

Пневмококки: взгляд сквозь призму истории

Продолжение. Начало в № 8/2010.

Глава 3. Патогенез пневмококковой инфекции

Важнейшим этапом в развитии любой инфекции является колонизация [21, 22, 35, 478]. Принципиально важным является тот факт, что большинство авторов признают: человек является единственным «хозяином» пневмококков [119], хотя есть данные о выделении их у ряда млекопитающих в лабораторных условиях, например у лошадей [138], лабораторных крыс и мышей [332].

В 2001 г. был расшифрован полный геном вирулентного штамма *S. pneumoniae*, принадлежавшего к серотипу 4, который состоит из 2 160 837 пар оснований и имеет 2236 генов [203]. Одним из уникальных открытий стало обнаружение экспрессии 69 белков на поверхности микроорганизма, что с большой долей вероятности позволяет предположить их участие в колонизации [445].

Прикрепление пневмококков осуществляется через поверхностные адгезины, в частности пневмококковый поверхностный адгезин А (PsaA), пневмококковые поверхностные антигены А и С, а также холинсвязывающие белки, которые формируют своеобразный мост между бактерией и рецепторами эпителиальных клеток. Со стороны эпителиальных клеток в осуществлении подобного контакта важнейшая роль принадлежит N-ацетилгалактозамин-β-1-4-галактозе [370], сиаловой кислоте [85], фибронектину [39, 55, 84].

PsaA, имеющий молекулярную массу 37 кДа, был впервые описан в 1990 г. [566] с использованием моноклональных антител и с этого момента привлекает внимание многих исследователей [487]. Этот белок наряду с пневмолизином и пневмококковым поверхностным протеином А (PspA) является одним из 3 серотипонезависимых антигенов [487, 566] и близкородствен липопротеиновым адгезинам других стрептококков, колонизирующих полость рта. Недавно были получены экспериментальные данные о том, что мутанты, не имеющие данного протеина, обладают значительно более низкой способностью к колонизации, а иммунизация очищенным PsaA была эффективной при заражении мышей [533], что является многообещающим с точки зрения возможного создания вакцин для применения у людей.

PspA, который обнаруживается у всех пневмококков, необходим для обеспечения их вирулентности [651]. Введение этого белка мышам приводило к стимуляции иммунного ответа и обеспечивало их защиту при внутрибрюшном заражении [676]. Основная биологическая роль PspA заключается в обеспечении эффективной колонизации слизистых оболочек, последующей защите пневмококков от фиксации комплемента и, как следствие, в снижении опсонизации [619]. Несмотря на то что, с серологической точки зрения, PspA является весьма вариабельным, по крайней мере, большинство из эпитопов обладают перекрестной реактивностью, что делает возможным создание в будущем вакцин на его основе [536].

Пневмококковый поверхностный протеин С (PspC) обладает близким родством к PspA, однако является гораздо менее изученным. Существует мнение, что данный белок необходим для более эффективной колонизации [204]. В целом, говоря о роли этих белков, следует подчеркнуть, что антитела против PspA обеспечивают защиту от колонизации, а также инвазивных пневмококковых инфекций, что может быть связано с их перекрестной реактивностью с PspC [537].

Кроме того, фазовые вариации пневмококков, которые являются результатом модификации структуры клеточной стенки [358, 500], также могут играть существенную роль в различиях адгезивной способности. «Прозрачные» варианты, обладающие большим количеством фосфорилхолина по сравнению с «непрозрачными» вариантами в 10-1 000 000 раз более эффективно связываются с N-ацетилглюкозамин-β-1-3-галактозой [548] и эпителиальными клетками через тромбоцитаривизирующий фактор [550, 614].

Считается, что средний возраст колонизации пневмококками составляет 6 мес [275], хотя в отдельных исследованиях он колебался от 1 до 30 мес [299, 450, 451, 579], а в некоторых популяциях с предрасполагающими факторами составлял 8-10 дней [130]. Состав микрофлоры, колонизирующей слизистые оболочки, подвергается динамическому изменению [7, 172, 275, 285], однако становится более-менее стабильным к 1-му году жизни [549], когда 50-100% детей колонизированы

потенциальными возбудителями инфекций дыхательных путей [510]. Интересным представляется тот факт, что пневмококки не передаются от детей к родителям даже в условиях тесного контакта, что, возможно, свидетельствует о наличии эффективного иммунологического барьера у взрослых [98].

