктивит (51,2-84,2%) с выраженной воспалительной реакцией слизистой нижнего века, переходной складки, слизисто-гнойным отделяемым, сопровождающийся светобоязнью и блефароспазмом. Длительность острого конъюнктивита составляет от 2 дней до 1 месяца. При хронической и хронической рецидивирующей формах БР диагностируется хронический конъюнктивит. Клинически он протекает подостро, сопровождается незначительной воспалительной инфильтрацией. Помимо конъюнктивита наблюдаются и более грозные осложнения – ирит (2-11%), иридоциклит (9,2%), увеит (5-38%), кератит (3-7%) (Ковалев, Ильин, 1993; Carlin, Keat, 2001). Данные осложнения могут привести к значительной потере зрения и слепоте. Частота выявления *C. trachomatis* в клетках эпителия конъюнктивы составляет 37-50% (Григорьева, 1991).

### 15.3.4. Поражение кожи и слизистой оболочки

Поражение кожи и слизистой оболочки при БР характеризуется большим полиморфизмом и встречается, по данным разных авторов, у 10-80% больных (Amor, 1983; Doury et al., 1983; Ковалев, Ильин, 1993; Kvien et al., 1994). Обычно они развиваются через 1-2 месяца после появления уретрита. При этом чаще поражаются половые органы в виде цирцинарного баланита или баланопостита у мужчин и вульвита у женщин (18,5-42,6%). На коже туловища, ладоней и подошв могут быть явления «бленнорейной» кератодермии (1,3-33%) или псориазiformные высыпания (3,9-21,2%), высыпания на слизистой оболочке полости рта в виде афтозного стоматита (5,3-37%) (Ковалев, Ильин, 1980; Wollenhaupt et al., 1995). У 6-12% больных в патологический процесс вовлекаются ногти. По данным литературы, известно возникновение подногтевых абсцессов (Dijkstra, 1980).

Поражение кожных покровов и слизистой оболочки сопутствует обычно наиболее тяжелым формам болезни Рейтера и является неблагоприятным прогностическим фактором течения заболевания.

Поражения слизистой оболочки полости рта чаще локализируются на языке, нёбе, деснах, слизистой щек. Процесс начинается с образования гиперемированных пятен, далее трансформирующихся в малоблезненные эрозии с белесоватыми участками десквамации слизистой оболочки.

Поражения слизистой оболочки головки полового члена проявляются в виде цирцинарного и ксеротического баланита. Цирцинарный баланит характеризуется ярко-красными эрозиями с четко ограниченными краями, иногда имеющими склонность к слиянию. Появляется ранее других высыпаний и характерен для первой атаки БР. Обычно хорошо поддается местному лечению и исчезает в течение 1-2 недель. Ксеротический баланит начинается с образования папул, в дальнейшем покрывающихся корками и чешуйками. Более характерен для повторных атак БР. Несколько хуже, чем цирцинарный баланит, поддается лечению и требует назначения кортикостероидов местно.

Поражения кожи проявляются в виде «бленнорейной» кератодермии и псориазиформных высыпаний. «Бленнорейная» кератодермия начинается с образования красных пятен, затем субэпидермальных пузырьков, затем пустул, которые трансформируются в конусовидные роговые папулы или толстые, покрытые чешуйками бляшки. Локализуется обычно на подошвенной поверхности стоп, реже на ладонях, еще более редко – на других участках кожи. Диссеминированные псориазиформные высыпания представлены красными папулами, покрытыми мелкими чешуйками, склонными к слиянию и диссеминации. Расположены обычно на нижних конечностях, в области гениталий, на ягодицах, лице, в складках кожи. Характерная для псориаза триада Аусшлица отрицательная. «Бленнорейная» кератодермия и диссеминированные псориазиформные высыпания чаще возникают во время рецидивов БР и разрешаются в течение 1-2 месяцев.

Поражение ногтей чаще представлено ониходистрофией и подногтевым гиперкератозом: ногти становятся ломкими и непрозрачными, ногтевые пластинки утолщаются, могут возникать паронихии. Терапия таких поражений затруднена. Возникновение поражений ногтей и околоногтевых валиков характерно для хронического рецидивирующего течения болезни Рейтера.

### 15.3.5. Висцеральные поражения

Поражение сердечно-сосудистой системы при БР является самым частым висцеральным проявлением заболевания, однако ни один из кардиологических симптомов нельзя назвать специфичным только для болезни Рейтера. По данным разных авторов, изменения со стороны сердца диагностируются у 5-64%, больных БР (Братанова, 1986; Ковалев., 1988; Misukiewicz et al., 1992; Джус и соавт., 1995; Carlin, Keat, 2001; Ковалев, Ковалев, 2001; Бондаренко, 2001). Наиболее часто это преходящая тахикардия и бессимптомные изменения на электрокардиограмме. На ранних стадиях БР может возникать синусовая брадикардия или тахикардия, нарушения проводимости, пролапс митрального клапана, разрыв хорд, расширение устья аорты, миокардит и перикардит. В поздние сроки БР наблюдаются такие нарушения, как блокада предсердно-желудочкового пучка,

атриовентрикулярная блокада, гиперчувствительность каротидного синуса. Патология сердечно-сосудистой системы, возникающая на ранних стадиях БР, обычно обратима по мере стихания воспалительных реакций, поздние же поражения обычно необратимы и прогрессируют при рецидивах заболевания.

Неврологические нарушения при БР наблюдаются у 0,3-7,1% больных. Отмечены различные нарушения периферической (невралгии, невриты, периферические парезы) и центральной нервной системы (менингоэнцефалиты), вегетативные расстройства (Keat, 1983; Ковалев, Ильин, 1993; Toivanen, 1998). При тяжелом, затяжном течении БР возможны функциональные расстройства нервной деятельности: депрессия, нарушения сна, раздражительность (Brockington, Brierley, 1984).

Из редких проявлений БР наблюдается поражение почек (гломерулонефрит, пиелонефрит, амилоидоз), легких (пневмония, плеврит), сосудов (тромбофлебит сосудов нижних конечностей), желудочно-кишечного тракта (энтероколит, гепатомегалия) и др. (Ковалев, Ильин, 1993; Мавров, 1994; Насонова, Бунчук, 1997; Росин и соавт., 1991).

Лабораторные показатели, характерные для БР, представлены повышением СОЭ при нормальном содержании лейкоцитов, отсутствием ревматоидного фактора, повышением уровня  $\alpha$ 2-глобулинов. Синовиальная жидкость стерильна при небольшом лейкоцитозе. При необходимости проводится копрологическое и серологическое исследование (на сальмонеллез, шигеллез, иерсиниоз, кампилобактериоз) для исключения постэнтерической формы болезни Рейтера и исследование отделяемого верхних дыхательных путей и серология крови на *S. pneumoniae* для дифференциации с бронхопальмонарной формой БР.

### 15.3.6. Дифференциальный диагноз:

- Постэнтерическая форма болезни Рейтера (анамнестические данные о перенесенном энтероколите; положительные результаты исследования на сальмонеллез, шигеллез, иерсиниоз, кампилобактериоз; отсутствие хламидийной инфекции).
- Бронхопальмонарная форма болезни Рейтера (анамнестические данные о перенесенном воспалительном процессе дыхательных путей; положительные результаты исследования *S. pneumoniae*; отсутствие урогенитальной и кишечной инфекции; редкое вовлечение в патологический процесс кожных покровов).
- Гонорейный артрит (гонококкемия при наличии возбудителей в синовиальной жидкости и крови; высокий лейкоцитоз; наличие возбудителей в мочеполовой системе; эффективность пенициллинотерапии).
- Ревматоидный артрит (встречается преимущественно у женщин; положительные тесты на выявление ревматоидного фактора; воспалительный характер синовиальной жидкости; высокий фагоцитоз; характерные гистологические изменения синовиальной ткани; утренняя скованность; симметричный артрит верхних конечностей).
- Псориатический артрит (характерные высыпания на коже, возникшие до начала артрита; отсутствие урогенитальной инфекции; склонность к быстрой деструкции суставных поражений; боли в покое; частая локализация в области дистальных межфаланговых суставов кистей; начало заболевания с мелких суставов кистей и стоп; симметричные поражения суставов на ранних этапах болезни).

