

УДК 579.242/.253.2'3:616.9-092

## О РОЛИ ЛАТЕНТНЫХ, ТРУДНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ И НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПЕРСИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Елисеєва І.В., Бабич Е.М., Волянський Ю.Л., Скляр Н.І., Белозерський В.І.

Інститут мікробіології і імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, г. Харків

Когда бактерии были впервые распознаны как причина заболевания, они представлялись относительно стабильными формами, имеющими клеточную стенку, способными расти и проявлять свою метаболическую активность *in vitro*. Эти формы сохраняли достаточную вирулентность и связать их с определенным заболеванием было не трудно. С тех пор развивающиеся технологии микробиологической диагностики, которые включают селективные среды культивирования и окрашивания, фазово-контрастную микроскопию, сканирующую электронную микроскопию, ультратонкие срезы, выращивание микроорганизмов на миллиметровых фильтрах, полимеразная цепная реакция (ПЦР) и др., открыли и продолжают открывать целый континуум постоянно меняющихся микроорганизмов.

Концепция нормальной бактериальной флоры организма человека является статистической концепцией, которая исходит из иммунной компетентности большинства населения. Однако, заметной тенденцией последних десятилетий является рост доли населения, имеющей скомпрометированную иммунную систему. Среди причин этого роста – старение, аутоиммунные процессы, врожденные, метаболические и дегенеративные заболевания, СПИД, усиление стрессового давления социальной среды, экологические факторы. Поэтому не удивительно, что на фоне широкого применения гормональной терапии, антимикробных средств и иммунодепрессантов, когда бактерии подвергаются действию веществ, взаимодействующих со структурными компонентами и метаболическими процессами, существенными для выживания микроба, *in vivo* возникают плеоморфные, мутантные и дремлющие бактериальные популяции.

Поврежденные формы в качестве причины персистентной инфекции могут вызвать существенные патологические последствия для хозяина. И было бы неблагоприятным в случае неясного заболевания, когда у очевидно инфицированных пациентов результаты бактериологического посева отрицательны, заведомо исключить патогенные возможности какого-либо персистентного микроорганизма.

Встретившись с подобной ситуацией, невозможно точно учесть и воспроизвести все факторы, вовлеченные в проявление болезни, поэтому установление этиологического агента не может в подобных случаях целиком удовлетворять постулатам Коха. Даже если микроорганизм растет *in vitro*, он может оказаться не единственным или первичным патогеном.

В последние годы была раскрыта микробная этиология многих идиопатических, хронических, истощающих расстройств [1]. Для пациентов с криптоическими инфекциями весьма затруднительным оказывается выбор антимикробных средств. Определение чувствительности к антибиотикам не дает информации о действии лекарства на токсичность инфицирующего микроорганизма и его адгезивную способность к клеточным мембранам *in vivo*. По этой причине применение антимикробных средств без весомых культуральных доказательств не гарантирует адекватность антибиотикотерапии.

Целью данного обзора является анализ имеющихся в литературе данных о роли дремлющих бактерий в форме CWDB (аббревиатура от «cell wall-deficient/defective bacteria» - бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой), т.е. микроорганизмов, имеющих дефицит питательных веществ, или трудно культивируемых бактерий вообще в разнообразии человеческих инфекций.

Термин «CWDB» предложен Gerald J. Domingue и Hannah B. Woody [1]. По мнению авторов, он наиболее широко включает все разнообразие aberrantных бактериальных форм и наилучшим образом отражает морфологию бактерий, обнаруживаемых в клинических образцах. Электронно-микроскопические (ЭМ) исследования показали, что эти микроорганизмы частично или полностью утратили клеточную стенку, и они могут или же нет реверсировать в исходные варианты *in vitro* [1-5].

Впервые бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой были обнаружены Н.Ф. Гамалеей еще в 1894 году, а затем описаны многочисленными исследователями. Изначально для аналогичных плевропневмониеподобных микроорганизмов (PPLO)-симбионтов *Streptobacillus moniliformis*, как их интерпретировала Klieneberger, в честь института Листера, где она работала, был предложен термин «L-формы», который сохраняется в отношении данных микроорганизмов до настоящего времени для исторической перспективы и четкости в обзорной литературе [6]. Впоследствии Dienes доказал, что описанные Klieneberger PPLO могут реверсировать в исходную бациллярную форму *S. moniliformis* [7]. В дальнейшем было показано, что целый ряд других бактериальных видов демонстрирует спонтанную трансформацию в L-формы, и бактерии, лишённые ригидной клеточной стенки, сохраняют способность к размножению [1-5, 8].

Хотя употребление термина «L-формы» противоречиво, большинство микробиологов согласно, что L-формы – форма выживания и размножения микроорганизмов, полностью или частично утративших ригидную клеточную стенку в силу естественных или искусственно индуцированных причин, и обладающих потенциальной способностью к реверсии в исходные бактериальные формы [2,3].

Высказывались различные точки зрения на биологическую сущность L-трансформации [2,5]. Сторонники одной из них считали, что L-трансформация – это патологический процесс, возникающий под влиянием неблагоприятно действующего фактора, а L-формы – продукт летальной дегенерации микробных клеток. Другое утверждение заключается в том, что L-трансформация – это спонтанная мутация, а воздействие трансформирующего фактора – селекция мутантов. Полагают также, что стабильные L-формы образуются в результате «случайной» потери клеточной стенки, что необратимо препятствует ее нормальному биосинтезу. Некоторые исследователи придерживаются мнения, что L-трансформация – проявление приспособительной (адаптивной) изменчивости микробов под влиянием неблагоприятно действующего фактора внешней среды, и, соответственно, L-формы – высоко резистентные к воздействию соответствующего агента формы микроорганизмов. Гипотеза, объединяющая два предыдущих суждения, заключается в том, что первоначально L-формы были, по всей видимости, проявлением адаптивной изменчивости, а в дальнейшем процесс L-трансформации мог завершиться генотипическими мутациями, прочно закрепляющими за мутантами приобретенные свойства. У некоторых видов микроорганизмов L-цикл не связан с воздействием неблагоприятных агентов и поэтому может считаться наследственно закрепленным признаком. L-формы можно рассматривать как промежуточные формы от бактерий к микоплазмам [2, 3]. В настоящее время широко поддерживается точка зрения, что конверсия бактерий в L-формы может быть универсальным свойством бактерий [9,10].

Патогенный потенциал CWDB для человека и лабораторных животных был предметом многих исследований, но их результаты часто затуманены полемикой, иногда противоречивы; CWDB упоминаются даже как лабораторные курьезы, не имеющие существенного клинического значения. Тем не менее, значительный массив экспериментальных и клинических данных говорит о том, что бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой (CWDB) могут вызывать заболевания [1, 3, 8, 11-14].

### **1. Биологическая характеристика бактерий с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой**

Со времени первых работ Dienes было опубликовано множество трудов по морфологии, серологическим и биохимическим свойствам L-форм [1-5, 8, 11, 12, 17-24, 26-30]. Краткое резюме базисной биологии L-форм поможет прояснить роль aberrantных бактерий в латенции и хронизации инфекционных заболеваний. Среди общих свойств CWDB следует акцентировать: изменение характера роста и обменных процессов по сравнению с исходными бактериальными формами; пониженную ферментативную активность L-форм; способность к слипанию или слиянию (возможность существования полигеномной стадии на ранних и средних этапах L-трансформации); наличие антигенов, которые у исходных бактерий локализованы в цитоплазматической мембране и в цитоплазме; интенсивно развитую систему внутренних мембран; отличия цитоплазматической мембраны и внутрицитоплазматических мембранных структур L-форм от исходных бактерий по составу липидов, белков, физико-химическим свойствам, осморегуляции [2]. У многих грампозитивных бактерий локализация определенных фаго-специфических рецепторов в L-формах протопластного типа связана с цитоплазматической мембраной [31].

### **Индукция L-форм**

Вероятно, практически все известные бактериальные виды могут быть конвертированы в CWDB под воздействием множества экзогенных индуцирующих факторов. Так, бесстеночные клеточные формы получены *in vitro* для множества самых разнообразных представителей микроорганизмов: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacteroides sp.*, *Bordetella pertussis*, *Brucella melitensis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium sp.*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, *H. vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus haemolyticus*, *Streptobacillus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallida*, *Actinomyces hordeovulneris*, дрожжи и другие грибы, эукариотические водоросли, клетки высших растений [1-5, 17, 20, 22-24, 27, 28, 31].

Среди индуцирующих факторов можно назвать радиоактивное и рентгеновское излучения, ультрафиолетовое облучение, необычный температурный режим культивирования, культивирование в гипертоническом 0,3-0,5 М растворе сахарозы, воздействие хлористого лития и повышенной концентрации сернокислого магния, карбоксиметоксиламин, фаговый лизат стрептококка группы С, микробы-антагонисты, пептон, антисыворотка, комплемент. К наиболее известным агентам такого рода относятся подавляющие синтез клеточной стенки антибиотики (пенициллин - для всех видов бактерий, цефалотин, полимиксин, метициллин, бацитрацин - для стрептококка, ванкомицин и ристоцитин - для менингококка), высокие концентрации аминокислот (глицина, фенилаланина DL-метионина, L-метионина, аргинина), пептидазы и литические ферменты, растворяющие муреин клеточной стенки – лизоцим (100-1000 мкг/мл), лизостафин [2, 32-34].

Степень результативности процессов L-трансформации, вероятно, отражает фенотипические и генотипические различия изолятов микроорганизмов [35].

Продемонстрировано, что колонии L-форм в присутствии индуцирующих факторов могут неограниченно долго культивироваться на подходящей среде [12]. Устранение индуцирующего агента может привести к реверсии в родительские формы бактерий или наступлению стабилизации L-форм, исключаяющей реверсию [2].

Нет сомнения в том, что многие бактерии, такие как *Neisseria gonorrhoeae*, *Bacteroides fragilis*, *Haemophilus influenzae*, *Nocardia asteroides* и различные виды *Bacillus* могут подвергаться спонтанному (т.е. в

отсутствие целенаправленной индукции) переходу в L-формы [12]. Показана также возможность образования L-форм в организме хозяина. Например, Veamen при экспериментальной инфекции у мышей с помощью ультраструктурного анализа *N. asteroides* показал, что значительные структурные модификации клеточной оболочки происходят во время адаптации и роста микроорганизма в макроорганизме. Утратившие вирулентность штаммы подвергались наибольшему повреждению, более вирулентные организмы были менее повреждены. В дополнение, как результат роста *N. asteroides* в организме хозяина, наблюдались изменения тинкториальных свойств (окраска по Граму, кислотоустойчивость), что предполагает химические модификации в клеточной стенке [36].

Установлена L-трансформация естественного обитателя носоглотки крыс - зеленого стрептококка [3].

Контакт менингококка с культурой клеток человеческого амниона линии FL в течение от 6 часов до 2 суток сопровождался появлением менингококковых форм с дефектной клеточной стенкой подобных L-формам: сферопластам, протопластам, гигантским и микрочеткам, а также почкующимся вариантам. Варианты менингококка с дефектной клеточной стенкой, появляющиеся в культуре ткани, и формы, изолированные из организма человека, встречающиеся в зрелых популяциях менингококка в культуральной среде, существенных различий в своей структуре не обнаружили. Эти данные показывают, что любые внешние воздействия вызывают в тонкой структуре этих микроорганизмов достаточно быстрые изменения, подобные L-трансформации [37].

Очевидно, что клиническое значение персистенции L-форм и реверсировавших родительских бактериальных клеток *in vivo* во многом будет определяться теми факторами хозяина и/или индуцирующими агентами, которые регулируют способность микроорганизма к трансформации. Возможно, что субоптимальное дозирование подавляющих синтез клеточной стенки антимикробных факторов или других химиотерапевтических средств создает CWDB варианты *in vivo* и со временем укрепляет их персистенцию. Поскольку CWDB могут быть частью каждой растущей бактериальной популяции, индуцирующие агенты могут также принимать участие в селекции роста аберрантных форм. Наблюдения *in vitro* CWDB, растущих на среде с градиентом пенициллина, могут быть, вероятно, экстраполированы на аналогичную ситуацию у пациентов, леченных антибактериальными средствами, способными индуцировать образование CWDB *in vivo* [1].

#### ***Культуральные свойства L-форм***

Питательные потребности индуцированных *in vitro* L-форм обычно схожи с таковыми родительских бактерий, от которых они произошли [1, 12]. Для роста микроорганизмов, выделенных из клинических образцов, обычно необходима обогащенная среда. Чаще всего используется среда с добавлением сыворотки или лизата кровяных клеток и дрожжевого экстракта [1, 11]. Некоторым L-формам для длительного культивирования требуется осмотически стабилизирующая среда. Однако L-формы, индуцированные гиперосмотической средой, могут быть адаптированы к росту на среде с нормальной осмолярностью [38].

CWDB могут выживать в среде с осмолярностью, меньшей, чем их внутриклеточное осмотическое давление. Внутриклеточное осмотическое давление для грам-негативных бактерий от 300 до 400 мосмол/кг воды, для грам-позитивных бактерий – 900 мосмол/кг. Микроорганизмы, которые противостоят окружению со сниженной осмолярностью, такому как человеческая сыворотка или обычные бактериологические среды (270-300 мосмол/кг), чтобы выжить, должны внутренне стабилизировать свои цитоплазматические мембраны [38]. Дивалентные катионы, полиамины или адаптивные изменения к более высокому уровню насыщенных и

ненасыщенных жирных кислот в мембранах могут удовлетворять требованию сохранения целостности цитоплазматических мембран [1, 28, 39].

На жидких средах CWDB дают скудный рост в виде пленки на поверхности среды. На плотных питательных средах L-формы дают пенные колонии, вырастающие в агар; некоторые CWDB из клинических образцов растут *in vitro* как классическая «жареная яичница». Рост L-колоний проявляется на 6-8-е сутки [2].

При высеве на чашки фильтратов бактериальных культур обнаруживаются мельчайшие, нежные стекловидные колонии, медленно растущие (от 2-3 суток до нескольких недель) и дающие рост в виде «дымки», «налета», «мельчайших, различимых лишь в лупу, колоний». Вторичные культуры, развивающиеся из этих колоний, соответствуют исходным бактериальным культурам. На жидких питательных средах высеянные фильтраты дают опалесценцию, нежный зернистый осадок [4].

#### ***Морфологические особенности L-форм***

Морфология и репродуктивные процессы бактерий с дефектными клеточными стенками достаточно подробно освещены различными авторами [2, 5, 8, 40, 41-44].

Колонии L-форм представляют собой популяции полиморфных элементов с закономерной сменой одних элементов другими. Верхнюю часть колонии занимают шаровидные клетки. Основная ее часть заполнена бесструктурной массой, в которую погружены прочие элементы колонии L-форм. Вокруг колонии имеется общий покров. Морфология и ультраструктура L-форм, полученных из грам-положительных и грам-отрицательных бактерий различных видов, не имеет принципиальных отличий [2].