Было показано, что одновременно в носоглотке может находиться до 4 капсулярных типов [300], а в ряде исследований была показана четкая взаимосвязь между высокой частотой колонизации и одновременным носительством нескольких типов [260, 555].

На частоту носительства оказывает влияние множество факторов. Так, например, носительство пневмококков у здоровых лиц снижается с возрастом, являясь максимальным у детей в возрасте до 7 лет и минимальным у лиц старше 16 лет [275]. В исследовании, проведенном в Швеции, частота выделения пневмококков у детей дошкольного возраста, школьников и взрослых составила соответственно 19, 6 и 0,8% [301]. В целом считается, что частота колонизации достигает пика к возрасту 2-3 года, затем постепенно снижается, вновь возрастая у лиц старше 65 лет [165, 349, 391, 628].

Обратная связь между частотой колонизации и возрастом может быть объяснена более высокой частотой инфекций дыхательных путей у детей, так как носительство значительно возрастает во время периода болезни [448, 549].

В большинстве исследований частота носительства пневмококков не зависела от расовой и гендерной принадлежности [130, 448, 554, 632], однако антибиотикорезистентные штаммы чаще встречались у девочек [82, 510].

Низкий социально-экономический уровень жизни является фактором риска колонизации пневмококками [130, 449]. Так, например, носительство *S. pneumoniae* у детей, проживающих на площади из расчета 1,75 м² на человека, составило 55,7% по сравнению с 10,8% у располагавших 10,2 м² на человека [164].

В ряде исследований было показано, что грудное вскармливание является защитным фактором, снижающим частоту острого среднего отита у детей [79, 549]. В то же время вопрос о снижении колонизации остается спорным. В некоторых исследованиях была показана способность женского молока снижать адгезивные свойства микроорганизмов [38] и частоту колонизации [258], в других работах такой связи выявлено не было [525, 549, 554].

Влияние времени года на частоту колонизации также является недостаточно выясненным. Несмотря на то что некоторыми авторами было показано увеличение носительства в середине зимы [82], большинство исследователей подобной связи не обнаружили [448, 578, 632].

Курение родителей является независимым фактором риска более высокой частоты носительства пневмококков у детей [164, 510, 549]. Возможным объяснением подобному факту является то, что табачный дым повреждает слизистую оболочку носоглотки, приводит к ее воспалению, следствием чего является повышение чувствительности к колонизации [275].

Исследователями было показано, что, если ребенок преимущественно спит в положении на животе, это также приводит к более высокой частоте колонизации пневмококками, а также к развитию синдрома внезапной смерти [632], что, по-видимому, связано с накоплением секрета в верхних отделах дыхательных путей и снижению мукоцилиарного клиренса [275].

Пациенты с серповидноклеточной анемией имеют более низкую частоту носительства пневмококков по сравнению со здоровыми детьми, однако у них более высока вероятность выделения антибиотикорезистентных пневмококков [194]. Дети с ВИЧ-инфекцией входят в группу высокого риска развития пневмококковых инфекций (например, частота инвазивных пневмококковых инфекций у них в среднем в 12 раз выше) [275]. Причиной этого является нарушение местного иммунитета, в частности низкая концентрация IgA, способствующая персистирующей колонизации [285]. В то же время значительно большей частоты носительства у ВИЧ-инфицированных детей выявлено не было [164, 193].

Доктор
медицинских
наук, профессор
Р.С. Козлов



Посещение детских садов, проживание в детских домах, переполненных помещениях являются независимыми факторами риска высокой частоты колонизации пневмококками [179, 301, 554, 579]. Кроме того, было показано, что носительство значительно выше в детских учреждениях, в которых число детей превышает 45 человек [285], а также при длительном посещении ребенком детского учреждения [554].