- Болезнь Бехтерева (симметричный характер поражения суставов; поражение позвоночника по типу «бамбуковой палки»; интенсивные боли в покое; скованность и ограничение движений в пояснично-крестцовом и вышележащих отделах позвоночника; частое поражение тазобедренных суставов; обызвествление связок позвоночника).
- Подагрический артрит (острый моноартрит с интенсивными болями в покое; образование тофусов; быстрая деформация суставов; гиперурикемия; мочекаменная болезнь).
- При дифференциальной диагностике различных серонегативных артритов существует сложная теоретическая и практическая проблема – наличие перекрестных форм. Это так называемые overlap-синдромы (клинически перекрестные формы), которые могут включать признаки различных заболеваний этой группы. В таких случаях лучше (прежде всего для больного) формулировать диагноз как «недифференцированный артрит» и продолжать динамическое наблюдение за пациентом до постановки верного диагноза.

#### 15.4. ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА

Лечение болезни Рейтера в настоящее время представляет большие сложности, что связано с отсутствием единой точки зрения относительно этиологии и патогенеза. В литературе имеется много сообщений об опыте лечения данного заболевания, однако до настоящего времени нет общепринятой методики, как нет и единого мнения о терапевтической эффективности отдельных препаратов.

В ряде руководств указывается, что ни один из методов лечения не дает эффекта (Wright, Moll, 1976; Miehle, 1981). Данные исследователи вообще не рассматривают вопросы лечения БР как нозологической единицы, а дают лишь симптоматические рекомендации, направленные на смягчение суставных поражений.

Однако большинство современных исследователей считают, что лечение БР должно быть комплексным, этиопатогенетическим (Шубин, 1991; Lauhio et al., 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Sieper et al., 1997; Carlin, Keat, 2001). Лечебные мероприятия при терапии БР можно условно разделить на 3 основных направления:

1. Антибактериальная терапия инфекции.
2. Противовоспалительная терапия суставного процесса.
3. Реабилитация.

В отношении тактики противовоспалительной терапии и реабилитации при БР большинство авторов солидарны, что же касается антибактериальной терапии, то в этом случае нет единого мнения. Ряд исследователей утверждают о неэффективности применения антибиотиков при БР и о необходимости использования в первую очередь кортикостероидов, базисных препаратов, препаратов золота и т.п. (Williams et al., 1989; Хамраев и соавт., 1990; Хитрюк, Кишко, 1991; Yli-Kerttula et al., 2000; Carlin, Keat, 2001). Другие авторы, соглашаясь с необходимостью применения антибиотиков, не могут прийти к единому мнению о длительности терапии (Ковалев, Ильин, 1980, 1993; Бажанов, Петухова, 1990; Wollenhaupt et al., 1997; Sieper et al., 1997), способе применения препарата (Машкилейсон, 1990; Хитрюк, Кишко, 1991; Молочков и соавт., 1998; Carlin, Keat, 2001) и типе антибактериального препарата (Шубин, 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Wollenhaupt et al., 1997; Дубенский, 1999; Ключарев и соавт., 2000).



Ковалевым и Ильиным (1993) была разработана методика этапного лечения, основанная на гипотезе о хламидийной этиологии БР и стадийности течения болезни. По их мнению, в инфекционной стадии болезни рано начатая противохламидийная терапия предотвращает или прерывает начавшееся заболевание. Это лечение сочетают с местным лечением очага инфекции, дезинтоксикационными и десенсибилизирующими препаратами, нестероидными противовоспалительными средствами.

В стадии иммунного воспаления, по мнению авторов, на первый план выходят аутоиммунные процессы, и антибактериальная терапия уже не способна существенно повлиять на развитие болезни. Решающее значение на этом этапе приобретают иммунодепрессивные препараты (глюкокортикоиды, цитостатики, препараты золота, противомаларийные препараты). Однако эти авторы все же рекомендуют использовать антибиотики и на этой стадии для санации очагов инфекции в мочеполовой системе, для предотвращения рецидивов.

В последние годы все чаще появляются сообщения, что начатая в ранние сроки активная антибактериальная терапия обеспечивает хороший клинический эффект (Шаткин, Мавров, 1983; Агабабова, 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Gaston, 2000).

В качестве антибактериальных средств Ковалев и Ильин (1993) предлагают использовать тетрациклин, эритромицин в течение 4-7 недель либо 2-3 курса по 7-10 дней с недельным перерывом. Эффективность использования тетрациклина и эритромицина при БР в течение 4-6 недель подтверждают и другие авторы (Шубин, 1991; Мастбаум, 1993; Дубенский, 1999).

Ряд авторов предлагают комбинированное лечение сочетаниями антибактериальных препаратов. Например, сочетанием офлоксацина или ципрофлоксацина с метациклином (Хитрюк, Кишко, 1991), доксициклина с сульфапиридазином (Машкилейсон, 1990), ципрофлоксацина с кларитромицином (Mavrov, Bondarenko, 2000).

Ключарев (2000) утверждает об эффективности использования поочередно 2-3 антибиотиков разных фармакологических групп, что дает возможность избежать рецидивов и сократить сроки лечения.

Молочковым и соавт. (1997, 1998) с целью повышения эффективности противохламидийной терапии при БР был предложен метод лимфотропного введения в голень таких антибиотиков, как ровамицин, ципробай, абактал, рифогал.

Lauhiö и соавт. (1991) провели двойное слепое плацебо-контролируемое исследование лаймоциклина, пролонгированного препарата из группы тетрациклина, на группе из 21 больного с хламидийными артритам. Препарат назначался на 3 месяца, вместе с плацебо. В результате у 50% больных из группы, получавшей антибиотик, клиническое выздоровление наступило в среднем через 15 недель, по сравнению с 39,5 недели в группе плацебо. Авторы делают вывод о высокой эффективности антибиотикотерапии при БР. Кроме того, обнаружилось, что лаймоциклин ингибирует активность коллагеназы, т.е. действует патогенетически (Lauhiö et al., 1992).

Sieper и соавт. (1997) провели 3-месячный курс ципрофлоксацина у 15 больных с реактивными артритам, в том числе хламидийной этиологии. В результате положительный клинический эффект отмечен у 66% больных в основной группе, по сравнению с 33% в группе плацебо.

Wollenhaupt и соавт. (1997) на группе из 32 больных с БР хламидийной этиологии с давностью процесса более 6 недель провели сравнительное изучение курсов терапии доксициклином (200 мг в сутки) в течение 2 недель и 4 месяцев. В результате у 27% больных, пролеченных в течение 2 недель, и у 18%, прошедших курс в 4 месяца, наступила стойкая ремиссия.

Bardín и соавт. (1992) провели ретроспективное сравнительное исследование 109 историй болезни коренных жителей Гренландии, территории с высокой частотой носительства HLA-B27, большим процентом венерических заболеваний и, как следствие, высокой распространенностью реактивных урогенных артритов. В результате выяснилось, что 37% случаев воспалительных заболеваний урогенитальной системы, получавших терапию пенициллином или не получавших лечения вообще, закончились возникновением реактивного артрита. В группе больных, получавших тетрациклин или эритромицин, процент таких осложнений составлял всего 10%.

Ключарев и соавт. (2000) провели исследование чувствительности хламидий, выделенных из урогенитального очага, к различным антибиотикам *in vitro* с использованием культур клеток L-929 и McCoу. В результате наибольшая чувствительность хламидий обнаружена к вильпрафену (джозамицину), сумамеду (азитромицину) и клациду (klarитромицину), и наименьшая – к тетрациклину и эритромицину.