В составе колонии L-форм можно обнаружить: (1) элементарные тельца (субмикроскопические фильтрующиеся образования диаметром 0,2-1,0 мкм; ограничены трехслойной мембраной, имеют рибосомы и нередко - нуклеоид); (2) зернистые элементы, шаровидные или неправильной формы тела размером 1-5 мкм (основной элемент в культуре L-форм, преобладают в логарифмической фазе; формируются на нитевидных структурах и внутри больших тел; содержат нуклеоид и мембранные структуры); (3) большие тела, достигающие 50 мкм (встречаются на всех этапах L-трансформации; способны реверсировать в исходные бактериальные клетки; имеют сферическую или полигональную форму); (4) нитевидные структуры диаметром от 0,1 до 10 мкм (не являются обязательным элементом всех культур L-форм); (5) бесформенные бесструктурные элементы или аморфные массы, в которых границы отдельных клеток не видны (встречаются во всех культурах на раннем и позднем этапах L-трансформации). CWDB из клинических образцов могут включать все эти формы *in vivo* и *in vitro* [12, 42].

В присутствии индуцирующего агента (например, пенициллина) колонии L-форм могут длительно культивироваться на соответствующей среде. Так, в ликворе при его хранении при температуре 4 °C L-формы могут сохраняться до 1 года [2]. Если устранить индуцирующий фактор, то нестабильные L-формы реверсируют в родительские клетки, а стабильные L-формы утрачивают способность к реверсии.

Начало реверсии бактериальных форм проявляется в нежном диффундирующем в среду ореоле роста вокруг L-колоний. При микроскопии обнаруживаются разнообразные переходные гетероморфные формы: раздутые гантелевидные, веретенообразные, удлинённые, местами фрагментирующиеся, разбухшие кокковые формы, располагающиеся в виде цепочек, мелкие шаровидные формы типа пенициллиновых сферопластов. По Граму они не окрашиваются, либо окрашиваются неравномерно [2].

Исследования нескольких видов микобактерий показали, что количество, морфология и тинкториальные свойства L-форм зависят от вида микроорганизма и длительности культивирования. Окраска по Романовскому-Гимзе давала возможность выявить гранулярные шары и кислото-нестойкие коккоподобные формы [43].

**Возможные этапы L-трансформации и реверсия CWDB в исходные бактерии**

Учитывая морфологическое разнообразие CWDB, опираясь на данные многочисленных исследований, Прозоровским С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. были предложены возможные этапы L-трансформации бактерий [2]. Так, при кратковременном действии индуцирующих факторов самый начальный этап трансформации характеризуется появлением предшественников L-форм, а именно: форм несбалансированного роста (полиморфных бактерий – нитевидных, гигантских, других атипичных вариантов). Под воздействием факторов, блокирующих синтез клеточной стенки как грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий, в условиях жидкой среды и осмотической защиты могут формироваться сферопласты, которые частично сохраняют клеточную стенку. Они имеют шаровидную форму, сильно сморщены, имеют вмятины со всех сторон и слабо развитую систему внутренних мембран; способны к атипичному делению на полужидких питательных средах. Протопласты, в отличие от сферопластов, полностью утрачивают клеточную стенку. Они более характерны для культур грам-положительных бактерий; способны к атипичному делению на полужидких питательных средах; имеют шаровидную форму, слабо развитую систему внутренних мембран; способны к увеличению в размерах, к слиянию. Названные транзиторные формы, при устранении неблагоприятных факторов, быстро реверсируют.

Далее следуют собственно L-формы, объединенные общим L-фенотипом.

Незавершенные L-формы (M-цикл) – разной величины шаровидные и вакуолизированные образования сферопластного и протопластного типа, в отсутствие элементарных тел. При пересевах на средах с осмотическими стабилизаторами и сывороткой каждый раз повторяют цикл репродукции бактериальная форма – гигантские L-формные клетки; к самостоятельной репродукции не способны; на обычных питательных средах реверсируют быстро и полно.

Нестабильные L-формы обладают типичным полиморфизмом; размерами 0,2-50 мкм; размножение множественное; имеют две мембраны на поверхности клетки и некоторые антигены клеточной стенки (химическими методами обнаруживаются основные компоненты пептидогликана – диаминопимелиновая и муравовая кислоты); фагочувствительны, медленно и не совсем полноценно реверсируют на обычных средах.

Условно стабильные L-формы массовой конверсии требуют присутствия сыворотки в среде; способны реверсировать только при дополнительных изменениях условий культивирования.

Стабильные L-формы образуются в результате мутации. В отличие от нестабильных L-форм они не реверсируют в исходную культуру при устранении индуцирующего фактора и изменении условий культивирования; имеют одну мембрану на поверхности клетки, полностью утратили антигены клеточной стенки (ни пептидогликан, ни его предшественники не обнаруживаются никакими методами), фагорезистентны.

Выживают ли CWDB в клетках хозяина достаточно долго и способны ли при этом вызвать патологический процесс? И можно ли данные, касающиеся L-форм в культуре клеток, экстраполировать на ситуации *in vivo* и на различные виды бактерий?

В попытках дать ответ на эти вопросы, наиболее целесообразно попытаться понять репродуктивный цикл L-форм. Общеизвестно, что большинство CWDB обычно размножаются путем бинарного деления. Однако в качестве способов репликации CWDB наблюдались все морфологические вариации, включая множественное деление, деление в разных плоскостях, почкование, филаментозный рост, фрагментация цитоплазмы и др., хотя в целом способы размножения L-форм мало эффективны. Большинство образующихся дочерних особей отличаются по размерам, наличию нуклеоида, жизнеспособности. Микроорганизмы, подвергающиеся спонтанной трансформации, могут реплицироваться серийно как неригидные сферические

или высоко плеоморфные формы. Способность к образованию элементарных тел, похожих на семена и таких маленьких, как некоторые вирусы, дает возможность для CWDB проходить через бактериальные фильтры [2].

На биологическую сущность фильтрующихся форм (или элементарных телец) высказывались различные точки зрения: (1) они являются минимальными репродуктивными клетками L-форм, проявлением одного из этапов L-трансформации; (2) это частицы, оставшиеся после разрушения клеток, содержащие ядерное вещество; (3) элементарные тела – это результат приспособительной изменчивости микробов в неблагоприятных условиях внешней среды; (4) начальная стадия онтогенетического цикла развития клеточных форм [4].

В пользу первой из приведенных точек зрения говорят следующие факты: фильтрующиеся формы и элементарные тельца могут образовываться из больших и шаровидных тел, нитевидных структур всевозможными способами. Речь идет о почковании на поверхности клетки, в вакуоли материнской клетки, формировании их из уплотненных участков цитоплазмы внутри клетки, в результате «расщепления» цитоплазмы, из участков цитоплазмы, окруженных миелиноподобными структурами, отделением периферического участка от остальной части цитоплазмы в результате врастания мембраны между ними. Существует девять типов элементарных тел, различающихся по структуре и предполагаемой жизнеспособности [2].

Green et al. попытались организовать в логическую последовательность наблюдения, сделанные над ростом, морфологией и ультраструктурой нестабильных L-форм *Enterococcus faecalis* [23]. Исходя из биологических особенностей CWDB, они предположили, что маленькие, плотные, не везикулярные L-формы являются центральным (ядерным) элементом в репродуктивном цикле. Иными словами, плотные формы можно рассматривать в качестве недифференцированных «стволовых клеток», способных самостоятельно развиваться в различных направлениях, в зависимости от полученного стимула. Когда они высвобождаются из везикул материнских форм в окружающую жидкую среду при условиях, неблагоприятных для роста L-форм, то развиваются в транзиторные формы и затем в организмы, содержащие клеточную стенку [1].

Domingue считает, что одна большая везикулярная родительская зрелая форма может развиваться во множество элементарных телец. В дальнейшем они становятся недифференцированными плотными формами, и затем могут быть вытолкнуты из родительской формы как размножающиеся организмы [45]. Такие формы могут сохранять способность к созреванию внутри родительской везикулы или даже вне ее после разрыва так долго, как могут оставаться прикрепленными к ней. Такие «вытолкнутые» родительской формой тельца содержат бактериальный геном и имеют минимальную метаболическую активность (т.е., ферменты и ко-факторы), достаточные, чтобы инициировать выработку энергии и биосинтез. Они могут воспроизводить как дремлющие формы без клеточных стенок, так и реверсировать в бактерии с полноценной клеточной стенкой или же продуцировать оба варианта одновременно. Поэтому выработка плотных телец внутри везикулярной родительской формы представляет еще один тип бактериальной дифференциации.

Высушивание элементарные тельца переносят гораздо эффективнее, чем вегетативные формы (от нескольких месяцев до 10 лет – например, стрептококки, возбудитель дизентерии). Их регенеративные свойства сохраняются, по разным данным, при нагревании до 56°, 60°, 80° С; до 75-90° С - в течение 1-2 часов, до 100° С - в течение 5 минут и даже 1 часа. Элементарные тельца проявляют устойчивость к индуцирующим их образованию факторам (ультразвуку, антибиотикам, бактериофагу, некоторым химическим веществам в определенных концентрациях) [4].

Bisset KA, Tallack J, Bartlett R., проведя ЭМ исследования L-цикла *Bacillus licheniformis* var. *Endoparasiticus* (Benedek), пришли к заключению, что L-фазы *Bacillus licheniformis* имитировали

микроорганизмы различного типа, описанные предыдущими исследователями как связанные с якобы неинфекционными состояниями, особенно с раком и артритом, т.е. микоплазмы, микобактерии, коринебактерии и актиномицеты [46]. Стадии L-цикла, от сферопластов через меньшие и большие «дифтероидные» бактерии к полностью реверсировавшим спорогенным бациллам, отличались от других, главным образом, по степени восстановления клеточных оболочек. Встречаемость у «дифтероидов» не резистентных, с дефектной клеточной стенкой спороподобных телец подтверждает их взаимоотношения с истинной споровой бациллярной стадией. Гигантские, раздутые формы, полагают авторы, являются материнскими клетками для ультрамалых стадий.

Интересно, что Margulis et al. ранее сообщали о неизвестном сопоставимом метаморфическом феномене у свободно живущих спирохет [47]. Они продемонстрировали, что большие клетки спирохет содержали более мелкие интрацитоплазматические спирохеты. Эти организмы, которые выращивали в смешанной культуре и изучали живыми, образовывали ограниченные мембраной плотные тельца. Авторы показали, что протоплазматический цилиндр спирохеты был наполнен сферическими гранулами от 20 до 32 нм в диаметре. Внутри протоплазматического цилиндра и в периплазме больших клеток находились сравнительно гранулированные и флагеллированные маленькие спирохеты. Когда спирохеты подвергали действию воздуха, протоплазматические цилиндры преломлялись и ложились складками внутри наружной мембраны, формируя втягивающиеся мембранные структуры. Исследователи полагают, что втягивающиеся мембранные тельца могут обеспечивать морфологическую основу для возможной устойчивости к кислороду и высушиванию организмов. Они заключили, что эти трансформации могут относиться к (i) способности к обогащению спирохет из высыхающих бактериальных ковриков, (ii) образованию округлых телец спирохет, (iii) непредсказуемому появлению спирохет в тканях пациентов с сифилисом и болезнью Лайма.

Наблюдения телец с плотной цитоплазмой внутри родительских клеток у CWDB энтерококков и других грам-положительных бактерий и протоплазматических цилиндров внутри единой общей мембраны спирохет, заставляют предположить, что повторное появление возбудителя при определенных хронических бактериальных инфекциях, включая спирохетозы, относится к бактериальной дифференциации в устойчивые формы (элементарные плотные цитоплазматические тельца), которые персистируют в тканях [23, 42, 47, 48]. Элементарные тела, которые произошли от L-форм, могут вырастать в недифференцированные формы. Более мелкие плотные тельца внутри везикул, полагают авторы, не играют большой роли в репродукции – они требуются при дефиците или отсутствии ДНК [23].

Непременным условием развития в бактериальные формы субмикроскопических фильтрующихся телец, образующихся под влиянием пенициллина, является предварительная агрегация элементарных телец в скопления. Реверсия активизируется в присутствии убитых тел гомологичных бактерий («кормилок»): густой взвеси гомологичных бактерий в бульоне, инкубированной в термостате в течение 4-6 часов, а затем прогретой при 100 °C в течение 30-60 минут (принцип «ферментированной среды»). В качестве «кормилок» можно использовать культуры сарцин, стафилококков, дрожжей. Однако стимулирующие свойства «кормилок» не постоянны; варьирует этот признак и внутри популяции одного штамма; кормилочные свойства не совпадают с симбиотическими [4].

В любом случае, роль плотных телец как резистентных форм патогенных бактерий заслуживает дальнейшего исследования [45]. Относительно реверсии плотных телец в бактерии с клеточной стенкой Green et al. предполагают, что компоненты L-форм включаются во вновь образованные классические бактерии [23]. В пользу такого суждения говорит неудача в наблюдении трансформации автономных плотных телец в бактериальные формы с полноценной клеточной стенкой.

Если появление жизнеспособных персистентных телец является универсальным признаком бактериальных L-форм, то предстоит ответить на вопросы об их химической и иммунологической природе. В литературе имеются данные о деталях, касающихся сборки микробных фрагментов внутри сфероидных полимеров, которые заслуживают рассмотрения учеными, специализирующимися в таких вопросах как клеточная адгезия, транспорт генетических элементов, микробная сборка как механизм развития необычных организмов [1, 49-52].

DeCastro-Costa MR, Landman OE. при изучении L-трансформации *B. subtilis* установили, что реверсию протопластов и L-форм *Bacillus subtilis* к исходному состоянию контролирует ингибиторный белок [55]. Когда клеточная стенка *Bacillus subtilis* устраняется лизоцимом, и получившиеся протопласты пересеваются на гипертонической мягкой агаровой среде, каждый протопласт формирует L-колонию. L-тельца из таких колоний опять пересеваются как L-колониобразующие единицы (L-КОЕ). Однако если протопласты или L-тельца являются «обусловленными» 1-часовой инкубацией в 0,4 % казеиново-гидролизатной среде и затем инкубируются в 25 % желатиновой среде в течение 1 часа, то от 60 до 100 % прежде лишенных оболочки клеток реверсируют в бациллярные колонии. Проведенные эксперименты в значительной степени объясняют механизм, ответственный за «наследуемое» продолжение существования бесстеночного состояния у *B. subtilis*. Показано, что протопласты продуцируют реверсивный ингибирующий фактор (РИФ), который блокирует реверсию, когда клеточная концентрация превышает  $5 \cdot 10^5$  L-КОЕ /мл. Этот ингибитор не диализируется и чувствителен к трипсину, нагреванию и детергенту. Эффективная реверсия при  $2 \cdot 10^7$  L-КОЕ /мл получается, если протопласты обработать трипсином после создания соответствующих условий и внесения хлорамфеникола в желатиновую реверсионную среду. В присутствии 500  $\mu\text{g}$  трипсина в 1 мл потребность в желатине резко уменьшается, и реверсия быстро происходит в жидкой среде, содержащей только 10 % желатина. Трипсин также стимулирует реверсию у L-колоний, растущих на мягком агаре. Скрытый РИФ активируется бета-меркаптоэтанолом. Этот реагент блокирует реверсию суспензии протопластов плотностью  $5 \cdot 10^5$  L-КОЕ /мл. Сравнение аутолитических закономерностей *B. subtilis* и РИФ выявило, что оба подавляются высокими концентрациями желатина, оба активируются бета-меркаптоэтанолом, и оба имеют высокое сродство (аффинитет) к клеточной стенке. Допуская, что РИФ является аутолизиним, предлагаются модели реверсии протопластов, заключающиеся в том, что мутанты с измененной тейхоевой кислотой демонстрируют измененные реверсивные закономерности.