Необходимо отметить существенные географические вариации в частоте носительства пневмококков в детских учреждениях. Так, например, в исследованиях в детских садах в Канаде (1319 детей) пневмококки были выделены у 15-80% [355], в Португалии (586) — у 47% [165], в Италии (1723) — у 31-33% [554], в Нидерландах (259) — у 58% [505], в Израиле (264) — у 78% детей [408], что подчеркивает невозможность прямой экстраполяции данных и указывает на необходимость проведения подобных исследований в каждой стране [275].

Детские организованные коллективы являются идеальной средой для появления и эффективной циркуляции резистентных штаммов вследствие большого количества детей, тесных контактов между ними, интенсивного использования антимикробных препаратов. Результатом селективного давления антибиотиков является вытеснение чувствительной популяции микроорганизмов и ее замена на резистентную [275, 355]. Условия детских учреждений обеспечивают возможность быстрого распространения резистентных штаммов, что было доказано выделением нечувствительных пневмококков у детей, не получавших антимикробные препараты [82]. В исследованиях резистентности данные также существенно различались, причем не только странами, отдельными городами, популяциями, но и между детскими учреждениями в одном и том же городе [165, 408], что также убеждает в колоссальной важности получения локальных эпидемиологических данных.

На определяемую частоту носительства также оказывают существенное влияние методологические моменты, такие как качество взятия материала, метод культурального исследования, используемые материалы и реагенты [201]. Рабочая группа ВОЗ по носительству в рамках исследований пневмококковых вакцин указывает на то, что для получения сравнимых результатов необходимо использовать абсолютно аналогичные техники взятия материала, выделения и идентификации, тампон для взятия материала, питательные среды, условия инкубации [471]. Ранее было доказано, что нельзя производить сравнение данных, если использовались различные методы выделения и идентификации [117]. Так, было доказано, что оптимальным для проведения работ по изучению носительства пневмококков является взятие назофарингеального мазка [201] с помощью гибких алюминиевых тампонов с наконечником из альгината кальция или дакрона [471]. В предыдущих работах была показана нежелательность использования тампонов с ватными наконечниками, так как содержащиеся в них жирные кислоты подавляли рост пневмококков [517, 673]. В качестве среды для первичного посева группа экспертов рекомендует использовать колумбийский или триптиказо-соевый агар с добавлением бараньей, лошадиной или козьиной крови 2,5-5 мкг/мл гентамицина и колистина/налидиксовой кислоты или колистина/оксилиновой кислоты [471].

Важность проведения исследований назофарингеального носительства пневмококков, особенно у детей из организованных коллективов, подчеркивается убедительными доказательствами связи между штаммами, колонизирующими носоглотку, и штаммами, вызывающими инвазивные заболевания [190, 191, 292, 520, 621], средние отиты [130, 452, 549, 616, 625], риносинуситы [349, 565].

Вопрос о точной длительности носительства пневмококков остается открытым. Большинство исследователей полагают, что у детей колонизация определяется в течение примерно 1-4 мес [231, 450, 579]. Было показано, что более длительная колонизация наблюдается с малоиммунными серотипами (6 и 23) [285], а также у некоторых популяций

Продолжение на стр. 40.

Пневмококки: взгляд сквозь призму истории

Продолжение. Начало на стр. 39.

(например, аборигенов Австралии) [130]. У взрослых персистенция пневмококков обычно короче — в среднем 2-4 нед [275], однако есть данные о гораздо более длительном их нахождении [231].

! У большинства людей колонизация протекает в форме бессимптомного носительства, однако при нарушении равновесного состояния под действием различных факторов микроорганизмы могут проникать в близлежащие органы и ткани и/или кровеносное русло, вызывая заболевание [275, 292, 610, 616]. Своеобразной особенностью пневмококковых инфекций является частая связь с инфицированием новым, а не длительно находящимся в организме серотипом [11].

Пневмококковая колонизация является каскадом реакций с вовлечением определенных поверхностных белков пневмококков (в зависимости от локуса колонизации) и углеводов клетки-хозяина [117]. Результатом вышеуказанного процесса является образование вакуоли, в которую «погружается» пневмококк, вследствие чего происходит транзит через цитоплазму и транслокация микроорганизма на противоположную сторону клетки [553].

S. pneumoniae также обладает авидностью к клеткам верхних и нижних отделов дыхательных путей, а также эндотелию [647], однако было показано, что именно колонизация слизистой носоглотки обычно предшествует развитию инвазивных и неинвазивных пневмококковых инфекций [292, 616].