Вместе с тем ряд авторов отмечают недостаточную эффективность антибактериальных препаратов при БР (Хамраев и соавт., 1990; Хитрюк, Кишко, 1991; Sieper, Braun, 1998). Williams и соавт. (1989) отмечают неэффективность использования длительных курсов терапии доксициклином при болезни Рейтера. Ряд авторов (Wakefield et al., 1999; Yli-Kerttula et al., 2000) указывают на отсутствие эффекта от использования цiproфлоксацина при БР.

Carlín и Keat (2001) предлагают для лечения БР в первую очередь использовать нестероидные противовоспалительные препараты, кортикостероиды местно и системно, короткие (до 10 дней) однократные курсы антибиотиков, при затяжном течении БР – метотрексат, азатиоприн, сульфасалазин.

В экспериментальной модели хламидийного артрита Inman и Chiu (1998) провели терапию лабораторных животных с хламидийными артритом тетрациклином и цiproфлоксацином. В случае начала лечения тетрациклином, как на ранней стадии артрита, так и на поздней стадии, при последующем исследовании синовиальной жидкости и ткани хламидии обнаружены не были. При терапии цiproфлоксацином этот препарат не мог предотвратить начало и последующую прогрессию артрита, что было лабораторно подтверждено обнаружением хламидий в воспаленном суставе.

Следует отметить широкое использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Широко используемый в предыдущие годы индометацин, как показали исследования последних лет, в эксперименте на животных вызывает угнетение роста суставного хряща и усиливает деструкцию хрящевой ткани, что делает невозможным его применение при суставной патологии (Дзяк и соавт., 1999).

При высокой степени активности процесса, упорном течении БР, выраженной экссудации, обширных кожных высыпаниях, а также при неэффективности нестероидных противовоспалительных препаратов проводят терапию кортикостероидами. Следует отметить, что согласно недавно опубликованным данным, длительные курсы лечения кортикостероидными препаратами (дексаметазон) приводят к угнетению пролиферации и дифференциации хондроцитов суставного хряща, что может явиться дополнительным патогенетическим моментом в болезни Рейтера (Zanelli et al., 2000).

Цитостатические препараты (антагонисты фолиевой кислоты – метотрексат, азатиоприн) используются при неэффективности стероидных средств, упорном течении заболевания. Противопоказаниями к их назначению является возраст до 25 лет, заболевания печени, почек

и желудочно-кишечного тракта, что существенно ограничивает применение этих препаратов при БР (Сигидин и соавт., 1994).

Препараты золота (кризанол, ауросульфат), по данным Ковалева и Ильина (1993), у больных с рецидивами и хроническим течением БР оказывают положительное влияние на суставной процесс. Вместе с тем препараты золота способны индуцировать алопецию, токсико-аллергические реакции, протеинурию, нефротический синдром и гематологические осложнения, что ограничивает возможности ауротерапии в комплексе лечения БР (Муравьев, 1995; Cuellar, Espinoza, 1996).

Общеизвестно положительное действие базисных препаратов 4-аминохинолинового ряда на течение ревматических заболеваний. В терапии БР далагил, плаквенил, хингамин используют при затяжном течении. Однако лечение хинолиновыми производными довольно продолжительно по времени, а терапевтический эффект не всегда отчетлив (Ковалев, Ильин, 1993; Сигидин и соавт., 1994). Кроме того, препараты этой группы способны вызывать изменения со стороны форменных элементов крови и стать причиной образования преципитатов в камерах глаза (Машковский, 1993).

Сульфасалазин достаточно широко используется для лечения БР (Toivanen, 1998). Показанием к его применению является затяжное течение артрита (более 3 месяцев). Однако препарат обладает выраженной токсичностью, особенно со стороны желудочно-кишечного тракта. Более того, в исследовании Egsmose и соавт. (1997) было показано, что 6-месячный курс препарата у больных реактивными артритами вызывал эффект, сходный с плацебо. Кроме того, длительный курс препарата вызывает олигоспермию у мужчин (Carlén, Keat, 2001).

#### 15.4.1. Антибактериальная терапия

Лечение БР заключается, прежде всего, в санации организма от очагов хламидийной инфекции. Активная противохламидийная терапия, начатая в ранние сроки болезни, в большинстве случаев обеспечивает хороший клинический эффект и предотвращает переход болезни в хроническую форму.

При лечении БР хламидийной этиологии антибактериальная терапия проводится максимальными суточными дозами, длительно – в течение 4-6 недель, преимущественно инфузионным методом введения. В терапии целесообразно использовать последовательно 2-3 антибиотика, курсами по 2-3 недели каждый (Бондаренко, 2001).

К антибиотикам, применяемым при лечении БР, в основном относятся препараты трех фармакологических групп: тетрациклины, фторхинолоны и макролиды.

Из препаратов первой группы наиболее предпочтительным является доксициклин для внутривенного применения, а также новые пероральные формы доксициклина – моногидрат и гиклат, отличающиеся относительно хорошей переносимостью при длительном применении. Препараты назначаются в дозе 200-300 мг в сутки. Преимуществом препарата является его высокая противохламидийная активность и сродство с костной тканью. Кроме того, тетрациклины ингибируют активность коллагеназы, подавляют образование супероксидных радикалов и снижают интенсивность клеточного иммунитета, т.е. действуют патогенетически.

Антибиотики из группы фторхинолонов обладают уникальным механизмом действия, основанным на угнетении фермента, ответственного за рост и деление бактериальной клетки.

Преимуществом при лечении БР обладают парентеральные формы офлоксацина, ципрофлоксацина и левофлоксацина. Препараты обладают прекрасным системным действием, в высоких концентрациях накапливаются в тканях и сыворотке крови, оказывают минимальное воздействие на микрофлору кишечника. Ципрофлоксацин назначается в суточной дозировке 0,4-0,8 г, офлоксацин – 0,4-0,6 г в сутки, левофлоксацин – 0,5-0,75 г в сутки. Недостатком препаратов является относительно короткий срок применения, ограниченный двумя, реже тремя неделями.

Наибольшее значение, с нашей точки зрения, в этиотропной терапии венерической формы БР имеют макролидные антибиотики. Макролиды обладают высоким показателем биодоступности и быстрым нарастанием высокой внутриклеточной концентрации, что обуславливает их хороший эффект при лечении внутриклеточных инфекций. По сравнению с тетрациклинами и фторхинолонами, макролиды обладают наилучшими показателями переносимости, что позволяет с минимальным риском для пациента использовать их в течение продолжительного курса лечения, что особенно важно для терапии БР, вызванной *Chlamydia trachomatis*. При лечении хламидийных артритов макролиды назначаются в следующих дозировках: эритромицин 1,5-2 г в сутки, спирамицин 9-12 млн. ЕД в сутки, рокситромицин 0,3-0,45 г в сутки, медирамицин 1,6-2,0 г в сутки, азитромицин 0,5-1,0 г в сутки, кларитромицин 0,5-1,0 г в сутки, джозамицин 1,0-1,5 г в сутки.

С целью коррекции иммунного статуса рекомендуется назначение иммуномодуляторов, индукторов интерферона, аутоультрафиолетового облучения крови, лимфоцито-, плазмозореа, внутривенной и надвенозной квантовой терапии и адаптогенов. Для улучшения проникновения антибиотика в зону воспаления используются протеолитические ферменты (химотрипсин, трипсин, вобензим).

Параллельно с курсом антибактериальной терапии рекомендуется применение противогрибковых препаратов, гепатопротекторов, дезинтоксикационной, десенсибилизирующей терапии, транквилизаторов и поливитаминов.

При патологии глаз наряду с общим лечением назначается и местное лечение. Поражение органов зрения при болезни Рейтера требует обязательной консультативной и лечебной помощи врача-офтальмолога. При конъюнктивите показаны аппликации антибиотиков (тетрациклиновая, эритромициновая мазь) 4 раза в день в течение 2-4 недель. При более грозных осложнениях (увеит, кератит и др.) показано как местное, так и общее введение кортикостероидов, иммуномодуляторов, физиолечение.