#### **Метаболическая активность L-форм**

Известно, что L-формы сохраняют, как правило, антигенные, биохимические и метаболические характеристики родительских бактерий. Однако свойства aberrantных бактериальных форм, изолированных из клинических образцов, не всегда совпадают с таковыми исходных бактерий из-за разнообразия биотипов, которые у конкретного пациента, по-видимому, имеют происхождение из единого генома и вида [1]. Нередко в изначальной культуре ревертанов, полученных из клинического материала, демонстрировались вариации паттернов биохимической активности индивидуальных, морфологически идентичных колоний. Если эти свойства стабильны, то возможно они представляют собой мутационные события, благоприятствующие выживанию и селекции CWDB in vivo, как, например, при хронических инфекционных заболеваниях [11].

Исследования Landman и др. дали ответы на вопросы о природе наследственных механизмов, объясняющих стабильность L-форм [8, 53, 54]. Набор генов у L-форм, вероятно, тот же самый, что и у родительских бактерий, от которых L-формы произошли. Когда бактериальные клетки конверсируют в L-формы или когда они реверсируют в исходные бактерии, очевидно, что приобретения или потери нуклеиновой кислоты не происходит. Показано, например, что каждая клетка *Bacillus subtilis* может конверсировать в L-

формы, и каждая L-форма может восстановить клеточную стенку. Данное заключение фокусируется на двух ключевых событиях: потеря способности к формированию клеточной стенки и способность клеток восстанавливать клеточную стенку. У *B. subtilis* первое из них наступает, когда остатки клеточной стенки удалены лизоцимом. У грам-негативных бактерий, таких как *Escherichia coli* и *Salmonella spp.*, установлено, что оно реализуется при утрате остатков липопротеин-липополисахарида клеточной стенки.

Реверсия к стеночным формам может быть завершенной (с полным восстановлением всех первоначальных свойств) и незавершенной (морфологические, биологические и биохимические свойства полностью не восстанавливаются) и значительно отличается у разных бактериальных видов [2]. Для *B. subtilis* сообщалось, что ранним шагом в этом процессе является образование стеночного слоя снаружи клеточной мембраны; вслед за этим следует образование перегородок и мезосом [1].

Наблюдая в электронный микроскоп образование сферопластов *Mycobacterium smegmatis* и морфологические аспекты их реверсии в бациллярные формы, Udou T, Ogawa M, Mizuguchi Y. установили два очевидных способа реверсии в бациллярную форму [33]. Первый из них был инициирован почкованием сферопластов: почки постепенно удлинялись, становились мицелиальными формами, которые проявляли ветвление, появление перегородок и фрагментирование. Второй следовал из внутриклеточного образования мельчайших клеток, возможно, элементарных телец, и их освобождения из сферопластов.

#### **Фагоцитоз CWDB**

Принципиально важным следует считать выяснение закономерностей взаимодействия CWDB с защитными механизмами макроорганизма, в том числе их поведение в процессе фагоцитоза. Опубликованные результаты предпринятых в этом отношении экспериментов с привлечением различных видов бактерий проливают свет на данный вопрос [56-61]. Чтобы определить, способны ли L-формы выживать в процессе фагоцитоза, Schmitt-Slomska et al. были предприняты интенсивные исследования ассоциации стрептококковых группы А L-форм (индуцированных *in vitro* пенициллином) с человеческими полиморфноядерными лейкоцитами (ПЯЛ) и мышинными перитонеальными макрофагами [56]. L-формы легко ассоциировались с клетками и часто оказывались фагоцитированными. При этом фагоцитированные клетки не подвергались патологическим изменениям, если инокулят оставался в определенных количественных пределах.

Выживание L-форм стрептококка группы А изучалось также в условиях их персистенции в сыворотке животных и человека, ПЯЛ и мышинных перитонеальных макрофагах. Было подтверждено, что бактерицидное действие в отношении обычных бактерий, имеющих клеточную стенку, связано с системой антител комплемента. Киллер-эффект фагоцитов на L-формы менее заметен. Таким образом, фагоцитоз может защищать L-формы от действия сыворотки, позволяя этим формам выжить внутри фагоцитов. Отсюда могут проистекать трудности в получении L-форм из культур крови человека. Повысить выделение aberrантных микроорганизмов могут средства разрушения клеток хозяина, применяемые вслед за инокуляцией в специальную осмотически стабилизированную среду.

Аналогичные ЭМ исследования, проведенные на перитонеальных макрофагах крыс со *Staphylococcus aureus* и оксациллин-индуцированными стабильными L-формами этого штамма показали, что последние подвергались перевариванию без соответствующего образования фаголизосом и пищеварительных вакуолей; отсутствовали видимые повреждения клеток, что также свидетельствует о возможности их внутриклеточного выживания [57].

Чтобы определить, выживаемость L-форм в процессе фагоцитоза, были также проведены исследования культуры *Escherichia coli* O4 CWDB, меченной тритиевым тимидином. При этом использовался метод ауторадиографии в фагоцитарной системе *in vitro*, содержащей ПЯЛ [58]. Результаты данного исследования

ясно показывают, что *E.coli* O4 CWDB устойчивы к фагоцитарной активности *in vitro*. Так, у CWDB оказался значительно сниженный фагоцитарный индекс (процент ПЯЛ, содержащих переваренные микроорганизмы) по сравнению с родительскими бактериями. Результаты репрезентативных экспериментов показали, что фагоцитарный индекс для CWDB был постоянным. Через 30 минут после смешения CWDB с фагоцитами он составлял 5,3 по сравнению с фагоцитарным индексом 44 у родительских бактерий, при этом обе культуры сравнивались в присутствии специфической антисыворотки против CWDB. Экспозиция фагоцитарной системы с антисывороткой к родительской культуре *E. coli* O4 показала, что фагоцитоз CWDB имел индекс 10,6 по сравнению с показателем 45 для родительских бактерий. Хотя и отмечалась адгезия CWDB к ПЯЛ, CWDB не были сильно подвержены перевариванию фагоцитами. Остается неизвестным, какие молекулы на поверхности CWDB способствуют устойчивости и выживанию в условиях фагоцитоза. В широком исследовании нуждаются механизмы, посредством которых CWDB избегают бактерицидного действия клеток хозяина *in vivo*.

Иванова Е. и др. установили, что цитоплазматические мембраны стабильных L-форм *E. coli* WF+ вызывали 4-5-кратное увеличение количества экссудативных клеток у мышей после 1-кратного интраперитонеального введения по сравнению с введением родительских клеток или L-форм *per se*. Бактерицидная активность макрофагов также была увеличена в 6-10 раз [59].

L-формы *Yersinia pestis* плохо фагоцитировались и длительное время могли персистировать в фагоцитах [60].

Отмечено также, что после фагоцитоза *in vitro* и *in vivo* ревертанты L-форм *Klebsiella pneumoniae* выживали, но не увеличивались в количественном отношении в отличие от родительских форм [61].

Герасимов В.Н. и др. инфицировали различными патогенными штаммами *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) культуры мышинных перитонеальных макрофагов и макрофагоподобных клеток J-774 и установили, что микобактерии при этом подверглись значительным морфофункциональным изменениям, образуя 3 условных морфотипа [62]. При фагоцитозе некоторые бактерии, поступающие из окружающей среды в макрофаг, выживали и были отнесены к МБТ 1-го типа. Среди них единичные молодые и интактные микобактерии были способны размножиться и формировали через 2-3 генерации микроколонию 2-го морфотипа, состоящие из 3-9 микобактерий или больше в фаголизосомах в течение 24 часов после инокуляции макрофагов. Утрачивая клеточную стенку под действием литических фаголизосомальных ферментов, единичные микобактерии превращались в L-формы 3-го типа МБТ. Другие микобактерии, подвергаясь повреждению и лизису, могли при этом сохранять часть интактной цитоплазмы и генома, образуя ультрамалые формы (4 морфотип).

#### ***Антигенные и иммуногенные свойства L-форм***

Антигенная характеристика стабильных L-форм изучена мало; имеющиеся данные противоречивы, но указывают на возможные отличия от родительских форм. Так, стабильные L-формы стрептококка группы А содержат комплекс антигенов, не выявляемых в различных серологических реакциях (РПГА, РИФ, двойной диффузии в геле, агрегат-гемагглютинации) у исходных культур. С помощью термической экстракции из стабильной L-формы стрептококка получен комплементсвязывающий антиген, отсутствующий у родительских штаммов; с помощью ультразвуковой (УЗ) дезинтеграции – комплексный растворимый антиген, не обнаруженный у интактных родительских штаммов, реагирующий в РПГА с гомологичными антисыворотками в высоких титрах [2]. Он отличался высокой специфичностью и был связан в одинаковой мере как с фракцией супернатанта УЗ-дезинтеграта, так и с осадочной фракцией. У интактного стрептококка эти антигены связаны преимущественно с осадочной фракцией.

Растворимый антиген L-форм стрептококка по сравнению с аналогичным антигеном, полученным при УЗ-дезинтеграции культуры интактных микроорганизмов, отличался более высокой антигенной активностью:

антисыворотка к осадочной фракции УЗ-дезинтеграта интактного стрептококка реагировала с гомологичным антигеном в разведении (1:20480), а с антигеном L-форм - (1:1280); в то же время антисыворотка к осадочной фракции УЗ-дезинтеграта L-форм реагировала с гомологичным антигеном в разведении (1:40960), а с антигеном интактного стрептококка всего лишь в разведении (1:160) [2]. По составу липидов, углеводов, белков растворимый антиген стабильных L-форм отличался от аналогично приготовленного антигена интактных стрептококков.

С помощью реакций кольцевой преципитации, гель-диффузии, пассивной гемагглютинации, агрегат-гемагглютинации, иммуноферритинового метода показана возможность обнаружения специфических антигенов L-форм стрептококков групп А и В [63]. Данные Hirachi Y, Kotani S. подтверждают существование видоспецифических антигенов клеточных мембран L-форм различных видов бактерий [64].

Вместе с тем в литературе имеются сообщения о наличии перекрестно реагирующих антигенов у стабильных L-форм *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus pyogenes*, выявляемых в реакции пассивной гемагглютинации и гель-иммунодиффузии [65].

Ревертанты стрептококка независимо от их происхождения обладали общим групповым антигенным компонентом [2].

Показано, что CWDB (нестабильные, реверсирующие L-формы), происходящие от *Proteus mirabilis*, вызывали образование антител на CWDB, которые перекрестно реагировали с исходными классическими бактериями. Установлены различия в содержании набора жирных кислот, фосфолипидов и липополисахаридов у *Proteus mirabilis* и его стабильных протопластных L-форм [66].

Изолированные мембраны лишенных клеточной стенки протопластных L-форм *Proteus mirabilis* были охарактеризованы по плотности градиента центрифугирования и путем определения их главных химических ингредиентов (белков, фосфолипидов и липополисахаридов) и некоторых специфических маркеров-энзимов цитоплазматической мембраны. В большинстве случаев мембрана протопластов L-форм походила на бактериальную цитоплазматическую мембрану, но с заметными модификациями. Были обнаружены значительные количества липополисахаридов, обычно образующих исключительно наружную мембрану. Более того, мембраны L-форм содержали функции сокращения никотинамид аденин динуклеотидоксидазной системы, Д-лактат дегидрогеназы (EC 1.1.1.28) и сукцинат дегидрогеназы (EC 1.3.99.1) по специфической активности сравнимой или, в некоторых случаях, значительно выше, чем, у присутствующих в цитоплазматических мембранах бактериальных форм. Из двух пептидогликан ДД-карбоксипептидаза/транспептидаз (EC 3.4.17.8 и EC 2.3.2.10), обычно присутствующих в цитоплазматических мембранах бактериальных форм *P. mirabilis*, мембрана протопластных L-форм содержала только одну. ЭМ тонкого среза протопластных L-форм показала сильную гетерогенность мембранных структур. В дополнение к единственной мембранной оболочке, имелись внутренние ограниченные мембраной пузырьки и множественные кипы мембран как результат несбалансированного роста и мембранного синтеза в состоянии L-форм [67].

Тест фиксации комплемента и иммунофлюоресцентные исследования продемонстрировали, что L-формы микобактерий сохраняют свои видоспецифические и родоспецифические детерминанты и присущую им серологическую активность. L-варианты, полученные различными методами, отличаются по размеру, зависящему от степени деструкции их клеточной стенки. Были получены специфические антисыворотки к L-формам микобактерий, пригодные для использования в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Эти антисыворотки высокоспецифичны и позволяют не только быстро выявить, но также идентифицировать L-формы [68].

Исследования Schmitt-Slomska J et al., изучая *in vivo* конверсию *Brucella suis* в состояние L-форм с помощью ЭМ, установили, что L-формы, изолированные из селезенки мышей, имели экстрацеллюлярные многослойные «мембранные» структуры в отсутствие слоев клеточной стенки [69]. У стабильных L-форм, адаптированных к росту на обычной среде для бруцелл, наблюдались многочисленные мелкие плотные тельца, ограниченные единой мембраной. Химический анализ стабильных L-форм показал отсутствие диаминопимелиновой кислоты, подтверждающей отсутствие пептидогликана. Результат химического определения у L-форм Na-2-keto-3-deoxyoctonate был отрицательным. Однако биологические методы наводят авторов на мысль, что компоненты наружной мембраны, такие как LPS и рецепторы бактериофага Weybridge все же у L-форм остаются, хотя в уменьшенном количестве по сравнению с родительскими бруцеллами.

Показано, что L-формы бактерий сохраняют иммуногенность для большого круга хозяев, они способны вызывать как гуморальный, так и клеточно-опосредованный иммунитет [1-3, 8, 70-72]. Иммуногенность L-форм, однако, значительно ослаблена по сравнению с исходной культурой, что делает необходимым существенное увеличение иммунизирующих доз при вакцинации L-культурой [2]. По данным Agarwal S.C., Sundararaj T., лизаты L-форм холерного вибриона при парентеральном и энтеральном введении кроликам и добровольцам даже при однократном введении вызывали повышение клеточно-опосредованного иммунитета. РНК-белковая фракция лизата L-форм холерного вибриона стимулировала у кроликов клеточный иммунитет [70].

При иммунизации кроликов стабильными L-формами стрептококка образуются антитела Ig G и Ig M классов. Иммуноглобулины G обладают способностью ингибировать рост стабильных L-форм *in vitro*. Ig M не ингибируют роста L-форм, а значит, не способны элиминировать их из организма, при этом Ig M преобладают у 65-68 % больных ревматизмом. Антитела к L-формам при разных стрептококковых инфекциях находил Crawford [71]. Экспериментальная ангина обезьян, вызванная L-формами стрептококка, сопровождалась подъемом уровня специфических антител. Интраперитонеальная имплантация лабораторным животным диффузионных камер, содержащих L-формы  $\beta$ -гемолитического стрептококка группы А, сопровождалась продукцией антител к цитоплазматической мембране L-форм и экстрацеллюлярного О-стрептолизина [2].