В развитии следующего этапа патогенеза, при котором осуществляется проникновение пневмококка во внутреннюю среду организма и дальнейшая генерализация инфекционного процесса, важная роль принадлежит различным ферментам и токсинам [66, 487]. Все клинические штаммы пневмококка способны к выработке как минимум одной нейраминидазы [487]. Эти ферменты обладают значительным потенциалом вызывать поражения органов и тканей путем избирательного отщепления сиаловых кислот, находящихся в терминальном положении, от различных гликопротеинов, гликолипидов и олигосахаридов на поверхностях клеток или в жидкостях [21, 22, 356, 381]. Кроме того, нейраминидазы участвуют в «оголении» клеточных рецепторов для пневмококковых адгезинов, способствуя более тесному контакту бактерий с органами-мишенями [370]. Доказано существование по крайней мере двух пневмококковых нейраминидаз: одна из них с молекулярной массой около 107 кДа кодируется геном *nanA* [77], вторая имеет молекулярную массу около 74,5 кДа и кодируется геном *nanB* [141]. Отщепление сиаловых кислот под действием этого фермента теоретически может привести к разнообразным нарушениям и последующему развитию патологических изменений. Исследованиями, проведенными рядом авторов на секционном материале умерших от пневмококкового менингита, доказано появление в спинномозговой и других биологических жидкостях антигена Томпсона-Фриденрайха, иммунодоминантной группой которого служит дисахарид галактопиридоацетил [438, 473]. В норме он защищен сиаловой кислотой, которая под действием нейраминидаз отщепляется, и дисахарид распознается в качестве чужого антигена, а его появление на поверхности эпителия клубочков почек и эритроцитов связывают с синдромом гемолиза [21, 438, 473].

Исследователями также было обнаружено в спинномозговой жидкости, содержимом полости воспаленного коленного сустава и плевральной полости наличие аномальных белков (трипсина, макроглобулина и др.), возможной причиной появления которых являлось именно действие нейраминидаз. В качестве доказательства приводятся данные опытов *in vitro*, в которых были установлены аналогичные изменения электрофоретической подвижности белков после воздействия нейраминидазой, продуцированной выделенными от больного пневмококками [438].

Важнейшими доказательствами патогенетической роли пневмококковых нейраминидаз стали экспериментальные данные, подтвердившие токсичность очищенного фермента при интраперитонеальном заражении мышей [487]. Более того, иммунизация обработанными формальдегидом нейраминидазами с молекулярной массой 107 и 74,5 кДа обеспечивала значительный уровень защиты от вирулентных штаммов пневмококков в эксперименте [393, 487], что подчеркивает значимость этих ферментов в патогенезе пневмококковых инфекций. Однако до настоящего времени установить корреляцию между активностью этих ферментов и тяжестью пневмококковых инфекций исследователям не удалось [10, 23].

Практически все пневмококки обладают видоспецифичной гиалуронидазой, основная часть которой связана с клеточной стенкой [21, 22]. Субстратом для пневмококковой гиалуронидазы, имеющей молекулярную массу около 107 кДа [487], служит гиалуроновая кислота, которая входит в состав

соединительной ткани. Гиалуроновая кислота представляет собой высокополимерное соединение, состоящее из эквивалентных частей ацетилглюкозамина и глюкуроновой кислоты, которое имеет форму линейных цепочек, построенных из регулярно повторяющихся единиц мономера [4]. В организме человека и животных роль гиалуроновой кислоты сводится к выполнению целого ряда функций, среди которых особенно важны: 1) удержание воды; 2) связывание катионов; 3) регулирование диффузии; 4) смазывание трущихся поверхностей; 5) участие в процессах фибриногенеза; 6) регулирование действия ферментов [4, 21]. Вследствие этого очевидно, что расщепление гиалуроновой кислоты пневмококками обеспечивает им эффективное проникновение в ткани. Интересным наблюдением является то, что биосинтез пневмококковой гиалуронидазы носит индуцибельный характер: фермент отщепляет гиалуроновую кислоту, а ее свободная форма стимулирует затем синтез фермента [21]. Однако в отличие от нейраминидаз в эксперименте с интраперитонеальным заражением и последующей иммунизацией защитной роли антигена к пневмококковой гиалуронидазе доказать не удалось, хотя в настоящее время продолжают исследования по изучению ее роли в процессе колонизации [487].