Лечение поражения кожи и слизистой оболочки проводится в соответствии с основными принципами лечения кожных болезней. При кератодермии используют кератолитические мази, при псориазiformной сыпи и ксеротическом баланите назначаются кортикостероидные мази. При циркулярном баланите – ванночки, при афтозном стоматите – полоскания полости рта дезинфицирующими растворами (Ковалев, Ильин, 1984; Григорьева, 1991; Stenberg, Mardh, 1991; Tabbara et al, 1998).

#### 15.4.2. Противовоспалительная терапия суставного процесса

Для подавления воспалительной активности суставного процесса используются препараты следующих трех групп: нестероидные противовоспалительные препараты, кортикостероиды (глюкокортикоиды), базисные препараты и цитостатики.



Нестероидные противовоспалительные препараты при терапии БР назначаются предпочтительно в виде суппозиторий либо в таблетированной форме. К этой группе относятся ибупрофен, диклофенак, пироксикам, кетопрофен, немесулид, мелоксикам и др. При значительной выраженности воспалительного процесса, особенно в острой стадии, возможно применение инъекционных форм. Учитывая, что больные БР принимают эти препараты в течение длительного времени и к ним быстро развивается устойчивость, рекомендуется каждые 10 суток менять применяемые препараты.

Глюкокортикоиды (преднизолон, триамцинолон, гидрокортизон, дексаметазон, бетаметазон) допустимо применять в острой стадии и фазе обострения БР на фоне антибиотикотерапии короткими курсами в течение 20-25 суток с постепенным снижением дозы и переходом на нестероидные противовоспалительные средства. Кортикостероиды быстро купируют воспалительный процесс и предотвращают рецидивы заболевания.

Базисные препараты и цитостатики иногда применяются для лечения венерической формы болезни Рейтера. Считается, что их необходимо использовать при затяжных и хронических формах БР при недостаточной эффективности антибиотикотерапии.

По мере купирования острого процесса назначаются физиопроцедуры на область пораженных суставов. Используется фонофорез протеолитических ферментов и кортикостероидов, УВЧ, магнитное поле, инфракрасное, красное лазерное излучение, а также согревающие компрессы с мазями обезболивающего и противовоспалительного действия.

### 15.4.3. Реабилитация

Реабилитационные мероприятия должны быть направлены на восстановление функции опорно-двигательного аппарата. Лечебную физкультуру назначают на самых ранних этапах заболевания, и ее объем постепенно увеличивают по мере стихания воспалительного процесса в суставах. Показан лечебный массаж, особенно при мышечных атрофиях. В последующем больным показано санаторно-курортное лечение (радоновые, сероводородные ванны, грязелечение) (Шубин, 1991; Ковалев, Ильин, 1993; Cuellar, Espinoza, 1996; Carlin, Keat, 2001).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Айзятупов, Р.Ф., *Заболелания, передаваемые половым путем (этиология, клиника, диагностика, лечение) – иллюстрированное руководство*, Донецк, Донецчина, 2000. – 384 с.
2. Бабюк, І.О., Горпинченко, І.І., Федотов, В.П., Радіонов, В.Г., Картавец, Р.Л. 2000. *Профілактика трансмісивно-сексуальних хвороб серед молоді. Метод, рекомендації.* - Донецьк: ІНВХ АМН України, 2000. – 33 с.
3. Басилайшвили, О.В., Маврова, Д.И. 2002. Случай генерализованной хламидийной инфекции у новорожденного. *Дерматологія та венерологія*. 1(15): 44-45.
4. Белозоров, А.П. 2001. Новая классификация микроорганизмов порядка *Chlamydiales*. *Журнал дерматологія та венерологія*, 2(12): 10-13.
5. Белозоров, А.П., Федец, О.И. Милютина, Е.И. Джораева, С.К. 2001. Сравнительный анализ некоторых новых методов диагностики урогенитального хламидиоза. *Дерматологія та венерологія*. 11(1): 42-44.
6. Бондаренко, Г.М. 2002. Современные данные о распространенности болезни Рейтера. *Дерматологія та венерологія*. 3(17): 42-45.
7. Бондаренко, Г.М., Мавров Г.И., Кондакова А.К., Федец О.И. 2002. Обнаружение ДНК *Chlamydia trachomatis* в моноцитах периферической крови при болезни Рейтера. *Дерматологія та венерологія*, 1(19): 42-45.
8. Возианов А.Ф., Ващенко, В.В., Дранник, Г.Н., Руденко, А.В., Дриянская, В.В., Горпинченко, И.И. 2002. *Лабораторная диагностика урогенитального хламидиоза (методические рекомендации)*. Академия медицинских наук, Киев, 2002. – 18 с.
9. Возианов, А.Ф., Г.Н. Дранник, Т.С. Монга В.В. Ващенко, В.В. Дриянская. 2002. Взаимосвязь активности синтеза цитокинов (гамма-интерферона, интерлейкина-10) и HLA-фенотипа у больных с хроническим мочеполовым хламидиозом. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*, 2(5): 57-50.
10. Возианов, А.Ф., Дранник, Г.Н., Руденко, А.В. и др. 2000. Девиация функциональной активности Т-хелперов I и II типов как фактор иммунопатогенеза хронического урогенитального хламидиоза. *Intern. J. Immunorehabil.* 2(1): 95-101.
11. Глазкова, Л. К., Акилов, О. Е. 1999. Практические аспекты персистирующей хламидийной инфекции. *ИППП* 4: 29-34.
12. Глазкова, Л.А., Герасимова, Н.М. 1996. *Хламидийная инфекция у детей: Методическое пособие*. Екатеринбург, 1996. – 34 с.
13. Гомберг, М.А, Соловьев, А.М. 2001. Антибиотики тетрациклинового ряда в терапии хламидийной инфекции. *ИППП*, 2: 14-19.
14. Гомберг, М.А., Ковалык, В.П. 2002. Хламидиоз и простатиты. *Инфекции, передаваемые половым путем*, 4:3-8.
15. Горпинченко, И.И., Гибнер, С.М. 2000. *Хламидиоз в урологической и андрологической практике (методические рекомендации)*, Академия медицинских наук, Киев, 2000. – 29 с.
16. Гранитов, В. М. 2000. *Хламидиозы*. -- М. 2000. – 230 с.
17. Дмитриев Г.А. 2002. Урогенитальная хламидийная инфекция. Подходы к диагностике и терапии. *Инфекции, передаваемые половым путем*, 2: 21-24.