Вакцинация авирулентными L-формами *Salmonella typhimurium* LT2, как показали эксперименты Nishikawa F. et al., обеспечивала у мышей линии СЗН/HeJ, обладающих врожденной гиперчувствительностью, сильную защиту против летальной дозы их родительских бактерий [72]. Протективный иммунитет начинал работать между 4 и 6 неделями после иммунизации и оставался активным до тех пор, пока L-формы колонизировали печень животных (до 24 недель после иммунизации). Цитоплазматические антигены сальмонелл принимали участие в формировании иммунологических реакций на вакцинацию L-формами этих бактерий.

Субфракция человеческой сыворотки – липопротеин высокой плотности – способна инактивировать нестабильные L-формы *Staphylococcus aureus* [73]. Мембраны L-форм *S. aureus*, способные индуцировать клеточный иммунитет у мышей, имеют общие антигены с *Acholeplasma laidlawii* PG8 [74].

Постоянный рост титра антител к стабильным L-формам *Streptococcus faecalis*, введенным гнотобионтным крысам, предполагает, что микроорганизмы, хотя и не могли культивироваться *in vitro*, продолжали оставаться в тканях [11].

Установлено, что цитоплазматические мембраны стабильных L-форм *E.coli* WF+ усиливают антителообразование у кроликов во время экспериментальной гипериммунизации клетками *S. pyogenes* A49 и *P.mirabilis* D52, а также повышают клеточно-опосредованный иммунитет у морских свинок на введение белковых антигенов тех же самых бактериальных штаммов, т.е. обладают адьювантной активностью [75].

Показано, что мембраны стабильных протопластов L-форм *P. mirabilis* штамм VI проявили высокую степень иммуногенности в качестве носителя липополисахарида по сравнению с иммунным ответом на липополисахарид, содержащийся в клеточных стенках исходных бактериальных форм данного микроорганизма [76].

Многие из компонентов бактериальных мембран имеют общие антигенные детерминанты с тканями млекопитающих. Методом непрямой иммунофлюоресценции показано сходство между антигенными компонентами L-форм стрептококка и миоидными клетками тимуса человека [77]. Аналогичный антиген (или антигены) присутствовали в цитоплазматической мембране человеческих миокардиоцитов.

У хозяев, иммунизированных L-формами, показано развитие воспалительных реакций и аутоаллергических процессов. Поэтому персистенция L-форм может вести к длительному снижению уровня иммуногенной стимуляции хозяина и пуску иммунопатологических событий. Возможно, что многие из так называемых аутоиммунных болезней представляют иммунологические реакции, инициированные персистенцией CWDB, которые перекрестно реагируют с тканями хозяина [1, 2].

Антисыворотки к очищенным мембранам протопластов стрептококка группы A, свободным от элементов цитоплазмы и клеточных стенок, реагировали в высоких титрах с антигеном сердечной мышцы, что говорит об антигенной связи цитоплазматической мембраны протопластов стрептококка с антигенами сарколеммы мышечной ткани сердца млекопитающих [2].

#### ***Сенсибилизирующие свойства CWDB***

L-формы проявляют сенсибилизирующие свойства: так, инъекция антигенов L-форм стрептококка в суставную сумку с последующим их введением в кровь сопровождается резко выраженной суставной реакцией в виде значительной отека и болезненности сустава с большим количеством серозно-кровянистого экссудата (феномен Шварцмана). Отмечен перекрестный сенсибилизирующий эффект между антигенами бактериальных и L-форм стрептококка [2].

Гиперергический иммунный ответ (анафилаксия) был продемонстрирован на морских свинках, сенсибилизированных сфероид-содержащими CWDB или супернатантом жидкой культуры CWDB, полученной из крови человека с хроническим заболеванием почек [11]. В экспериментах супернатанты были более анафилактогенными, чем собственно сфероиды. Автоклавирование сенсибилизирующего препарата не препятствовало сенсибилизирующему эффекту. Эти данные заставляют предположить, что растворимые антигены связаны с кровяным лизатом, полученным из сфероид-содержащих CWDB, и что они являются потенциальными инициаторами анафилактической реакции у морских свинок, сенсибилизированных как сфероидами, так и супернатантами культуры сфероидов. Введение сыворотки, полученной от сенсибилизированных морских свинок, интактным животным вызвало тяжелую реакцию (без летального исхода) у 14 из 33 морских свинок, пассивно иммунизированных и спровоцированных супернатантами культуры сфероидов. Эта реакция была схожей с анафилактической реакцией, наблюдавшейся у активно сенсибилизированных животных.

Дальнейшие исследования были предприняты, чтобы определить, являются ли культуральные супернатанты токсичными *per se*. Морским свинкам, которые не подвергались предварительной сенсибилизации, ввели внутривенно различные количества культурального супернатанта. 2 мл супернатанта культуры сфероидов вызвали сильную реакцию, не похожую на ту, что наблюдалась у сенсибилизированных морских свинок, и 9 из 9 животных погибли в течение 24 часов. Чтобы убедиться, что реакция и смерть последовали не в результате реакции на питательную среду, 8 животным были введены 2 мл стерильного бульона, и ни одно из них не дало реакции. Эти данные говорят о том, что токсические субстанции были

связаны с супернатантом жидкой культуры, полученной из культуры сфероид-содержащих CWDB кровяного лизата человека с хроническим почечным заболеванием (идиопатическая гематурия, нефритический синдром, системная красная волчанка, почечный синдром Фанкони).

Были сделаны попытки глубже изучить природу антигенов, вызывающих реакцию у сенсibilизированных и несенсibilизированных животных. Супернатанты сфероидных культур были диализованы против дистиллированной воды. Во время диализа на мембране формировался преципитат. Животные, сенсibilизированные материалом, остающимся на диализной мембране, демонстрировали тяжелую реакцию со смертельным исходом, вызванную супернатантом жидкой культуры сфероидов или материалом, остающимся в диализном мешке. Из 46 животных 46 имели тяжелую реакцию и 25 умерли через 15 минут с момента инъекции разрешающей дозы. 45 морских свинок, которые не были предварительно сенсibilизированы каким-либо антигеном, не прореагировали на провокацию культурой сфероидов, супернатантами культуры сфероидов, автоклавируемыми сфероидами или культуральными супернатантами и диализованными супернатантами, взятыми в количестве, меньшем, чем 2 мл.

Сенсibilизирующие и разрешающие антигены авторами были охарактеризованы неполностью. Однако предварительная ультрафильтрация показала, что молекулярный вес материала, провоцирующего гипериммунный ответ после введения разрешающей дозы сенсibilизированным животным, был меньше 30,000. Химические исследования показали, что материал содержал 60 % белка, 8 % углеводов и 32 % липидов. В качестве сенсibilизирующего антигена также были использованы ревертантные бактерии, произошедшие от сфероид-содержащих CWDB, которые были получены из разведенной фильтрованной крови пациента. Тяжелая реакция (такая, как описано для сфероид-содержащих CWDB) развилась у 8 из 10 животных, 6 из них погибли от разрешающей дозы супернатанта культуры сфероидов. Контрольные животные, сенсibilизированные ревертантными бактериями и получившие стерильную бульонную среду в качестве разрешающей дозы, остались интактными.

Сенсibilизация животных стерильной культуральной средой и неполным адьювантом Freund и последующая провокация их сфероидами и супернатантом культуры сфероидов не вызывала реакции, подтверждающей, что сенсibilизирующие антигены происходили из сфероидов, содержащих CWDB или культуральные супернатанты. Когда осадок мочи пациента с хроническим почечным заболеванием (содержащий CWDB, но в отсутствие обычных культивируемых бактерий) смешали с неполным адьювантом Freund и инъецировали в качестве сенсibilизирующего антигена морским свинкам, 5 из 5 животных дали сильную реакцию на инъекцию супернатанта культур сфероидов, полученных из лизированной крови пациента, и 4 из 5 животных погибли [11]. Мочевые осадки, содержащие CWDB, но лишенные обычных бактерий, также сенсibilизировали животных, вызывая гиперергическую реакцию на введение разрешающей дозы супернатантов культуры сфероидов, полученных из кровяного лизата пациента. Эти данные заставляют предположить, что в моче и в крови одного и того же пациента имелись общие антигены CWDB.

Резюме этих исследований в том, что и анафилактическая и анафилактоидная иммунная патология и токсические реакции связаны со сфероидами, содержащими CWDB, полученными из кровяных лизатов и мочи пациентов с хроническими почечными заболеваниями.

## 2. Патогенные потенции L-форм *in vitro*

Широко предпринимаемые исследования патогенных потенциалов CWDB нашли отражение в большом количестве данных, полученных в эксперименте *in vitro* и *in vivo* при заражении перевиваемых клеточных культур, куриных эмбрионов, в экспериментах на животных [1-3, 8, 11, 23, 28, 56, 60, 61, 78, 79, 81, 82].

Как правило, L-формы, образовавшиеся в условиях питательной среды, утрачивают вирулентность исходного штамма [2]. Тем не менее, установлены факты сохранения факторов вирулентности бактерий различных видов после их перехода в L-формы, а именно: выработка эндотоксина у сальмонелл; синтез нейраминидазы у холерных вибрионов; каталазная активность у микобактерий туберкулеза, протей, стафилококков; выработка (причем в гораздо большей степени, чем у исходных форм) экзотоксина у *Clostridium tetani* и *Cl.perfringens*; способность к образованию плазмокоагулазы у стафилококка; синтез гемолизина, стрептокиназы, дезоксирибонуклеазы, стрептолизина и M-белка у гемолитических стрептококков группы A. Супернатанты стабильных L-форм листерий содержали нейротоксичные для мышей экзопродукты [2].

Schmitt-Slomska et al. подтвердили возможность конверсии бактерий в CWDB в культуре клеток без антибиотика [91]. Человеческие диплоидные клетки, инфицированные жизнеспособным стрептококком группы A, выживали и после этого нормально делились и благоденствовали. После нескольких делений человеческих клеток, микроорганизмы персистировали только как большие, изолированные поглощенные кокки и не могли расти на обычной бактериологической среде. При культивировании на среде для L-форм, тем не менее, развивались типичные колонии L-форм. Они хорошо росли на среде, содержащей пенициллин или ванкомицин. После нескольких пассажей на среде без антибиотиков микроорганизмы реверсировали в родительские стрептококки группы A. В других экспериментах авторы обнаружили, что полученные *in vitro* L-формы стрептококка группы A размножались внутриклеточно и пассировались от клетки к клетке без повреждения морфологии клеточной линии или скорости деления клеток. Аналогичные данные с *S. faecalis* в культуре клеток были отмечены Green et al. [79]. О способности L-форм *S. pyogenes* расти в клетках сердца и почек человека без разрушения культуры клеток сообщалось Leon и Panos [28]. Они подтвердили ранние работы Кагана и др. и Madoff по цитопатогенному действию L-форм стрептококка группы A [1-3, 12]. Объяснением для описанной Leon и Каган патологии может быть спонтанная реверсия L-форм *in vivo* в отсутствие культуральных доказательств стеночных форм бактерий *in vitro*.

Патогенность нестабильных L-форм может быть обусловлена сохранением факторов патогенности родительских бактерий и способностью к реверсии с восстановлением исходной степени вирулентности. Guze L.V. et al. протестировали вирулентность ревертантов L-форм *Klebsiella pneumoniae* и установили, что даже после 40 пассажей через брюшную полость мышей вирулентность ревертантов не восстановилась, не вызывали они инфекции и при подкожном введении [61]. В единичных случаях, однако, вирулентность восстанавливается и даже повышается [2].

Типичные колонии L-форм были изолированы из клеточной культуры почек хомяка после экспериментальной инфекции классическими бактериальными формами *B. abortus* [1]. Изучение патогенности нестабильных L-форм бруцелл и их ревертантов, полученных *in vitro*, показало, что последние вызывали незначительную реакцию ретикуло-эндотелиальной системы *in vivo* и в то же время демонстрировали определенный уровень токсичности, приближаясь в этом отношении к исходной вирулентной культуре [78].

В серии экспериментов культура фибробластов почек человеческого эмбриона была инфицирована *Streptococcus faecalis* CWDB (относительно стабильной L-формой, способной реверсировать в стеночно-содержащую форму, т.е. нестабильную L-форму). В первые несколько дней после внесения инокулята в культуру клеток при ЭМ исследовании клетки выглядели обычно, несмотря на то, что они содержали

фагоцитированные везикулы L-форм. Однако серии последовательных ЭМ-исследований выявили постепенный аутолиз этих образований и появление множества элементарных телец, которые отличались размерами и морфологией, но не повреждали культуру клеток.

Патология, наблюдаемая в культуре клеток, инокулированной относительно стабильными L-формами, инициировалась, когда L-формы реверсировали в содержащие клеточную стенку бактерии. Предполагается, что аккумуляция электроннонепрозрачного материала и формирование мезосомоподобных структур синонимично как старению и смерти, так и предпосылке реверсии в бактериальную форму [23]. Поэтому реверсия к формам, содержащим клеточную стенку, так же как и старение с последующей смертью L-форм, может быть действием общих причин, а именно, истощением наличных питательных веществ и аккумуляцией токсических продуктов в ростовой среде.

С появлением транзиторных форм, содержащих некоторые фрагменты клеточной стенки, повреждение и гибель культуры клеток происходили одновременно с полной реверсией многих транзиторных вариантов в бактерии с полноценными клеточными стенками. Реверсия была спорадической, происходила в различных экспериментах на 4, 5, 14, 25, 29, 30, 56 и 63 день после инокуляции. Выживание нестабильных L-форм в течение длительного периода времени в этой системе было особенно интересным в виду того, что (по данным ЭМ) в отсутствие культуры клеток почечных фибробластов человеческого эмбриона нестабильные L-формы выживали на питательной среде только 14-48 часов. Таким образом, культура клеток давала им некоторую защиту.

Стабильные L-формы (неспособные реверсировать в исходные бактерии), происходящие от другого штамма *S. faecalis*, использовались при выращивании на культуре клеток эмбриона и произрастали на ней до 73 дня после инфицирования [79].

Персистенция стабильных плотных телец L-форм была подтверждена методом непрямой иммуофлюоресценции, в котором использовались антитела к стабильным L-формам.

Стабильные L-формы патогенных видов могут быть либо авирулентными, либо сохранять степень патогенности исходного вида бактерий, либо приобретать дополнительные признаки патогенности, отсутствующие у исходных бактериальных культур [2].

Осмотически стабилизированные L-формы выживали и были способны быстро разрушать тканевую культуру человеческих сердечных клеток Girardi [28].

Различия в культуральных свойствах стабильных и нестабильных L-форм в инфицированной культуре клеток в различные временные интервалы после инокуляции может отражать их главные морфологические отличия, а именно: преобладание плотных непрозрачных форм и свободно плавающих плотных телец в культуре стабильных L-форм в отличие от преобладания везикулярных форм, содержащих плотные тельца в везикулах нестабильных форм [1].

Эти данные ясно показывают, что стабильные L-формы могут продолжительно персистировать в клетках, оставаясь жизнеспособными, и высеваться из этих клеток в качестве L-форм *per se*.