! Бактериальные аутолизинны — это ферменты, которые обеспечивают разнообразие важнейших биологических функций, включая синтез клеточной стенки, отделение дочерних клеток после деления, естественную генетическую трансформацию, а также специфический разрыв ковалентных связей в клеточной стенке, приводящий в итоге к лизису клетки [16, 397].

Пневмококк содержит два мощных аутолитических фермента — N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу и эндо-β-1,4-N-ацетилглюкозаминидазу (молекулярная масса 64 кДа) [538]. Активность обоих ферментов в значительной степени зависит от наличия остатков холина в тейхоевой кислоте клеточной стенки микроорганизма. Это было подтверждено в эксперименте путем замены холина на аналог — этаноламин, результатом чего явилась целая серия изменений в физиологии пневмококков (рост в виде длинных цепочек, резистентность к лизису, потеря способности к трансформации и проч.) [385]. Доказано также, что нарушение регуляции действия обоих аутолизиннов способствует обеспечению необратимых эффектов действия β-лактамов антибиотиков на пневмококк [398, 641]. В экспериментальных исследованиях было показано, что антигена к аутолизинам и пневмолизину обеспечивали частичную защиту мышей от пневмококковых инфекций [315]. В то же время антигена к аутолизинам при инфекциях, вызванных не содержащими пневмолизин мутантами, не обеспечивали защиты от инфекции [322]. На основании этих данных был сделан вывод о том, что основная роль аутолизиннов в патогенезе пневмококковых инфекций заключается в высвобождении пневмолизина, а также иных повреждающих компонентов клеточной стенки пневмококков [442].

Первое сообщение о способности пневмококка вырабатывать гемолизин, действие которого приводило к лизису эритроцитов человека, барана, кролика, лошади в аэробных и анаэробных условиях, появилось еще в 1905 г. [387]. В последующие годы было проведено множество исследований, показавших токсичность гемолизина, его чувствительность к действию кислорода, антигенность и необратимую инактивацию холестерином [420]. Впервые возможная роль данного токсина в патогенезе пневмококковых инфекций была доказана в 1948 г. Ц. Шамвей и соавт., который показал наличие сфероцитов и сниженную осмотическую резистентность эритроцитов у кроликов с пневмококковой бактериемией [588], причем подобный эффект наблюдался при введении кроликам бесклеточного пневмококкового экстракта [590]. В 1971 г. удалось доказать, что подобные эффекты были вызваны действием одного белка, названного пневмолизин [589].

! В настоящее время показано, что пневмолизин, молекулярная масса которого составляет 52,8 кДа, является токсичным для всех клеток, имеющих в составе мембран холестерин [68, 420].

Пневмолизин принадлежит к семейству тиолозависимых токсинов, которые обладают двухэтапным механизмом действия. На первом этапе происходит связывание с холестерином мембран и встраивание токсина в липидный бислой, на втором — латеральная диффузия и сборка олигомерной структуры с высокой молекулярной массой, которая является трансмембранной порой [143]. Было доказано, что пневмолизин может поражать клетки бронхиального эпителия [232], альвеолярного эпителия [643] и эндотелий легочных артерий [644]. Принимая во внимание, что именно эти клетки участвуют в создании легочно-капиллярного барьера, их разрушение может объяснить типичные гистопатологические изменения, характерные для пневмококковой пневмонии (геморрагии и др.) [670].

Кроме прямого цитолитического действия, пневмолизин также обладает рядом иных воздействий на клетки человека. Так, было показано, что низкие дозы токсина (1 нг/мл) подавляли «респираторный взрыв» в полиморфноядерных лейкоцитах [488], следствием чего являлось нарушение функции последних по уничтожению опсонизированных пневмококков. Кроме того, данный белок стимулирует высвобождение фактора некроза опухоли (ФНО) и интерлейкинов макрофагами [442], что приводит к усилению воспалительной реакции.