18. Ершов, Ф.И. *Система интерферона в норме и при патологии*. – М.: Медицина, – 1996. – 240 с.
19. Кисина, В.И., Канишева, Е.Ю. 2002. Воспалительные заболевания органов малого таза у женщин их связь с инфекциями, передаваемыми половым путем, Диагностика, лечение, профилактика. Часть II. *Вестник дерматологии и венерологии*, 4: 16-23.
20. Ключарев, Г.В., Старченко, М.Е., Ключарева, С.В., Смирнова, О.Н. 2000. Критерии диагностики и принципы антибактериальной терапии болезни Рейтера. *Вестн. дерматол. венерол.*, 5: 54-57
21. Ковалев, Ю.Н., Ильин, И.И., 1993. *Болезнь Рейтера*. Вариант-Книга, Челябинск. – 1993. – 239 с.
22. Коляденко, В. Г., Степаненко, В.И., Мавров, И.И. и др. 1999. *Лабораторная диагностика заболеваний, передающихся половым путем, методом полимеразной цепной реакции (методические рекомендации)*. Киев. – 1999. – 18 с.
23. Кутюва, В.В., Гончаренко, В.В. 1999. Роль серологических исследований при выявлении хламидийной инфекции у детей с различными диагнозами (ретроспективный анализ). *Журнал дерматологии и венерологии*, 2(8): 103-105.
24. Мавров, Г. И., Мальцева, Т.В. 2003. Гистопатология маточных труб у больных с хламидийной инфекцией. *Журнал АМН України*, 9(1): 185-193.
25. Мавров, Г.И. 1995. Взаимодействие *Chlamydia trachomatis* со сперматозоонами человека: электронно-микроскопическое исследование. *Мікробіологічний журнал*, 57(2): 74-79.
26. Мавров, Г.И. 1996. *Chlamydia trachomatis* в просвете капилляров маточных труб: возможность гематогенного распространения инфекции. *Журн. Академії медичних наук України*, 2(4): 704-711.
27. Мавров, Г.И. 2002. Нарушение половой функции женщин при хламидийной и уреоплазменной инфекции. *Журнал дерматологии и венерологии*, 3(17): 46-48.
28. Мавров, Г.И., Бондаренко, Г.М. 2004. Продукция цитокинов у больных болезнью Рейтера: повышение активности периферической крови по сравнению с синовиальной жидкостью // *Імунологія та алергологія*, 2: 13-18.
29. Мавров, Г.И., Нагорный, А.Е. 2002. Применение джозамицина в сочетании с препаратами растительного происхождения – эхинацеом и силибицином для лечения урогенитального хламидиоза. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*, 1(4): 75-79.
30. Мавров, Г.И., Чинов, Г.П. 2004. Роль цитокинов в патогенезе хламидиоза. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*, 1(12): 53-59.
31. Мавров, Г.И., Чинов, Г.П. 2005. Опыт применения индуктора интерферона кагоцела в терапии хламидиоза. *Дерматологія та венерологія*, 2(28): 64-71.
32. Мавров, Г.И., Бондаренко, Г. М., Чинов, Г.П., Нагорный, О.Є., Щербаків, Ю.В. *Патогенетична терапія хворих на резистентний герпес, хламідіоз та сифіліс шляхом регулювання цитокінового профілю. Методичні рекомендації*. МОЗ України, АМН України, Київ. – 2005. – 22 с.
33. Мавров, И.И. 2001. Оценка эффективности доксициклина моногидрата при лечении больных мочеполовым хламидиозом. *Журнал дерматологии и венерологии*, 2(12): 79-80.
34. Мавров, И.И. 2001. Тенденции и проблемы в лабораторной диагностике заболеваний, передающихся половым путем. *Дерматологія та венерологія*, 2(12): 19-29.

35. Мавров, И.И. 2002. *Половые болезни*. М.: «АСТ-ПРЕСС». – 2002. – 752 с.
36. Мавров, И.И. 2001. Хламидийная инфекция: активное изучение проблемы. *Журнал дерматологии и венерологии*, 12: 4-10.
37. Потекаев, Н.С., Пашинян, М.Г., Пашинян, А.Г., Потекаев Ю.Н., Львов, А.Н. 2000. Вильпрафен (джозамицин) в терапии урогенитального хламидиоза. *Вестник дерматологии и венерологии*, 1: 48-50.
38. Прохоренков, В.И., Шапран, М.В. 2002. О классификации урогенитального хламидиоза. *ИППП*, 2: 3-6.
39. Проценко, Т.В. 1998. *Хламидиоз: принципы диагностики, лечения, стратегии мониторинга. Методические указания для врачей дермато-венерологов, акушеров-гинекологов, урологов, педиатров*. Украинская ассоциация планирования семьи, Донецк. – 1998. – 8 с.
40. Рудык, Ю.С. 2002. К вопросу о роли *Chlamydia pneumoniae* в течении острого инфаркта миокарда. *Журнал дерматологии и венерологии*, 15: 10-15.
41. Скрипкин, Ю.К., Кубанова, А.А., Дмитриев, Г.А., Киселев, В.И., Вахнина, Т.Е., Коликова Т.Г. 1996. Современные подходы к диагностике хламидиоза. *Вестник дерматологии и венерологии*, 4: 26-29.
42. Хаитов, Р.М., Пинегин, Б.В. 2000. Современные иммуномодуляторы: основные принципы их применения. *Иммунология*, 5: 4-7.
43. Хрянин, А.А., Решетников, О.В., Кривенчук, Н.А. 2001. Эпидемиология хламидийной инфекции (*Chlamydia trachomatis*) в крупном промышленном центре Западной Сибири. *Вестник дерматологии и венерологии*, 1: 54-57.
44. Чеботарев, В. В. 2002. Дискуссионные вопросы урогенитальных инфекций. *Российский журнал кожных и венерических болезней*, 1: 53-59.
45. Шаткин, А.А., Мавров, И.И. 1983. *Урогенитальные хламидиозы*. – К.: Здоров'я. – 1983. – 200 с.
46. Amann, R., N. Springer, W. Schonhuber, W. Ludwig, E. N. Schmid, K. D. Muller, and R. Michel. 1997. Obligate intracellular Bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 115-121.
47. Bas, S., Muzzin, P., Ninet, B., Bornand, J. B., Scieux, C. and Vischer, T. L. 2001. *Chlamydial* serology: comparative diagnostic value of immunoblotting, microimmunofluorescence test, and immunoassays using different recombinant proteins as antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 1368-1377.
48. Black, C. M., Marrazzo, J., Johnson, R. E., Hook, E. W. 3<sup>rd</sup>, Jones, R. B., Green, T. A., Schachter, J., Stamm, W. E., Bolan, G., St Louis, M. E. and Martin, D. H. 2002. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3757-3763.
49. Boman J., Allard A., Persson K., Lundborg M., Juto P., Wadell G. 1997. Rapid diagnosis of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by nested touch-down polymerase chain reaction compared with culture and antigen detection by EIA. *J. Infect. Dis.* 175: 1523-1526.
50. Brunham R.C.; Zhang D.J.; Yang X.; McClarty G.M. 2000. The potential for vaccine development against chlamydial infection and disease. *J Infect Dis.* 181(Suppl.3): S538-43.
51. Bush, R. M., and K. D. Everett. 2001. Molecular evolution of the Chlamydiaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 203-220.
52. Centers for Disease Control and Prevention. 2002. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. *MMWR*, 51 (No. RR-6): 48 p.



53. Chan, E. L., Brandt, K., Olien, K., Antonishyn, N. & Horsman, G. B. 2000. Performance characteristics of the Becton Dickinson ProbeTec System for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male and female urine specimens in comparison with the Roche Cobas System. *Archives of Pathology Laboratory Medicine*, 124: 1649-1652.
54. Cheng, H., Macaluso, M., Vermund, S. H. & Hook, E. W. 3<sup>rd</sup>. 2001. Relative accuracy of nucleic acid amplification tests and culture in detecting *Chlamydia* in asymptomatic men. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3927-3937.
55. Chernesky, M. A. 2002. *Chlamydia trachomatis* diagnostics. *Sexually transmitted infections*, 78: 232-234.
56. Ciervo, A., Visca, P., Petrucca, A., Biasucci, L. M., Maseri, A., Cassone, A. 2002. Antibodies to 60-Kilodalton Heat Shock Protein and Outer Membrane Protein 2 of *Chlamydia pneumoniae* in Patients with Coronary Heart Disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 9: 66-74.
57. Dale A, Wilson J, Forster G, Daniels D, Brook G. 2001. Management of chronic prostatitis in Genitourinary Medicine clinics in the United Kingdom's North Thames Region 2000. *International Journal of STD and AIDS*, 12: 256-259.
58. Darwin, L. H., Cullen, A. P., Arthur, P. M., Long, C. D., Smith, K. R., Girdner, J. L., Hook III, E. W., Quinn, T. C. & Lorincz, A. T. 2002. Comparison of Digene Hybrid Capture 2 and Conventional Culture for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Cervical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 641-644.
59. Domeika M, et al., 2002. *Chlamydia trachomatis* infections in eastern Europe: legal aspects, epidemiology, diagnosis, and treatment. *Sex Transm Infect.*, 78(2): 115-9.
60. Everett, K. D. 2000. *Chlamydia and Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.*, 75: 109-126.
61. Fan, T., H. La, H. Hii, L. Shi, G. A. McClarty, D. W. Nance, A. H. Greenberg, and G. Zhong. 1998. Inhibition of apoptosis in *chlamydia*-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J. Exp. Med.*, 187: 487-496.
62. Gaston J.S.H. 2000. Immunological basis of *Chlamydia* induced reactive arthritis. *Sex. Transm. Inf.*, 76: 156-161.
63. Grayston J.T. 1999. Does *Chlamydia pneumoniae* cause atherosclerosis? *Arch. Surg.*, 134: 930-934.
64. Hammerschlag, M. R. 2000. The Role of *Chlamydia* in Upper Respiratory Tract Infections. *Current Infectious Disease Reports*, 2: 115-120.
65. Haranaga, S. H. Yamaguchi, H. Friedman, Sh. Izumi, Y. Yamamoto. 2001. *Chlamydia pneumoniae* Infects, Multiplies in Lymphocytes in Vitro. *Infect. Immun.*, 69: 7753-7759.
66. Hatch, T. P. 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J. Bacteriol.*, 178:1-5.
67. Hawkins R.A., R.G. Rank, K.A. Kelly. 2002. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* Mouse Pneumonitis Major Outer Membrane Protein by Use of CpG Oligodeoxynucleotides as an Adjuvant Induces a Protective Immune Response against an Intranasal Chlamydial Challenge. *Infect. Immun.*, 70(9): 4812-4817.
68. Herieka, E. & Dhar, J. 2001. Acute neonatal respiratory failure and *Chlamydia trachomatis*. *Sexually Transmitted Infections*, 77: 135-136.
69. Hyde S.R., K. Benirschke. 1997. Gestational psittacosis: case report and literature review.