В природе способы выживания имеют тенденцию к повторению. Общеизвестно, что многие живые формы, среди них возбудители малярии, трипаносомы, хламидии, имеют комплекс внутри- и внеклеточных жизненных циклов с замечательным плеоморфизмом фаз. Бактерии также используют такую жизненную стратегию [79]. L-формы способны вызывать острую деструктивную инфекцию культуры клеток (ЦПД) *in vitro*, хроническую инфекцию (при наличии размножения L-форм) и латенцию (персистенцию) без выраженного размножения в условиях клеточных культур [2]. Поскольку стабильные L-формы могут сосуществовать с

человеческими клетками, не вызывая классической патологии, их судьба (допуская, что они никогда более не обретут способность реверсировать в этой культуре клеток) остается неясной.

### 3. Данные по воспроизведению экспериментальной CWDB-инфекции

В ряде экспериментов удавалось вызвать патологические процессы, индуцированные введением L-форм лабораторным животным. В этом контексте следует упомянуть экспериментальную ангину обезьян с тяжелым течением и последующим воспалительно-дистрофическим поражением миокарда; кардиотоксическое действие при интракардиальном введении и длительном многократном введении L-форм в виде убитых вакцин; моноартикулярные артриты при их внутрисуставном введении; экспериментальный менингит и менингоэнцефалит у кроликов, вызванный L-формами стрептококка, стафилококка, менингококка; экспериментальный пиелонефрит у крыс и кроликов, вызванный L-формами протей, кишечной палочки. Под влиянием повторных инъекций L-форм в больших дозах возникали тяжелые, длительно не заживающие стерильные абсцессы (местная реакция). Установлена возможность гематогенной диссеминации L-форм из очагов репродукции в ткани внутренних органов [1-3]. Нестабильные L-формы *Y.pestis* были изолированы из клещей *Ornithodoros* через 3 года после их экспериментального заражения возбудителем чумы [60].

В эксперименте CWDB были получены *in vivo* из лимфатических узлов, крови, селезенки, печени, легких, плевры, из фагоцитов мочевого пузыря при заражении экспериментальных животных L-формами стрептококка, протей, сальмонеллы, стафилококка, пневмококка, листерий и др.; при подшивании камеры с культурой сальмонелл в брюшную полость экспериментальных животных; при заражении куриных эмбрионов стрептококком [2].

Guze et al. при изучении L-форм *Klebsiella pneumoniae* и влияния роста L-форм на вирулентность ревертантной *K. pneumoniae* сообщили, что у мышей, экспериментально инфицированных L-формами, не было признаков болезни [61]. Имеется мнение, что L-формы могут вызвать персистенцию бактерий, но не воспаление [1]. Эти данные противоречат данным Кагана и др. [8,80], которые, как сказано выше, сообщили, что L-формы стрептококка группы A *per se* являются патогенными для животных. Ревертантные бактерии с aberrantными стенками способны также вызывать пиелонефрит в эксперименте: Ponig et al. [81] показали, что стабилизированные *in vitro* L-формы, полученные от *E.coli* O111, будучи внутривенно введены крысам, в течение 1 дня могут реверсировать в классические родительские формы и вызвать пиелонефрит. При этом у некоторых животных с хроническими инфильтратами и деструкцией тканей через 4 недели в отсутствие родительских бактерий высевались только L-формы.

Прекрасным хозяином для изучения CWDB являются гнотобионтные крысы, потому что они не имеют ни антител, ни микробных контаминантов. Показано, что CWDB (нестабильные, реверсирующие L-формы), происходящие от *Proteus mirabilis*, персистировали до 12 недель у леченных пенициллином гнотобионтных крыс (линия Fisher 344) и вызвали образование антител [11]. Показателен высокий процент CWDB позитивных культур (мозг, селезенка, печень и почки – наиболее часто) в раннем периоде (от 1 до 24 часов) после инокуляции CWDB, происходящих от *P. mirabilis*, но количество позитивных культур значительно сокращалось в позднем периоде (от 72 часов до 6 недель). Посев испражнений дал положительный результат через 72 часа и был позитивным все последующее время на протяжении 12 недель. В данном исследовании CWDB не возвращались в родительские формы *in vivo*, если же реверсия случалась, то CWDB на множественных специфически окрашенных секционных препаратах не наблюдались. Существует возможность, что транзиторные, плеоморфные формы, имеющие лишь остатки клеточной стенки, могут быть устойчивы к

окрашиванию. Эти исследователи пришли к заключению, что данные L-формы *P. mirabilis*, способные персистировать продолжительное время, не вызывая видимых гистологических реакций в тканях, являются еще одним доводом в пользу признания роли L-форм в персистировании инфекции.

Стабильные L-формы, происходящие от *S. faecalis*, которые постоянно пассировали и размножали *in vitro*, также были введены гнотобионтным крысам линии Fisher 344 [11]. Для того чтобы стабилизировать L-формы *in vivo*, индуцирующий агент не использовался. Оказалось, что имело место увеличение количества микроорганизмов на грамм ткани у животных, умерщвленных к 3-му дню по сравнению с умерщвленными через 2 часа или животными, умершими в течение 12 часов. Эти результаты свидетельствуют о том, что размножение организмов произошло *in vivo*. Однако культивировать микроорганизмы *in vitro* на питательной среде более 3 дней не удалось. Персистенция в тканях антигенов, происходящих из L-форм, была установлена через 12 недель после инфицирования.

Так же как и для стабильных L-форм в культуре клеток, имелся минимум данных о гистопатологических повреждениях, вызванных этими микроорганизмами. Было бы интересно изучить длительную персистенцию различных вариантов L-форм у гнотобионтных животных, чтобы определить, компрометирует ли действие CWDB инфекции животных иммунологически и/или физиологически.

В центре противоречий при изучении роли CWDB в экспериментальной патологии – воздействие антибиотиков на конверсию *in vivo* и персистенцию CWDB. Исследования на культурах клеток и в экспериментах на животных показали, что процессы трансформации бактерий в CWDB *in vivo* происходят как спонтанно, так и во время лечения антибиотиками.

Клеточная культура клеточных линий может сосуществовать длительный период с бесстеночными бактериями, такими как *Mycoplasma spp.*, и эти бактерии могут быть нечувствительны к антибиотикотерапии. Внутриклеточная локализация CWDB может объяснить скудные результаты, достигнутые при использовании антибиотиков для деконтаминации культуры клеток, хронически инфицированной *Mycoplasma spp.* и для лечения рецидивирующей бактериальной инфекции.

Пенициллин или стрептомицин самостоятельно не элиминировали бактерии или их L-формы из инфицированных клеток, причем, культуры L-форм были положительными от 7 до 14 дня терапии. Интересно, что после монотерапии тетрациклином или в комбинации с пенициллином или стрептомицином, L-формы выживали более долгий период, чем обычные бактерии. Показано, что патогенный потенциал CWDB проявляется во время антибиотикотерапии в условиях их доминирования в организме хозяина [56]. Повышенная чувствительность к действию лейкоцитов у бактерий, предварительно обработанных определенными антибиотиками, может оказаться сниженной у CWDB [82].

Так, данные по экспериментальным исследованиям пиелонефрита, свидетельствуют, что определенные антибиотики могут трансформировать бактерии в CWDB *in vivo* [1,83]. О развитии CWDB у нелеченных животных сообщалось Demonty при экспериментальном пиелонефрите, вызванном *E.coli* [84]. Необходимо изучить, влияет ли концентрация подавляющих клеточную стенку антибиотиков в тканях и жидкостях тела на образование этих форм *in vivo*.

Остается неизвестным механизм действия пенициллина на образование L-форм *in vivo*. Schmitt-Slomska et al. конвертировали стрептококки группы А в CWDB (нестабильные, реверсирующие L-формы) у экспериментально инфицированных, леченных пенициллином мышей [1,56] и обезьян [2,3]. Родительский штамм, инокулированный животным, так же как изолированные CWDB и их ревертанты *in vivo*, были устойчивы к тетрациклину (MIC, 50 mg/ml). CWDB, индуцированные *in vivo* пенициллином, оставались устойчивыми к тетрациклину и обрели устойчивость к пенициллину. L-формы этого штамма, которые были

стабилизированы (не ревертировали) *in vitro*, были восприимчивы к тетрациклину. В обширных исследованиях Каган и Schmitt-Slomska спонтанное образование *in vivo* CWDB при подострой стрептококковой инфекции обезьян, нелеченных пенициллином, предполагает, по мнению авторов, что пенициллин может иметь только селективное действие. Подавляя размножение вирулентных организмов, пенициллин может позволить клеточным или гуморальным факторам хозяина трансформировать менее вирулентные бактерии в устойчивые к пенициллину CWDB [2,3].

При изучении экспериментального эндокардита, вызванного метициллин-резистентным *Staphylococcus epidermidis*, Archer et al. [85] установили, что полусинтетический пенициллин и цефалоспорины не защищают против экспериментального эндокардита, в то время как ванкомицин, гентамицин и рифампицин оказывали защитное действие. Эти результаты может вызвать селекция *in vivo* бактериальных субпопуляций, устойчивых к бета-лактамам антибиотикам. Неуспех антибиотикотерапии также может быть вызван месторасположением CWDB и их ревертантов в хозяине. Schmitt-Slomska et al. изолировали *Brucella suis* CWDB (нестабильные CWDB, реверсирующие формы) из селезенки леченных пенициллином мышей, экспериментально инфицированных вирулентным штаммом *B. suis* [86]. Эти CWDB были изолированы одновременно на пенициллин-содержащей, осмотически стабилизированной среде и на среде без антибиотика через несколько дней после инъекции пенициллина (и при полном отсутствии обычных родительских бактерий), подтверждая, что эти CWDB были индуцированы *in vivo* во время бруцеллезной инфекции. Их присутствие в клетках селезенки и трудности в изоляции свободных от колоний L-форм тканей, как полагают авторы, свидетельствуют о том, что CWDB могут персистировать у мышей как внутриклеточные паразиты, которые плохо растут *in vitro*. Поэтому отрицательные результаты рутинного бактериологического исследования культур из клинических образцов на CWDB, не отрицают их присутствие *in vivo* или персистенцию при подозрительных бактериальных инфекциях.

Domingue et al. показали, что антибиотикотерапия животных, зараженных нестабильными *E.coli* O4 CWDB, индуцированными *in vitro* пенициллином и реверсированными в родительские формы при удалении индуктора, вела к персистенции этих абберрантных бактерий в жизнеспособном состоянии [87]. Со временем, пенициллинотерапия животных переводила нестабильные CWDB в стабильные нереверсирующие L-формы *in vivo*. Их персистенция в почечной ткани длилась до 171 дня, а присутствие антигенного материала определялось до 237 дней, что было показательным для криптического паразитизма этих микроорганизмов.

Образование мочевых камней у экспериментальных животных под воздействием L-форм *P. mirabilis* показана Braude и Sieminski [88].

Данные Li G.L. по воспроизведению экспериментальной инфекции *M. tuberculosis* H37Rv морских свинок путем интраназального и интраперитонеального заражения свидетельствуют, что L-формы могут быть легко индуцированы и, как показала ЭМ, длительное время персистируют *in vivo* [89]. Наибольшее количество колоний L-форм было получено из легких через 8 недель после инфицирования. В ходе исследований количество бациллярных форм снижалось, а L-форм – неуклонно нарастало.

Изолированные из дыхательных путей больных туберкулезом штаммы L-форм *M. tuberculosis* вызывали заболевание у морских свинок на фоне расстройств общей и специфической иммунологической реактивности [90].

Эксперименты на морских свинках свидетельствуют о патогенных возможностях культур CWDB [42]. Двум группам из 50 морских свинок на протяжении 2-летнего периода повторно вводились чистая культура CWDB (внутривенные инъекции) или ревертантные бактерии – грам-позитивные кокки (подкожно), полученные из кровяного лизата пациентов с хроническими почечными заболеваниями. В качестве контроля

служила не инокулированная третья группа животных. В обеих экспериментальных группах введение культуры CWDB и ревертантных бактерий привело к гибели животных. Как обнаружилось при вскрытии, животные были явно больны. У двух групп, которым вводились микроорганизмы, были изолированы как CWDB, так и родительские бактерии, что предполагает их взаимопревращения *in vivo*. Микроорганизмы, выделенные у животных, были идентичны первоначально введенной культуре, но имели измененные паттерны биохимической активности, что говорит о фенотипических повреждениях.

Вариабельные реакции на биохимические субстраты чаще встречались у изолятов, полученных от животных, инокулированных CWDB, чем родительскими бактериями. Контрольные животные оставались здоровыми, из их тканей никакие микроорганизмы не выделялись. Эти предварительные данные показывают, что CWDB, полученные из кровяных лизатов пациентов с хроническим почечным заболеванием, выживают и размножаются при введении экспериментальным животным. При вскрытии микроорганизмы могут быть выделены из почек животных.

Beamen et al. подтверждают, что L-формы *Nocardia* spp. вовлечены в бактериальную персистенцию, скрытое состояние и рецидив заболеваний, вызванных определенными штаммами нокардий [92]. Авторы показали, что индуцированные *in vitro* L-формы *Nocardia caviae* 112 N. *asteroides* GUN-2 патогенны для мышей.

Суммарное заключение, сделанное на основании данных большинства исследований на животных, инфицированных нестабильными и стабильными L-формами, состоит в том, что L-формы наиболее патогенны, когда реверсируют к родительским бактериям – в виде переходных форм с частично восстановленной клеточной стенкой или полностью реверсировавших микроорганизмов.

Данные о персистенции микроорганизмов в CWDB-фазе поддерживаются большинством исследователей, и подводят базу для переоценки механизмов персистенции бактерий при рецидивирующих и неясных заболеваниях, подозрительных на бактериальное происхождение.

#### **4. Клиническое значение бактериальной персистенции и проявление болезни**

Роль различных атипичных бактериальных форм, сферопластов и L-форм в инфекционной патологии считается важной проблемой в микробиологии. В литературе описаны многочисленные случаи разнотипных клинических эффектов трудно культивируемых и некультивируемых латентных CWDB, которые свидетельствуют о том, что мы имеем лишь обрывочные поверхностные представления о присутствии, разнообразии и действии микробов во всех жизненных формах и заставляющих всерьез задуматься о стратегии диагностики, лечения и профилактики заболеваний бактериальной этиологии. Тема персистенции и рецидивов проходит через литературный массив по разнообразным заболеваниям, с которыми могут быть ассоциированы L-формы [1-5, 8, 9, 11-13, 90, 92-94, 97-102, 104, 105, 107, 108, 113, 115, 116, 119, 120]. Атипичные формы – продукт частичного или полного удаления клеточной стенки при энзиматическом переваривании бактерий или частичного или полного подавления синтеза клеточной стенки [95, 96].

Имеются отличия у экспериментально полученной культуры L-форм стрептококка и L-культур, выделенных из организма. Так, последние характеризовались дермотоксичностью для кроликов и высоким ЦПД в отношении клеток куриного эмбриона, более высокой стрептокиназной активностью, большей устойчивостью к пенициллину и стрептомицину. Пенициллинотерапия сопровождалась ремиссиями, исчезновением бактериальных форм и появлением переходных и нестабильных L-форм. Когда пенициллинотерапия прерывалась, наступали рецидивы, сопровождавшиеся выделением бактериальных форм и исчезновением L-форм [2].