Следующим механизмом действия пневмолизина является его способность к активации фосфолипазы А в эндотелиальных клетках легочных артерий [516], что в значительной степени способствует формированию трансмембранных пор.

Важной особенностью пневмолизина также является его уникальная способность вызывать активацию системы комплемента по классическому пути при отсутствии специфических антител [489], в результате чего снижается опсонизирующая активность сыворотки. Кроме того, активация может наступать при фиксированном к мембранам токсина, следствием чего может являться действие комплемента на собственные ткани и стимуляция воспаления [420]. Кроме того, была показана способность пневмолизина к замедлению колебания реснитчатого эпителия полости носа, а при более высоких концентрациях — и прямое цитолитическое действие [420].

Роль полисахаридной капсулы пневмококков в патогенезе пневмококковых инфекций была установлена в исследованиях в конце XIX века. Так, например, Г. Клемперер и Ф. Клемперер в 1891 г. показали защитный эффект иммунной сыворотки [360], а И.И. Мечников, наблюдая феномен агглютинации пневмококков иммунной сывороткой, заложил основы серологической дифференциации капсулярных типов [664]. Капсулярные серотипы и роль типоспецифичных антител в опсонизации пневмококков были описаны на рубеже XIX-XX веков Ф. Нефельд и Л. Хэндел [456].

В 1928 г. Ф. Гриффит в экспериментальном исследовании показал способность пневмококков к трансформации [294]. Эксперимент заключался в том, что при заражении мышей капсулярным вариантом (S-штамм) быстро наступал их летальный исход, в то время как бескапсульный (R-штамм) вирулентностью не обладал. При нагревании S-штамма и добавлении полученной суспензии к R-штамму, наблюдалась гибель мышей, а при культивировании вырастали капсулообразующие штаммы (рис. 2).

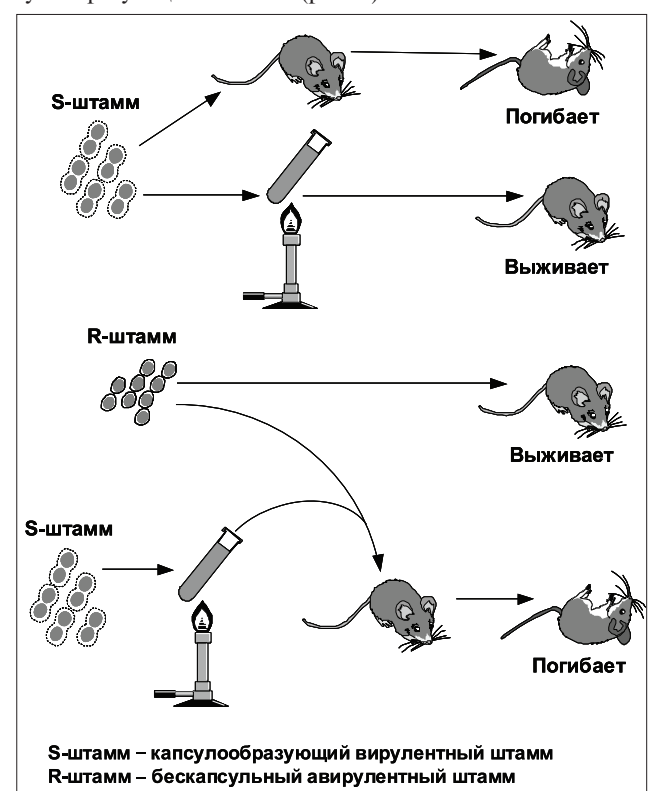


Рис. 2. Трансформация пневмококковых типов [294]

В 1917 г. А. Доше и О. Эвери описали наличие типоспецифичных растворимых субстанций в фильтратах пневмококковых культур, сыворотке и моче инфицированных людей и кроликов [225]. В 1923 г. М. Хейдельберг и О. Эвери показали, что пневмококковая капсула является полисахаридной [311]. В 1927 г. была экспериментально доказана ее антигенность, а также защитная роль антител, вырабатываемых на пневмококковые полисахариды, на моделях животных [572]. Возможность спонтанной пневмококковой трансформации с участием ДНК в качестве носителя генетической информации впервые была показана в 1944 г. [125].

Продолжение следует.