- Mod. Pathol.*, 10: 602-607.
70. Inman R.D., Whittum-Hudson J.A., Schumacher H.R. Jr., Hudson A.P. 2000. *Chlamydia* and associated arthritis. *Curr. Op. Rheumatol*, 12: 254-262.
  71. Kahane S, Everett KD, Kimmel N, et al. 1999 Simkania negevensis strain ZT: growth, antigenic and genome characteristics. *Int J Syst Bacteriol*, 49: 815-820.
  72. Kalman, S., W. Mitchell, R. Marathe, C. Lamme, J. Fan, R. W. Hyman, L. Olinger, J. Grimwood, R. W. Davis, and R. S. Stephens. 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat. Genet.*, 21: 385-389.
  73. Kaul, R., J. Uphoff, J. Wideman, S. Yadlapalli, W. M. Wenman. 2000. Detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in CD3+ lymphocytes from healthy blood donors, patients with coronary artery disease. *Circulation*, 102: 2341-2346.
  74. Kol, A., A.H. Sukhova, A.H. Lichtman, and P. Libby. 1998. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*, 98: 300-307.
  75. Koskela P., Anttila T., Björge T., et al. 2000. *Chlamydia trachomatis* infection and invasive cervical carcinoma. *Int. J. Cancer*, 85: 35-39.
  76. Kuo C.C., Shor A., Campbell LA., et al. 1993. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*; 167: 841-849.
  77. Kutlin A., Roblin P.M., Hammerschlag M.R. 1998. Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *J. Infect. Dis.*, 177: 720-724.
  78. Lau, C.Y., Qureshi A.K. 2002. Azithromycin versus doxycycline for genital *chlamydial* infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sex. Transm. Dis.*, 29(9): 497-502.
  79. Maass M., C. Bartels, P.M. Engel U. Mamat, H.H. Sievers. 1998. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 31: 827-832.
  80. Mabey D. and Peeling R. W. 2002. Lymphogranuloma venereum. *Sex. Transm. Inf.*, 78: 90-92.
  81. Mahdi, O. S., Horne, B. D., Mullen, K., Muhlestein, J. B., Byrne, G. I. 2002. Serum Immunoglobulin G Antibodies to Chlamydial Heat Shock Protein 60 but Not to Human and Bacterial Homologs Are Associated With Coronary Artery Disease. *Circulation*, 106: 1659-1663.
  82. Mavrov, G.I., and G.M. Bondarenko. 2002. Evolution of Venereal Diseases in Ukraine. *Sex. Transm. Infect.*, 78: 219-221.
  83. Meijer A., P. J. M. Roholl, S.K. Gielis-Propert and J. M. Ossewaarde. 2000. *Chlamydia pneumoniae* antigens, rather than viable bacteria, persist in atherosclerotic lesions. *J Clin Pathol.*, 2000, 53: 911-916.
  84. Morrü S.A., J. M. Ossewaarde, P.H. Savelkoul, et al. 2000. Analysis of genetic heterogeneity in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates of serovars D, E, and F by amplified fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.*, 38(9): 3463-6.
  85. Moulder, J. W. 1993. Why is *Chlamydia* sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infect. Agents Dis.*, 2: 87-99.
  86. Moulder, W.J. 1991. Interaction of *chlamydia* and host cells *in vitro*. *Microbiol. Rev.*, 55: 143-190.
  87. Mutlu, B., Mutlu, N. & Yucesoy G. 2001. The inci-

- dence of *Chlamydia trachomatis* in women with urethral syndrome. *International Journal of Clinical Practice*, 55: 525-526.
88. Ness R.B, Soper D.E, Holley R.L, et al., 2000. Hormonal and barrier contraception and risk of upper genital tract disease in the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185: 121-127.
89. Ojcius, D. M., Y. B. de Alba, J. M. Kanellopoulos, R. A. Hawkins, K. A. Kelly, R. G. Rank, and A. Dautry-Varsat. 1998. Internalization of *Chlamydia* by dendritic cells and stimulation of *Chlamydia*-specific T cells. *J. Immunol.*, 160: 1297-1303.
90. Ossewaarde J.M., Feskens E.J.M., de Vries A., Vallinga C.E., Kromhout D. 1998. *Chlamydia pneumoniae* is a risk factor for coronary heart disease in symptom-free elderly men, but *Helicobacter pylori* and cytomegalovirus are not. *Epidemiol. Infect.*, 120: 93-99.
91. Paavonen, J. 2001. *Chlamydia trachomatis* and cancer. *Sexually Transmitted Infections*, 77: 154-156.
92. Pal S., H.L. Davis, E.M. Peterson, L.M. De La Maza. 2002. Immunization with the *Chlamydia trachomatis* Mouse Pneumonitis Major Outer Membrane Protein by Use of CpG Oligodeoxynucleotides as an Adjuvant Induces a Protective Immune Response against an Intranasal *Chlamydial* Challenge. *Infect. Immun.*, 70(9): 4812-4817.
93. Peterson, E. M., L. M. de la Maza, L. Brade, and H. Brade. 1998. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 66: 3848-3855.
94. Popov V.L., A.A. Shatkin, V.N. Pankratova, N.S. Smirnova, C.H. von Bonsdorff, M.R. Ekman, P. Saikku. 1991. Ultrastructure of *Chlamydia pneumoniae* in cell culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84: 129-134.
95. Reeves P. (ed.), *Chlamydial Infections*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1987.
96. Rockey, D. D., J. Lenart, and R. S. Stephens. 2000. Genome Sequencing and Our Understanding of *Chlamydiae*. *Infect. Immun.*, 68: 5473-5479.
97. Saikku P. (ed), 2000, *Proceedings 4<sup>th</sup> Meeting of the Society for Chlamydia research*, Helsinki, Finland, August 20-23, Universitras Helsingiensis, 2000, 441 p.
98. Schachter J. et al., (eds), 2002 *Chlamydial infections*. Proceedings of the tenth international symposium on human chlamydial infections, *International Chlamydia Symposium*, San Francisco, CA/
99. Schramm, N., and P. B. Wyrick. 1995. Cytoskeletal requirements in *Chlamydia trachomatis* infection of host cells. *Infect. Immun.*, 63: 324-332.
100. Shaw J., V. Grund, L. Durling, D. Crane, H.D. Caldwell 2002. Dendritic cells pulsed with a recombinant chlamydial major outer membrane protein antigen elicit a CD4(+) type 2 rather than type 1 immune response that is not protective. *Infect. Immun.*, 70(3): 1097-105.
101. Skerk, V., Barsic, B., Car, V., Schonwald, S. & Klinar, I. 2000. Comparative analysis of azithromycin and doxycycline efficacy in the treatment of female patients with acute urethral syndrome caused by *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Chemotherapy*, 12: 186-188.
102. Stephens R. S. (ed), 1999 *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis, and immunity/1999*, American Society for Microbiology, Washington, DC, 311 p.
103. Stephens R. S., G. I. Byme, G. Christiansen, I. N. Clarke, J. T. Grayston, R. G. Rank, G. L. Ridgway, P.