Сферопластоподобные L-формы (SL) *Borrelia burgdorferi* выделялись в 60-80 % случаев болезни Лайма после лечения антибиотиками из цереброспинальной жидкости, кожи, радужки, сердца и биоптатов сустава [35]. Авторы определяют их в качестве причины длительного выживания возбудителя в организме человека и отмечают исчезновение титров антител против SL-форм в период ремиссии, а также повторного нарастания титров антиSL-антител после рецидива заболевания. Как показали V. Preasc Mursic et al., культивирование *B. burgdorferi* на среде с пенициллином приводит к образованию таких же SL-форм, какие выделяются у пациентов при антибиотикотерапии. Интересно, что атипичные формы *B. burgdorferi* индуцировались в клинических образцах, контаминированных грам-положительными и грам-негативными бактериями. Очевидно, что освобождение токсинов и ферментов во время роста или после лизиса клеток быстро растущих бактерий может вызывать индукцию SL-форм в медленно растущей культуре *B. burgdorferi*.

По-видимому, в условиях организма больного даже тогда, когда антибиотикотерапия не применяется, многие факторы самого организма (лейкоцитарные ферменты, низкий pH, лизоцим, система комплемент-антитело и др.) могут способствовать образованию измененных форм бактерий, близких L-вариантам.

Многочисленные данные о выделении L-форм из организма больного человека (сферопластоподобных форм, вакуолизированных тел, светопреломляющих и зернистых телец, субмикроскопических гранул) демонстрируют возможность их получения из ликвора при перитоните, гнойных менингитах, менингоэнцефалитах, абсцессах мозга, фурункулезе, остеомиелите, «кистозном фиброзе». L-формы при этих заболеваниях на среде без антибиотика реверсировали в каждом отдельном случае в стафилококки, диплококки, гемофильную палочку, давали смешанные культуры бактериальных и L-форм. У больных ревматическим полиартритом, септицемией, септическим эндокардитом, ревмокардитом таким же образом были получены культуры ревертантов *S. faecalis*, *Corynebacterium* sp., *C. albicans*,  $\beta$ -гемолитического стрептококка. У больных крысиной лихорадкой на фоне неэффективной пенициллинотерапии были выделены L-формы *Streptobacillus moniliformis*; на секции в повреждениях митрального клапана и эмболах обнаружены типичные и протопластные формы дрожжей. L-формы выделялись также при туберкулезе, бруцеллезе, заболеваниях мочеполовой сферы (при негонококковых уретритах - L-формы, реверсировавшие в *S. faecalis*, *C. hoffmani*, *H. haemoliticus*; при гонорее - L-формы  $\alpha$ -гемолитического стрептококка и гонококка), хронической бактериурии и других воспалительных процессах [2, 8].

Имеется сообщение о случае бактериемии устойчивыми L-формами *Streptococcus sanguis* у пациента со скомпрометированной иммунной системой; источником инфекции послужило домашнее животное [97].

Сходные с L-формами варианты бактерий – сферопласты, протопласты, L-формы и др., не образующие типичные L-колонии на плотных питательных средах, наблюдались при заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы: агаммаглобулинемия, синдром Олдриха, лимфома, болезнь Ходжкина, лейкемия, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, болезнь Стилла, синдром Сьегрена, периартерииты, уремия, цирроз, хронические инфекции мочеполового тракта, заболевания сердца [1-5]. Кровяные культуры CWDB от пациентов с *Mycobacterium leprae* и саркоидозом также вызывают микробные варианты [1, 11, 94]. В биоптатах тканей, полученных от больных саркоидозом, были идентифицированы атипичные полиморфные бактерии, которые, по данным ЭМ, остаются живыми внутри фагоцитов. Антибактериальная терапия с применением азитромицина, миноциклина и сульфаметоксазол/триметоприма вызывала ремиссию.

В литературе обсуждаются три главных возможных этиологических механизма гранулематоза кишечника (болезни Крона), среди которых рассматриваются и L-формы, протопласты или сферопласты, самостоятельно или в сочетании с другими агентами [98]. В частности, у пациента с болезнью Крона была изолирована сферопластная фаза микобактерий [99]. Однако, для решения вопроса об этиологии болезни Крона

необходимы дальнейшие исследования с проведением экспериментов, доказывающих роль инфекционного агента и удовлетворяющих постулатам Коха.

Domingue G. J. et al. на протяжении ряда лет наблюдали серию пациентов с хроническими идиопатическими заболеваниями мочевыводящих путей, сопровождавшихся протеинурией, эритроцитурей, присутствием ядерных клеток, что свидетельствовало о повреждении гломерулярных капиллярных мембран. Иногда сгущенный, освобождаемый мембранами почечных канальцев, мукопротеин образовывал слепки почечных канальцев, в которых обнаруживались клеточные элементы, и среди них чаще всего было невозможно идентифицировать классические микроорганизмы. Рутинные культуральные техники и результаты микроскопии были отрицательными. Однако, фазовая масляная иммерсионная микроскопия продемонстрировала присутствие морфологически измененных бактериальных форм; окрашивание осадка мочи акридином оранжевым и исследование флуоресцентной микроскопией показало, что эти формы содержали нуклеиновую кислоту [1, 11, 15, 39, 42, 45, 69, 100, 101].

У пациентки с почечным синдромом Фанкони при исследовании мочи были обнаружены почечные цилиндры, упакованные крупными сфероидными гранулами. Более крупные сфероиды находились в моче в свободном состоянии. При инкубировании осадка мочи, содержащего слепки почечных канальцев, под стерильным герметичным покровом из больших гранул развивались стрептококки [1].

Повторно взятые кровяные культуры были положительны на CWDB, которые быстро реверсировали в стрептококки. Культура крови на CWDB включала использование цельной гепаринизированной крови или центрифугированных отмытых эритроцитов. Кровяные клетки (в основном эритроциты) лизировались и фильтровались для удаления бактериальной микрофлоры; фильтрат засевался на среду, подобную той, что используется для культивирования микоплазм.

Замечено, что сфероидные тельца в растворе могут достигать уровня метаболизма, усложнение которого определяется захваченной ими нуклеиновой кислотой и мембрано-связанными энзимами. Рост и деление таких пробионтов зависит от питательных веществ в растворе. У пациентки с синдромом Фанкони присутствовали все условия, необходимые для содействия подобному феномену, т.е. частично деградировавшие стеночно-дефицитные клетки стрептококков в клубочковом фильтрате, избыток мукопротеинового полимера, произведенного эпителиальными клетками почечных канальцев, и высокое содержание в моче аминокислот и глюкозы [1, 45].

Исследование сфероидов, образовавшихся в культуре, с помощью акридина оранжевого выявило связанную нуклеиновую кислоту коккобациллярных организмов. Сфероиды из культур пациентки были фиксированы, обработаны, секционированы и окрашены как срезы тканей. В постмортальных срезах почек и печени пациентки обнаруживались сфероиды с той же самой морфологией и свойствами окрашивания, как и полученные из культур слепков почечных канальцев и некоторых почечных эпителиальных клеток. Кроме того, подобные сфероиды были видны во многих гипертрофированных гепатоцитах.

При изучении образцов мочи детей с хроническим рецидивирующим нефротическим синдромом при раннем рецидиве с помощью масляной иммерсионной фазовой микроскопии можно было постоянно наблюдать экстраординарное количество (1-2-мм в диаметре) коккоподобных CWDB, погруженных в муциновую матрицу; аналогичные образования обнаруживались в слепках и клетках почечных канальцев [11, 102]. Окрашивание акридином оранжевым осадка мочи подтверждало содержание в них нуклеиновой кислоты. На плазматической мембране микроорганизмов иногда имелись мельчайшие элементарные тельца. После длительного рецидива у пациентов наблюдались липидемия и липидурия. CWDB, подобно микоплазме, жадно адсорбируют липиды, и поэтому многие микроорганизмы затенялись этим рефракционным жировым покровом.

CWDB среди клеток почечного эпителия также адсорбировали липиды, образуя так называемые «овальные жировые тельца», патогномоничные для данного расстройства. Когда такие клетки инкубировались под стерильным покровом, можно было наблюдать освобождение липидов и осаждение вокруг клеток в виде рефракционных глобул [11, 103]. ЭМ осадка мочи показывала умеренный аутолиз более крупных, зрелых форм, но элементарные тельца лежали внутри маленькой цисты, прикрепленной к плазматической мембране, совершенно интактной и способной к видимому росту в культуре. ЭМ клеток проксимальных почечных канальцев у нефротических пациентов показала недеформированные организмы, которые в точности соответствовали мочевым формам. Как полагают авторы, резиденция CWDB у этих пациентов может вести к иммунной дисфункции.

Из кровяных культур, полученных от описанных выше пациентов, выделялись только CWDB на среде для L-форм, которые реверсировали к грам-положительным коккам. Другие методы бактериологического исследования давали отрицательный результат.

При исследовании мочи пациента с идиопатической гематурией при помощи фазовой микроскопии, ЭМ, посевов на среду для L-форм во всех случаях были обнаружены CWDB. Ревертанты культур CWDB были идентифицированы как *Streptococcus agalactiae* и *S. faecalis*; те же организмы росли небольшим числом колоний в обычной культуре после продолжительной инкубации в течение 96 часов. Ревертанты были чувствительны только к нитрофурантоину. 6-недельное лечение этим препаратом привело к нормализации лабораторных показателей и исчезновению L-форм на фоне улучшения состояния пациента [104].

Domingue G. J. пришел к выводу, что выделение протопластов и L-форм в периоде ремиссии при пенициллинотерапии и бактериальных форм при рецидивах неопровержимо свидетельствует о роли L-форм и их ревертантов при хроническом пиелонефрите [1].

Стрептококковые инфекции часто предшествуют многим хроническим рецидивирующим заболеваниям, таким как гломерулонефрит и ревматическая лихорадка, при которых не удается выделить и культивировать стрептококк [105]. Существует мнение, что стрептококк повреждает некоторые ткани таким образом, что они перестают распознавать себя, и включаются аутоиммунные механизмы, которые предполагают предшествующее наличие некоторой формы иммунной некомпетентности, ведущей к аутоиммунным процессам [2, 106].

Поскольку иммунную некомпетентность уравнивают с неспособностью к полному уничтожению чужеродных антигенов, включая бактерий, в организме хозяина обитает ассортимент бактерий, которые утратили либо всю, либо часть своих клеточных стенок. Эти формы менее антигенны и имеют тонкие различия в морфологии и функции и, соответственно, разнообразное действие на реактивные иммунные механизмы и их соответствующее клиническое проявление [1, 13, 106].

ЭМ исследования тканей пациентов со стрептококк-связанными коллагеновыми заболеваниями часто идентифицируют CWDB [107]. Скорость, с которой CWDB реверсируют в свои родительские формы, часто коррелирует с активностью заболевания. Но, поскольку средства культивирования CWDB в настоящее время многим врачам не доступны, допущение, что CWD стрептококки являются первичным стимулом, активирующим заболевание, нуждается в подтверждении.

На протяжении многих лет пациентам, страдающим ревматизмом, для предупреждения рецидивов проводилась пенициллинопрофилактика. Ее эффективность, вероятно, происходит из способности снижать синтез высоко антигенной клеточной стенки у эндогенных микроорганизмов. Однако встает вопрос, насколько эффективно использование антимикробных агентов против форм стрептококка с дефектной клеточной стенкой.

Имеются данные, что возвратный афтозный стоматит (ВАС) вызван локально реверсировавшей в родительскую форму CWDB формой *Streptococcus sanguis* [8, 11]. Клиническое проявление этого болезненного заболевания варьирует от редкой мягкой вспышки с минимальным количеством маленьких язвочек до тяжелых продолжительных эпизодов, которые могут вовлекать не только слизистую щек, но и мочевого тракт, глаза (ирит) и суставы. Антитела, полученные от этих пациентов, в отличие от таковых у здоровых людей, имели аффинитет к фетальной слизистой оболочке полости рта. Было установлено также, что в бактериальной клеточной стенке содержится специфический антиген, и что эта иммунологическая реакция была специфичной у индивидуумов с генетической предрасположенностью к ВАС.

У пациентов с ВАС, в отличие от контрольной группы, циркулировали комплемент-связывающие антитела против орального мукозального экстракта, которые локализовались в интрацеллюлярных цитоплазматических зонах игольчатого слоя эпителиальных клеток полости рта. Циркулирующие иммуноглобулины G - антитела против *S. sanguis* 2A - у пациентов с ВАС постоянно росли. У них наблюдалось существенное уменьшение пролиферации лимфоцитов к *S. sanguis* 2A независимо от активности заболевания.

В 1907 году Виппл описал первый случай редкого, хронического, рецидивирующего системного заболевания, которое обычно протекало с предисторией неспецифической слабости, артралгии, интермиттирующей лихорадки, позже – упорной диареей и кахексией. Многие пациенты умирали от этого заболевания прежде, чем им была назначена антимикробная терапия. Посмертное исследование показывало, что многие органы и системы были однотипно и существенно поражены гранулематозным повреждением, и, в частности, в верхней стенке кишечника, как свободно в тканях, так и внутриклеточно, обнаруживались мельчайшие окрашенные серебром бациллярные формы [108].

Beamen et al. описан случай летального исхода в результате абсцесса мозга и распространенной инфекции центральной нервной системы, вызванной L-формами *N. asteroides* GUN-2, которые были изолированы из цереброспинальной жидкости человека еще до возникновения диссеминации заболевания [92]. Приблизительно  $10^4$  колоний L-форм на 1 мл цереброспинальной жидкости были получены на среде для L-форм из четырех отдельных образцов собранных отдельно в течение нескольких недель. Идентичность организмов была установлена реверсией L-форм в типичные клетки *N. asteroides*. Было показано, что эти ревертанты антигенно связаны со штаммом *N. asteroides*, изолированным прежде из мокроты пациента. При этом из цереброспинальной жидкости пациента не удалось выделить стеночные формы *N. asteroides*.

L-формы *M. tuberculosis* были выделены из мокроты больных туберкулезом легких; зернистые формы – из ликвора больных туберкулезным менингитом [1]. Снитинская О.С. и др. в 42 % вновь выявленных случаев заболевания различными клиническими формами туберкулеза респираторных органов выделяли L-формы микобактерий [90]. Микобактерии отличаются высоким содержанием (до 60 %) липидов в клеточной стенке, которое действует как защитное средство от внедрения повреждающих субстанций. Такая стенка дает микобактериям преимущества в выживании, но следствием этой защиты является медленный рост, вторичный по отношению к ограничению в поглощении питательных веществ. В противоположность большинству бактерий, имеющих время генерации приблизительно 20 минут, микобактериям нужно 12 часов в лучшем случае, чтобы удвоить свое количество. Исследования на экспериментальных животных прояснили некоторую динамику взаимодействия хозяин-патоген. Начальная инфекция вызвана поглощением микроорганизмов макрофагами на поверхности слизистых; различные метаболиты, продуцируемые возбудителем, так модифицируют фагосомальные мембраны и интрафагосомальную среду, что она становится средой для репликации [109]. Клиническая реакция на эту инвазию может быть незамеченной или может вызвать тяжелую

иммунную реактивность, ведущую к выработке широкого спектра аутоантител [107]. В идеале реактивная фаза относительно доброкачественная, и защитные механизмы очевидны.

Пролиферация и скопление макрофагов и других клеток, опосредующих воспаление, изолируют микроб от кровообращения; со временем происходит казеоз ядра и фиброз туберкулы. Однако потенциально инфективный микроб может персистировать в туберкуле десятилетиями и активизироваться, когда иммунная компетентность будет скомпрометирована такими факторами как плохое питание, пожилой возраст, вирусные инфекции, например, корь или СПИД [1].

При усилении иммунитета, увеличивается выработка лизоцима, и бактериальная клетка может деградировать [110]. Изучение связи между уровнем экспрессии лизоцима и туберкулезными повреждениями (казеозным некрозом и фиброзными узлами) показало, что экспрессию лизоцима можно рассматривать в качестве прогностического маркера лечения туберкулеза, т.к. активность лизоцима достоверно выше в случаях выявления антигена L-форм *M. tuberculosis*, чем в его отсутствие [111].

В гетерорезистентных клинических изолятах *M. tuberculosis* от пациентов с впервые диагностированным туберкулезом были обнаружены чувствительные и устойчивые к стрептомицину и изониазиду микроорганизмы. ЭМ исследование после 25-дневного культивирования изолятов на бульоне Dubos, в отличие от полностью резистентного штамма и референс-штамма H37Rv, продемонстрировало значительный плеоморфизм и сосуществование классических микобактерий с атипичными гранулярными L-формами, которые преобладали в культуре устойчивых к антибиотикам мутантов и образовывали колонии L-типа на агаре Dubos [112]. Авторы делают заключение, что процесс L-трансформации, который наблюдался как в клинических гетерорезистентных изолятах, содержащих микобактерии с различными генотипами, так и в изолированных мутантных клонах, показывает связь между резистентностью бактерий и клеточно-дефицитной L-фазой в их состоянии: это один из возможных механизмов посредством которого резистентные мутанты способны выживать *in vivo*.

Чтобы подтвердить туберкулезное происхождение L-форм, изолированных из клинических нереспираторных образцов от пациентов с экстрапульмональным туберкулезом Вишневецкой Е.Б. и соавт. была использована полимеразная цепная реакция (ПЦР), которая генетически подтвердила, что изолированные L-формы происходят от *M. tuberculosis* [113].

Wang H, Chen Z. показали, что у больных туберкулезом антибиотикотерапия рифампином, изониазидом, этамбутолом индуцирует формирование L-форм *M. tuberculosis*, что является одним из важнейших факторов снижения эффективности лечения туберкулеза. Применение ПЦР, считают авторы, поможет выявить наличие стеночно-дефицитных форм *M. tuberculosis*. Данное исследование они рекомендуют проводить в процессе антибиотикотерапии с тем, чтобы своевременно провести коррекцию лечения и назначить лекарства, к которым проявляют чувствительность L-формы [114].

Judge and Mattman полагают, что CWDB преимущественно персистировать в тканях и крови пациентов с установленной аллергией на клеточную стенку возбудителя [11, 94]. Mattman преуспела в культивировании таких форм из крови в срок не менее чем неделя, тогда как классические культуры не росли или росли очень медленно [13]. Она сообщила, что стеночно-дефицитные микобактерии обычно не реверсируют *in vitro*, что они кислотоустойчивы (с интенсифицированным красителем Kinyoun) и что их биограммы и иммунологические профили состоят из присущих родительским бактериям элементов [1].

Определенные корреляции просматриваются при сравнении клинической картины гнойно-воспалительных заболеваний и выделением L-форм. Результаты анализа клинической картины больных, в ликворе которых при повторных посевах обнаруживались зернистые формы, свидетельствовали о затяжном и

влялом течении. Повторные прорывы абсцесса мозга в субарахноидальное пространство (разлитой гнойный менингит) сопровождалось выделением смешанной культуры, состоящей из бактериальных и CWDB. Стабильные L-формы обычно неоднократно выделялись из ликвора, а также из посевов гноя абсцессов при летальных исходах.

Типичное бурное клиническое течение с острым началом, высоким лейкоцитозом, нейтрофильным плеоцитозом и высоким содержанием белка в ликворе сопровождалось выделением L-форм в раннем периоде заболевания, до начала лечения антибиотиками. Лечение большими дозами антибиотиков оказывалось эффективным.

Тяжелое длительное течение сопровождалось выделением L-форм в поздние сроки (на 8-45-й день болезни) после длительного лечения антибиотиками. L-формы иногда сменяли выделявшиеся ранее бактериальные формы возбудителя. Выздоровление медленное, пенициллинотерапия была в основном эффективной или требовала комбинации с другими антибиотиками [2].

Выделение антибиотикоустойчивых L-форм *Corynebacterium* sp. было связано с латентной стадией рецидивирующего эндокардита [8].

Хронизация бруцеллезной инфекции, как полагают, также происходит благодаря L-формам бруцелл [9].

Голанов В.С. и др. в своих исследованиях установили, что свежие случаи туберкулеза, при которых были выделены L-формы микобактерий, характеризовались бедной клинической симптоматикой и благоприятным исходом заболевания. Ассоциации L-форм с морфологически типичными формами микобактерий вызывали явную симптоматику и прогрессивные тенденции. Авторы считают, что обнаружение L-форм при неактивном легочном процессе указывает на скрытую активность туберкулеза, способного давать рецидивы [115].

Дорожкова И.Р., Земскова З.С. и Круду В.Н. на большом статистическом массиве диспансерных больных с остаточными явлениями легочных туберкулезных изменений, отнесенных к группам VIIA и VIIB, также подтвердили, что изоляция нестабильных L-форм *M. tuberculosis* является важным прогностическим признаком высокой потенциальной вероятности возобновления туберкулезного процесса [116]. Обнаружение биологически поврежденных форм этиологического агента требует интенсивного контрольного медицинского обследования и различных превентивных мер [117]. Этиологическая роль L-форм подтверждается абсолютной идентичностью биологических свойств ревертантов L-форм, полученных при пересевах *in vitro*, и бацилл туберкулеза, изолированных во время рецидива инфекционного процесса у пациентов с обширными остаточными повреждениями легких [118].

Кочорова М.Н. и др. исследовали с помощью ПЦР и традиционного бактериологического исследования пациентов с генитальным туберкулезом [119]. Среди обследованных преобладали женщины 21-40 лет (83,4 %), у которых в анамнезе спонтанные аборты встречались чаще, чем у пациентов из других групп; у трети из них были обнаружены L-варианты МБТ. Это дало авторам право сделать вывод, что обнаружение L-форм МБТ в соскобах эндометрия показательно для активного медленно текущего гематогенного туберкулезного процесса, который подтверждается комплексным клиническим и лабораторным обследованием.

Горина Л.Г. и др. у 20 % пациентов с хроническими бронхитами установили присутствие в периферической крови антигенов *Mycobacterium pneumoniae*, у 24 % - *Streptococcus haemolyticus* группы А, а в 12 % случаев были выявлены антигены L-форм стрептококка, а также ассоциации этих микроорганизмов. Авторы связывают их присутствие с обструктивным компонентом хронического бронхита [120].

### Заключение

Таким образом, очевидно, что персистенция CWDB ведет к рецидивированию, хронизации или латенции (бактерионосительству) инфекционного процесса, снижает эффективность лечения. При переходе популяции возбудителя в L-формы в процессе антибиотикотерапии образуются очаги инфекции, не поддающиеся бактериологическому контролю, возникают сложности осуществления микробиологической диагностики.

Совершенствование методов обнаружения CWDB в клиническом материале позволит повысить эффективность терапии при самых различных заболеваниях, связанных с CWDB. В частности, увеличение выделения aberrantных микроорганизмов из культур крови человека и животных могут средства разрушения клеток хозяина, применяемые вслед за инокуляцией в специальную осмотически стабилизированную среду.

Следующей задачей совершенствования диагностики CWDB инфекции является получение специфических антисывороток к L-формам бактерий для использования в различных серологических реакциях.

Было бы интересно исследовать целесообразность и возможности использования антигенных и иммуногенных отличий между CWDB и типичными бактериями для конструирования комплексных или моновакцин, которые могли бы стать ценным дополнением к имеющимся вакцинным препаратам для предупреждения хронизации инфекции и формирования бактерионосительства.

В широком исследовании нуждаются механизмы, посредством которых CWDB избегают бактерицидного действия клеток хозяина *in vivo*, выявление молекулярных структур на поверхности CWDB, способствующих устойчивости и выживанию их в условиях фагоцитоза. Встает также вопрос, насколько эффективно использование антимикробных лекарственных средств против бактериальных форм с дефектной клеточной стенкой. Необходимо изучить влияние концентрации антибиотиков, подавляющих образование клеточной стенки у бактерий, на образование L-форм *in vivo*, в тканях и жидкостях макроорганизма.

Патология, наблюдаемая в культуре клеток, инокулированной относительно стабильными L-формами, как показано многими исследователями, инициируется преимущественно тогда, когда L-формы реверсируют в содержащие клеточную стенку бактерии. Остается неясной судьба стабильных L-форм, которые (при утрате способности к реверсии) могут сосуществовать с человеческими клетками в макроорганизме, не вызывая классической патологии. Предстоит ответить на вопросы о том, насколько долго выживают CWDB в клетках хозяина; какими могут быть для него возможные последствия; в какой степени данные, касающиеся L-форм в культуре клеток, правомерно экстраполировать на ситуации *in vivo* и на различные виды бактерий. Если появление жизнеспособных персистентных телец есть универсальным признаком бактериальных L-форм, то необходимо изучить химическую и иммунологическую природу этих телец.

Полученные в эксперименте данные о развитии анафилактической, анафилактоидной и токсических реакций, связанных со сфероидами (CWDB), полученными из кровяных лизатов и мочи пациентов с хроническими почечными заболеваниями, а также принципиальная возможность того, что многие из так называемых аутоиммунных болезней представляют собой иммунологические процессы, инициированные персистенцией CWDB, перекрестно реагирующими с тканями хозяина, заставляют глубже задуматься о роли L-форм в иммунопатологии. Изучение длительной персистенции различных вариантов L-форм у гнотобионтных животных, позволило бы выяснить, компрометирует ли действие CWDB инфекции животных иммунологически и/или физиологически.

Факт обнаружения измененных форм бактерий, близких L-вариантам, при заболеваниях, инфекционная природа которых не доказана, требует проведения разносторонних исследований роли указанных вариантов возбудителей в этиологии таких заболеваний.

## Список литературы

1. Domingue G. J., Woody H. B. Bacterial Persistence and Expression of Disease // *Clinical Microbiol. Rev.* - 1997. - Vol.10, №2. - P.320–344.
2. Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий // М.: Медицина, 1981. - 239 с.
3. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmataceae* в патологии // М.: Медицина, 1973. - 392 с.
4. Калина Г.П. Фильтрующиеся формы бактерий (Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней) // М.: Медгиз, 1962. - С.432-473.
5. Калина Г.П. L-трансформация бактерий (Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней) // М.: Медгиз, 1962.- С.574-595.
6. Klieneberger E. The natural occurrence of pleuropneumonia-like organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria // *J. Pathol. Bacteriol.*-1935.-Vol. 40. - P.93–105.
7. Dienes L. “L” organisms of Klieneberger and *Streptobacillus moniliformis* // *J. Infect. Dis.*-1939.-Vol. 65.-P.24–42.
8. Guze L. B.(ed.). *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms.*-The Williams & Wilkins Co., Baltimore.-1968.
9. Nelson E.L., Pickett, M.J. The recovery of L-forms of *Brucella* and their relation to *Brucella* phage // *J. Infect. Dis.*- 1951.-Vol. 89.-P.226.
10. Dorward D.W. , Garon, C.F. DNA is packaged within membrane-derived vesicles of gram-negative but not gram-positive bacteria // *Appl. Environ. Microbiol.*-1990.-Vol. 56. - P.1960-1962.
11. Domingue G. J.(ed.). *Cell wall-deficient bacteria: basic principles and clinical significance.* Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass.-1982.
12. Madoff S. *The bacterial L-forms.* Marcel Dekker, Inc., New York.-1986.
13. Mattman, L. H. *Cell wall-deficient forms. Stealth pathogens,* 2nd ed.CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.-1993.
14. Gutman L.T., Turck M., Petersdorf R.G., Wedgwood R.J. Significance of bacterial variants in urine of patients with chronic bacteriuria // *Clin. Invest.*-1965.-Vol. 44.-P.1945–1952.
15. Domingue G.J. Filterable cell-associated cryptic bacterial forms in immunologic renal diseases // *Urol. Surv.*-1980.- Vol. 30.-P.1-4.
16. Dienes L., and H. J. Weinberger. The L-forms of bacteria // *Bacteriol. Rev.*-1951.-Vol.15.-P.245–288.
17. Dienes L. Morphology and reproductive process of L-forms of bacteria. I. streptococci and staphylococci // *J. Bacteriol.*-1967.-Vol. 93.-P.693–702.
18. Dienes L. Nomenclature of bacterial L-form and cell wall-defective Bacteria // *J. Infect. Dis.*-1973.-Vol.127.-P.476–477.
19. Asnani P. J., and K. Gill. Biological properties of L-forms and their parent bacteria // *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*-1980.-Vol. 27.-P.131–134.
20. Cabezas de Herrera, E., O. Garcia Jurado. Stable L-forms of *Erwinia cartovora* induced by ultraviolet irradiation in spheroplasts, protoplasts and L-forms of bacteria // *INSERM* -1977.-Vol. 64.-P.107–118.
21. Feinman S. B., B. Prescott, and R. M. Cole. Serological reactions of glycolipids from streptococcal L-forms // *Infect. Immun.*-1973.- Vol. 8.-P.752–756.
22. Gilpin R. W., F. E. Young, and A. N. Chatterjee. Characterization of a stable L-form of *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.*-1973.-Vol. 113.-P.486–499.
23. Green M.T., Heidger P.M., Domingue G. A proposed life cycle for a relatively stable L-phase variant of *Streptococcus faecalis* // *Infect. Immun.* 1974.-Vol.10.-P.915–927.