- Saikku, J. Schachter, and W. E. Stamm (ed.), 1998, *Chlamydial Infections*. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human *Chlamydial* Infection. International Chlamydia Symposium, San Francisco, Calif.
104. Stephens, R. S., S. Kalman, C. Lammef, J. Fan, R. Marathe, L. Aravind, W. P. Mitchell, L. Olinger, R. L. Tatusov, Q. Zhao, E. V. Koonin, and R. W. Davis. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*, 282: 754-759.
105. Su, H., R. Messer, W. Whitmire, E. Fischer, J. C. Portis, and H. D. Caldwell. 1998. Vaccination against chlamydial genital tract infection after immunization with dendritic cells pulsed *ex vivo* with non-viable chlamydiae. *J. Exp. Med.*, 188: 809-818.
106. Svanholm, C., L. Bandholtz, E. Castanos-Velez, H. Wigzell, M.E. Rottenberg 2000. Protective DNA immunization against *Chlamydia pneumoniae*. *Scand. J. Immunol.*, 51(4): 345-353.
107. Vanrompay D., M. Vanloock, E. Cox, B.M. Goddeeris, G. Volckaert. 2001. Genetic immunization for *Chlamydia psittaci*. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.*, 63(2): 177-188.
108. Wallin, K. L., Wiklund, F., Luostarinen, T., Angstrom, T., Anttila, T., Bergman F et al., 2002. A population-based prospective study of *Chlamydia trachomatis* infection and cervical carcinoma. *International Journal of Cancer*, 101: 371-374.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	5
<b>ГЛАВА 1. ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР ИЗУЧЕНИЯ ХЛАМИДИЙ .....</b>	<b>6</b>
1.1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА .....	6
1.2. ПАТОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ .....	8
1.3. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА .....	12
1.4. ЛЕЧЕНИЕ .....	17
<b>ГЛАВА 2. ТАКСОНОМИЯ ХЛАМИДИЙ .....</b>	<b>17</b>
2.1. ТАКСОНОМИЯ <i>CHLAMYDIALES</i> .....	17
2.1.1. Семейство <i>Chlamydiaceae</i> .....	23
2.1.2. Семейство <i>Parachlamydiaceae</i> .....	24
2.1.3. Семейство <i>Simkaniaceae</i> .....	24
2.1.4. Семейство <i>Waddliaceae</i> .....	24
2.2. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА <i>CHLAMYDIALES</i> .....	25
2.2.1. Род <i>Chlamydia</i> .....	25
2.2.2. Род <i>Chlamydoxyla</i> .....	28
2.2.3. Семейство <i>Parachlamydiaceae</i> .....	32
2.2.4. Семейство <i>Waddliaceae</i> .....	36
<b>ГЛАВА 3. СТРУКТУРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ <i>CHLAMYDIALES</i> .....</b>	<b>37</b>
3.1. ОБЩАЯ МОРФОЛОГИЯ .....	37
3.2. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ .....	39
3.2.1. Прикрепление и внедрение .....	40
3.2.2. Внутриклеточное развитие .....	45
3.2.3. Влияние на клетку-хозяина .....	53
3.3. СТРУКТУРА И БИОХИМИЯ ХЛАМИДИЙ .....	57
3.3.1. Клеточная стенка .....	57
3.3.2. Нуклеоид .....	73
<b>ГЛАВА 4. ГЕНОМ <i>CHLAMYDIACEAE</i> .....</b>	<b>75</b>
4.1. ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ХЛАМИДИЙ .....	75
4.2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА ХЛАМИДИЙ .....	76
4.2.1. Гены, ответственные за метаболизм .....	91

4.2.2. Гены, ответственные за структуру .....	92
4.3. ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ .....	94
4.4. СРАВНЕНИЕ ГЕНОМОВ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> И <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA</i> .....	96
<b>Г Л А В А 5. МЕТАБОЛИЗМ <i>CHLAMYDIALES</i> .....</b>	<b>97</b>
5.1. СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ .....	99
5.2. СИНТЕЗ ГЛИКОГЕНА .....	100
5.3. СИНТЕЗ ЛИПИДОВ .....	101
5.4. СИНТЕЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ .....	103
5.5. СИНТЕЗ ПЕПТИДОГЛИКАНА .....	104
5.6. МЕТАБОЛИЗМ АМИНОКИСЛОТ .....	104
5.7. МЕТАБОЛИЗМ КОФАКТОРОВ .....	106
5.8. МЕТАБОЛИЗМ НУКЛЕОТИДОВ .....	107
5.9. ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ (ЦЕНТРАЛЬНЫЙ) МЕТАБОЛИЗМ .....	110
5.10. ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗ .....	116
5.11. ДЫХАНИЕ .....	116
5.12. КОМПЛЕКС АТФазы .....	118
<b>Г Л А В А 6. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ .....</b>	<b>120</b>
6.1 ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	121
6.1.1. Клинико-эпидемиологические особенности урогенитальных хламидиозов .....	121
6.1.2. Уретрит .....	127
6.1.3. Простатит, эпидидимит .....	128
6.1.4. Воспалительные заболевания половых органов у женщин .....	128
6.1.5. Рак шейки матки .....	129
6.1.6. Реактивные артриты (спондилоартропатии) .....	130
6.1.7. Поражения нервной системы .....	131
6.1.8. Бесплодие .....	132
6.1.9. Венерическая лимфогранулема .....	132
6.1.10. Офтальмохламидиоз .....	133
6.1.11. Хламидиозы у детей .....	134
6.1.12. Бессимптомная хламидийная инфекция .....	136
6.1.13. Трахома .....	137
6.2. ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA</i> .....	139
6.2.1. Болезни органов дыхания .....	141
6.2.2. <i>Chlamydomypha pneumonia</i> и атеросклероз .....	142

6.3. ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННЫЕ <i>CHLAMYDOPHYLA PSITTACI</i> .....	144
<b>Г Л А В А 7. ПАТОГЕНЕЗ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХЛАМИДИЯМИ .....</b>	<b>145</b>
7.1. ПЕРСИСТЕНТНАЯ ХЛАМИДИЙНАЯ ИНФЕКЦИЯ .....	146
7.2. РОЛЬ ЦИТОКИНОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	151
7.3. РОЛЬ БЕЛКОВ ТЕПЛООВОГО ШОКА ХЛАМИДИЙ В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИОЗОВ .....	157
7.4. РОЛЬ ГЕНОТИПА ХОЗЯИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	160
7.5. ПАТОГЕНЕЗ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ХЛАМИДИОЗОВ .....	162
7.6. РОЛЬ <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE</i> В МЕХАНИЗМЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА .....	167
<b>Г Л А В А 8. ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ АНАТОМИЯ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ .....</b>	<b>170</b>
8.1. ГИСТОПАТОЛОГИЯ МАТОЧНЫХ ТРУБ У БОЛЬНЫХ С ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ .....	172
8.2. УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ПАТОЛОГИЯ СТЕНКИ МАТОЧНЫХ ТРУБ .....	177
8.3. УЛЬТРАСТРУКТУРА СПЕРМАТОЗООНОВ У БОЛЬНЫХ ХЛАМИДИОЗОМ .....	185
8.4. ГИСТОПАТОЛОГИЯ ХЛАМИДИЙНОГО ЭПИДИДИМИТА .....	187
8.5. ВЕНЕРИЧЕСКАЯ ЛИМФОГРАНУЛЕМА .....	189
8.6. ОРНИТОЗ .....	190
8.7. ТРАХОМА .....	190
8.8. ХЛАМИДИЙНОЕ ПОРАЖЕНИЕ ПЛАЦЕНТЫ .....	192
8.9. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ИНФЕКЦИИ <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA</i> ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ .....	193
<b>Г Л А В А 9. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА ХЛАМИДИИ .....</b>	<b>199</b>
9.1. ИММУНИТЕТ ПРИ ХЛАМИДИОЗАХ .....	201
9.2. ВРОЖДЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТЫ ПРИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	204
9.3. АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	205
9.3.1. Клеточный иммунный ответ .....	205
9.3.2. Гуморальный иммунный ответ .....	211
9.4. ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРИ ПЕРСИСТЕНТНОЙ ИНФЕКЦИИ .....	214
9.5. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ХЛАМИДИИ .....	215
9.6. ИММУННЫЙ ОТВЕТ НА <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIAE</i> .....	217
9.7. КОНЦЕПЦИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ХЛАМИДИОЗАХ .....	221

<b>ГЛАВА 10. ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ХЛАМИДИЙНОЙ ИНФЕКЦИИ</b> .....	222
<b>ГЛАВА 11. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ</b> .....	239
11.1. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ .....	240
11.2. СБОР И ТРАНСПОРТИРОВКА КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ .....	240
11.2.1. Соскобы слизистой оболочки мочеиспускательного канала, шейки матки, конъюнктивы и др. ....	241
11.2.3. Исследование образцов мочи .....	241
11.2.4. Исследование образцов эякулята .....	242
11.2.5. Исследование синовиальной жидкости и биоптатов .....	242
11.3. ВЫЯВЛЕНИЕ ХЛАМИДИЙ .....	242
11.3.1. Материал для определения хламидийных антител .....	243
11.3.2. Индикация хламидий непосредственно в пораженных клетках .....	243
11.3.3. Выявление антигенов хламидий .....	245
11.3.4. Иммуноферментный анализ антигена хламидий .....	248
11.3.5. Диагностическое выделение хламидий .....	254
11.3.6. Выделение хламидий в куриных эмбрионах .....	255
11.3.7. Выделение хламидий в культурах клеток .....	256
11.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХЛАМИДИЙ К АНТИБИОТИКАМ .....	259
11.5. ОБНАРУЖЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ АНТИТЕЛ .....	260
11.5.1. Реакция непрямо́й иммунофлуоресценции .....	261
11.5.2. Твердофазный иммуноферментный анализ .....	263
11.5.3. Иммуноблоттинг .....	267
11.6. ВЫЯВЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ХЛАМИДИЙ .....	268
11.6.1. Методы диагностики хламидиоза с прямой гибридизацией нуклеиновых кислот .....	268
11.6.2. Методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот .....	272
11.7. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ <i>CHLAMYDOPHILA PNEUMONIAE</i> .....	298
11.7.1. Серологическая диагностика .....	298
11.7.2. Иммуногистохимические методы .....	301
11.7.3. Культура клеток .....	303
11.7.4. Полимеразная цепная реакция .....	305
11.8. УНИФИКАЦИЯ И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ХЛАМИДИОЗА .....	309
11.8.1. Оценка качества лабораторной диагностики хламидиоза .....	311



11.9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	316
11.9.1. Внутрелабораторный контроль .....	317
11.9.2. Межлабораторный контроль .....	317
11.9.3. Мероприятия в случае аварии в лаборатории .....	318
11.9.4. Документация .....	319
<b>Г Л А В А 12. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ</b> <b>(раздел написан совместно с Чиновым Г.П.) .....</b>	<b>319</b>
12.1. ЗАБОЛЕВАНИЯ, ВЫЗВАННЫЕ <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	319
12.1.1. Урогенитальные хламидиозы .....	319
12.1.2. Экстрагенитальные поражения, вызванные <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	336
12.1.3. Урогенитальные хламидиозы и репродуктивная функция .....	340
12.1.4. Урогенитальные хламидиозы и копулятивная функция .....	352
12.1.5. Смешанные урогенитальные инфекции .....	352
12.1.6. Урогенитальный хламидиоз и рак .....	356
12.1.7. Психосоматические расстройства при урогенитальных хламидиозах .....	359
12.1.8. Венерическая лимфогранулема .....	367
12.1.9. Трахома .....	371
12.2. ПНЕВМОНИЯ, ВЫЗВАННАЯ <i>CHLAMYDOPHYLA PNEUMONIA</i> .....	376
12.3. ЗООНОЗНЫЕ ХЛАМИДИОЗЫ .....	379
12.3.1. Заболевания, вызванные <i>Chlamydoxyla psittaci</i> .....	379
12.3.2. Заболевания, вызванные <i>Chlamydoxyla felis</i> .....	381
12.3.3. Заболевания, вызванные <i>Chlamydoxyla abortus</i> .....	381
<b>Г Л А В А 13. ЛЕЧЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ</b> <b>(раздел написан совместно с Нагорным А.Е.) .....</b>	<b>382</b>
13.1. ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ .....	388
13.1.1. Тетрациклины .....	390
13.1.2. Макролиды .....	401
13.1.3. Фторхинолоны .....	417
13.1.4. Антибактериальные препараты других групп .....	433
13.2. ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЛЕЧЕНИЕ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ .....	434
13.2.1. Иммунотерапия .....	434
13.2.2. Физические методы лечения .....	446
13.2.3. Другие патогенетические средства .....	452
13.3. КОНТРОЛЬ ИЗЛЕЧЕННОСТИ .....	456
13.4. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ .....	457

<b>ГЛАВА 14. ПРОФИЛАКТИКА</b> .....	<b>459</b>
14.1. ОРГАНИЗАЦИЯ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ БОЛЬНЫМ С ХЛАМИДИЙНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ .....	459
14.1.1. Общественная профилактика генитального хламидиоза .....	461
14.1.2. Индивидуальная профилактика хламидиоза .....	469
14.1.3. Профилактика хламидиоза среди несовершеннолетних .....	471
14.1.4. Реабилитация больных генитальным хламидиозом .....	474
14.2. МЕТОДЫ БОРЬБЫ С ГЕНИТАЛЬНЫМ ХЛАМИДИОЗОМ .....	477
14.2.1. Анализ ситуации .....	477
14.2.2. Эпидемиологический надзор за хламидиозом .....	478
14.2.3. Лечебно-профилактическая помощь больным, страдающим хламидиозом .....	478
14.2.4. Научные исследования .....	480
<b>ГЛАВА 15. БОЛЕЗНЬ РЕЙТЕРА (раздел написан Бондаренко Г.М.)</b> .....	<b>481</b>
15.1. ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ВЕНЕРИЧЕСКОЙ ФОРМЫ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА .....	481
15.2. ЭТИОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА .....	486
15.3. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ, ТЕЧЕНИЕ И ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА .....	496
15.3.1. Поражения мочеполовой системы .....	498
15.3.2. Поражение опорно-двигательного аппарата .....	498
15.3.3. Поражение органов зрения .....	501
15.3.4. Поражение кожи и слизистой оболочки .....	501
15.3.5. Висцеральные поражения .....	502
15.3.6. Дифференциальный диагноз .....	503
15.4. ЛЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ РЕЙТЕРА .....	504
15.4.1. Антибактериальная терапия .....	507
15.4.2. Противовоспалительная терапия суставного процесса .....	508
15.4.3. Реабилитация .....	509
<b>ЛИТЕРАТУРА</b> .....	<b>510</b>