24. Hijmans W. Absence of the group-specific and cell wall polysaccharide antigen in L-phase variants of group D streptococcus // *J. Gen. Microbiol.*-1962.-Vol. 28.-P.177-179.
25. S. Madoff (ed.), *Mycoplasma and the L-forms of bacteria*. Gordon and Breach, New York, 1971.
26. L. Hayflick (ed.). *The mycoplasmatales and the L-phase of bacteria*. Appleton-Century-Crofts, New York, 1969.
27. King J. R., Gooder H. Reversion to the streptococcal state of enterococcal protoplasts, spheroplasts, and L-forms // *J. Bacteriol.*-1970.-Vol.103.-P.692-696.
28. Leon, O., Panos C. Adaptation of an osmotically fragile L-form of *Streptococcus pyogenes* to physiological osmotic conditions and its ability to destroy human heart cells in tissue culture // *Infect. Immun.*-1976.-Vol. 13.-P.252-262.
29. Schmitt-Slomska J., Roux J. Cell wall defective organisms as a model for the study of antibiotic activity in spheroplasts, protoplasts and L-forms of bacteria // *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*.-1977.-Vol. 64.-P.185-196.
30. Wyrick P., McConnell M., Rogers H. Genetic transfer of the stable L-form state to intact bacterial cells // *Nature*.-1973.-Vol. 24.-P.505-507.
31. Gumpert J, Zimmermann I, Taubeneck U. Phage adsorption and productive lysis in stable protoplast type L-forms of *Bacillus subtilis* and *Streptomyces hygroscopicus* // *Basic Microbiol.*-1986.-Vol. 26(1).-P.15-25.
32. Buchanan AM, Scott JL. *Actinomyces hordeovulneris*, a canine pathogen that produces L-phase variants spontaneously with coincident calcium deposition. // *Am J Vet Res.*-1984.-Vol. 45(12).-P.2552-2560.
33. Udou T, Ogawa M, Mizuguchi Y. Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form.// *J Bacteriol.*-1982.- Vol. 151(2).-P.1035-1039.
34. Rastogi N, David HL Ultrastructural and chemical studies on wall-deficient forms, spheroplasts and membrane vesicles from *Mycobacterium aurum*. // *J Gen Microbiol.*-1981.- Vol. 124(1).-P.71-79.
35. Prease Mursic V., Wanner G., Reinhardt S., Busch U., Maget W. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants // *Infection*.- 1996.- Vol. 24.-P. 218-226.
36. Beaman B.L. An ultrastructural analysis of *Nocardia* during experimental infections in mice // *Infect. Immun.*-1973.-Vol. 8.-P.828-840.
37. Высоцкий В.В., Рузаль Г.И., Галеева О.П., Смирнова-Мутушева М.А. Ультраструктура клеток менингококка, инкубированных в перевиваемой культуре клеток человеческого амниона линии FL // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*- 1986.-№ 1.-С.40-44.
38. McGee Z. A., Whittler R. G., Gooder H., Charache P. Wall-defective microbial variants: terminology and experimental design // *J. Infect. Dis.*-1971.-Vol. 123.-P.433-438.
39. Domingue G.J. Bacterial osmoprotection // *J. Lab. Clin. Med.* 1991.- Vol. 48.-P.53.
40. Dienes, L., Bullivant, S.: Morphology and reproductive processes of the L-forms of bacteria.II: comparative study of L-forms and mycoplasma with the electron microscope // *J. Bacteriol.*- 1968.-Vol. 95.-P.672-682.
41. Lederberg J. Bacterial protoplasts induced by penicillin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1957.- Vol. 42.-P.574.
42. Domingue G.J. (ed.). *Cell wall-deficient bacteria: basic principles and clinical significance*.- Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass., 1982.
43. Пузанов В.А., Николаева Г.М. Тинкториальные свойства микобактерий при использовании стандартных и нетрадиционных методов окрашивания // *Пробл. туберк.*-1994.-№ 1.-С.31-35.
44. Высоцкий В.В., Горшкова В.И. Фрагментация протопластов как один из возможных механизмов Л-трансформации бактерий (*Clostridium perfringens*) // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*- 1978. - № 2.-С.86-90.

45. Domingue G.J. Electron dense cytoplasmic particles and chronic infection: a bacterial pleomorphy hypothesis // *Endocytobiosis Cell Res* 1995.-Vol. 11.-P.19–40.
46. Bisset K.A, Tallack J, Bartlett R. Electron microscopy of the L-cycle in *Bacillus licheniformis* var. *Endoparasiticus* (Benedek) // *J Med Microbiol.*-1979.-Vol. 2(4).-P.469-472.
47. Margulis L. J., B. Ashen, M. Sole, and R. Guerrero. Composite, large spirochetes from microbial mats: spirochete structure review // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* .-1993.-Vol. 90.-P.6966–6970.
48. Guerrero R., Ashen J., Sole M., Margulis L. Spirosymplokos delcaieberi nov. gen., nov. sp.: variable-diameter composite spirochete from microbial mats // *Arch. Microbiol.*-1993.-Vol. 160.-P.461–470.
49. Cohen S.N., and J.A. Shapiro. Transposable genetic elements // *Sci. Am.* 1980.-Vol. 242.-P.40–49.
50. De Duve C. Blueprint for a cell: the nature and origin of life.-Neil Patterson Publishers, Burlington, N.C., 1991.
51. Lucy J.A. The fusion of biological membranes // *Nature.*-1970.-Vol. 227.-P.814–817.
52. Novikoff F.B., Holtzman E. Cells and organelles. The biogenesis of organelles.-Holt, Rinehart and Winston, Inc., New York, 1970.
53. Landman O.E., Ryter A., Frehel C. Gelatin-induced reversion of protoplasts of *Bacillus subtilis* to the bacillary form: electronmicroscopic and physical study // *J. Bacteriol.* -1968.-Vol. 96.-P.2154–2170.
54. Wyrick, P.B., Goeder H. Reversion of *Streptococcus faecium* cell-wall defective variants to the intact bacterial state // *INSERM.*- 1977.-Vol. 64.-P.59.
55. DeCastro-Costa MR, Landman OE. Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L forms of *Bacillus subtilis* to the walled state // *J Bacteriol.* -1977.-Vol.129(2).-P.678-689.
56. Schmitt-Slomska J., Drach G., Caravano R. Incidence of cellular and humoral factors on group A streptococcal L-forms. I. Microscopic study of the association of L-forms with human polymorphonuclear leukocytes and mouse peritoneal macrophages // *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur).*-1973.-Vol. 124B.-P.329–350.
57. Schmitt-Slomska J, Michailova L, Ivanova E, Toshkov A. Adhesion and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* L-forms // *J Basic Microbiol.*-1986.-Vol.26(7).-P.429-440.
58. Domingue, G.J., Lloyd K., Schlegel J.U. In vitro phagocytosis of transitional phase bacterial variants utilizing autoradiography // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*-1974.-Vol.146.-P.615–642.
59. Ivanova E, Gumpert J, Popov A. Lipopolysaccharide-containing cytoplasmic membranes as immunostimulants of peritoneal macrophages // *Acta Microbiol Bulg.* 1989.-Vol.24.-P.21-28.
60. Зыкин Л.Ф., Дунаев Г.С., Саямов С.Р., Соклов П.С. Л-формы *Yersinia pestis* у грызунов и эктопаразитов // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*- 1989.- № 2.-36-40.
61. Guze L.B., Harwick H.J., Kalmanson G.M. Klebsiella L-forms: effect of growth as L-form on virulence of reverted *Klebsiella pneumoniae* // *J Infect Dis.* -1976.-Vol. 133(3).-P.245-252.
62. Герасимов В.Н., Бикетов С.Ф., Голов Е.А., Потапов В.Д., Бахтеева И.В., Николаева О.Г. Специфические черты ультраструктуры *Mycobacteria*, культивируемых в мышинных макрофагах // *Пробл. туберк. болезн. легк.*-2003.-№ 7.-С.52-58.
63. Гончарова С.А., Вульфович Ю.В., Чурилова Н.С., Кац Л.Н. Сравнительная биологическая характеристика Л-форм *Streptococcus group A и B* // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*- 1986.- № 10.-С.22-25.
64. Hirachi Y, Kotani S. Studies of antigens related to metabolic and growth inhibitions of *Staphylococcus aureus* L-form // *Osaka Daigaku Shigaku Zasshi.*- 1990.-Vol. 35(1).-P.333-341.
65. Yamamoto A, Homma JY. L-forms of *Pseudomonas aeruginosa*. 3. The serological cross-reactions among stable L-forms of *Pseudomonas aeruginosa*, L-form of *Streptococcus pyogenes* and mycoplasmas // *Jpn J Exp Med.*-1978.-Vol. 48(6).-P.545-551.

66. Gmeiner J, Martin HH Phospholipid and lipopolysaccharide in *Proteus mirabilis* and its stable protoplast L-form. Difference in content and fatty acid composition // *Eur J Biochem.*-1976.-Vol.67(2).-P.487-494.
67. Kroll H.P., Gmeiner J., Martin H.H. Membranes of the protoplast L-form of *Proteus mirabilis* // *Arch Microbiol.* - 1980.-Vol.127(3):223-9.
68. Коваленко И.В., Дорожкова И.Р. Достоверность и развитие метода иммунофлюоресценции для изоляции и идентификации Л-форм микобактерий // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*-1986.-№ 6.-С.35-38.
69. Schmitt-Slomska J, Caravano R, Thomas P, Roux J. Attempts of ultrastructural and biochemical characterisation of cell wall deficient "Brucella" (L forms) (author's transl) // *Ann Microbiol (Paris).* -1982.-Vol.133(3).-P.377-386.
70. Agarwal SC, Sundararaj T. Cell-mediated immunity after oral immunization with ribonucleic acid-protein fractions of *Vibrio cholerae* L-form lysates // *Infect Immun.*-1977.-Vol.16(2).-P.527-530.
71. Crawford Y.E. Studies of a complementfixing antigen from group A streptococcal L-forms // *J. Immunol.*-1962.-Vol. 89.-P.698.
72. Nishikawa F, Kita E, Yamada H, Nakano A, Kashiba S. Protective capacity of L-form *Salmonella typhimurium* against murine typhoid in C3H/HeJ mice // *Microbiol Immunol.* -1994.-Vol. 38(2).-P.129-137.
73. Shimokawa O, Nakayama H. Inactivation of penicillin-induced staphylococcal L-forms by human serum high density lipoprotein // *FEMS Microbiol Lett.*- 1997.-Vol.156(1).-P.113-117.
74. Kawashima T, Kuwano K, Mathu-Ura I, Fukuse S, Arai S. Cross reactive antigens of *Acholeplasma laidlawii* and L-form of *Staphylococcus aureus* // *Nippon Saikingaku Zasshi.* -1991.-Vol. 46(5).-P.855-860.
75. Ivanova E, Kenarova B, Gumpert J Adjuvant activity of the *Escherichia coli* WF stable L-form cytoplasmic membranes // *Acta Microbiol Bulg.*- 1993.-Vol.29.-P.54-60.
76. Karch H, Nixdorff K. Comparison of quantitative and qualitative antibody-producing cell responses to lipopolysaccharide in cell walls of the bacterial form and in membranes of the protoplast L-form of *Proteus mirabilis* // *Infect Immun.*-1980.-Vol. 30(2).-P.349-352.
77. Белецкая Л.В., Вульфович Ю.В., Гнездицкая Е.В., Гончарова С.А. Перекрестно-реагирующие антитела миоидных клеток тимуса человека и стабильные Л-формы стрептококка группы А // *Бюлл. эксп. биол. мед.*-1981.-№ 91(6).-С.704-706.
78. Грекова Н.А., Толмачева Т.А., Вершилова П.А. О патогенности нестабильных Л-форм *Brucella* и их ревертантов // *Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.*-1979.-№ 23(2).-С.129-134.
79. Green M. T., P. M. Heidger, Jr., Domingue G. Demonstration of the phenomena of microbial persistence and reversion with bacterial L-forms in human embryonic kidney cells // *Infect. Immun.*-1974.-Vol.10.-P.889-914.
80. Kagan G.Y., Vulfovitch B., Gusman M.D., Raskov T. Persistence and pathological effect of streptococcal L-forms in vivo // *INSERM.*-1977.-Vol.64.-P.247.
81. Ponig B., Domigue G.J., Schlegel J.U. The role of in vitro induced microbial L-forms in experimental hematogenous pyelonephritis // *Invest. Urol.*-1972.-Vol. 9.-P.282-285.
82. McDonald P.J., Wetherall B.L., Pruul H. Post antibiotic leukocyte enhancement: increased susceptibility of bacteria pretreated with antibiotics to activity of leukocytes // *Rev. Infect. Dis.*-1981.-Vol. 3.-P.38-44.
83. Toshkov A., Kuyumdjiev A., Saharieva S., Georgiev D., Gumpert J., Harizanova T., Tsenova Z. Experimental pyelonephritis with L-forms of *Proteus mirabilis* in rats // *Acta Microbiol. Virol. Immunol. Bulg.* -1977.-Acad. Sci.-Vol.6.-P.35-47.
84. Demonty J. Experimental *Escherichia coli* pyelonephritis: formation of spheroplasts in the kidney of the untreated rat // *Antonie van Leeuwen-hoek.* 1970.-Vol. 30.-P.273-284.

85. Archer G. L., Vazques G. J., Johnston J. L. Antibiotic prophylaxis of experimental endocarditis due to methicillin-resistant *Staphylococcus epidermis* // *J. Infect. Dis.*-1980.-Vol.142.-P.725–731.
86. Schmitt-Slomska J., Caravano R., Anoa M., Gay B., Roux J. In vivo conversion of *Brucella suis* to L-forms after penicillin treatment // *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*.-1981.-Vol.132A.-P.253–265.
87. Domingue G.J., Turner B., Schlegel J.U. Cell wall-deficient bacterial variants in kidney tissue. Detection by immunofluorescence // *Urology*.-1974.-Vol. 3.-P.288–292.
88. Braude A. L., Siemienski J. Production of bladder stones by L-forms // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*- 1970.-Vol. 174.-P.896–902.
89. Li G.L. Induction of the L forms of *M. tuberculosis* in vivo guinea pigs // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*.-1990.-Vol.13(6).-P.351-354, 381.
90. Снитинская О.С., Сибирная Р.И., Белякова О.И. Значение Л-форм микобактерий в развитии туберкулеза легких // *Врач. дело*.-1990.-№ 3.-С.38-40.
91. Schmitt-Slomska J., A. Boue, and R. Caravano.. Induction of L-variants in human diploid cells infected by group A streptococci // *Infect. Immun.*- 1972.-Vol. 5.-P.389–399.
92. Beaman B. L. The possible role of L-phase variants of *Nocardia* in chronic infections // *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg.*-1981.- Abt. 1 Suppl. 11.-P.221–227.
93. Abbate G.F, Gattoni A, Leonessa V., Altucci P. Search for bacterial l forms in some diseases of human pathology // *Boll Ist Sieroter Milan*.-1975.-Vol. 54(4).-P.296-299.
94. Mattman L. H. Cell wall-deficient forms. Stealth pathogens, 2nd ed.- CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla., 1993.
95. Brenner S. et al.: Bacterial protoplasts // *Nature*.-1958.-Vol.181.-P.1713-1716.
96. Park J.T. Some observations on murein synthesis and the action of penicillin // *G. Symp. Soc. Gen. Microbiol.*- 1966.-Vol. 16.-P.70.
97. Chmel H Graft infection and bacteremia with a tolerant L-form of *Streptococcus sanguis* in a patient receiving hemodialysis // *J Clin Microbiol*.-1986.-Vol. 24(2).-P.294-295.
98. Segal HL, Chessin LN, Schenk EA. Etiology of granulomatous disease of the gut (Crohn's disease) // *J Clin Gastroenterol*.-1981.-Vol. 3(4).-P.321-325.
99. Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Thayer WR, Coutu JA Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease // *J Clin Microbiol*.-1986.-Vol. 24(3).-P.357-363.
100. Domingue, G. J. Syphilis // *Sexually transmitted diseases: a contemporary treatise* / Ed. K. A. Borchardt.- CRC Press, Boca Raton, Fla., 1996.-P.130–144.
101. Domingue G. J., Ghoniem G. M., Bost K., Human L. Dormant bacteria in interstitial cystitis // *J. Urol*.-1995.-Vol.153.-P.1321–1326.
102. Llach F. Nephrotic syndrome: hypercoagulability, renal vein thrombosis, and other thromboembolic complications // Ed. B. M. Brenner and Stein J. H. / *Contemporary issues in nephrology*, vol. 9. Churchill Livingstone, New York., 1982.- P.121–144.
103. Horne, D. S., Nakenbeck R., Tomasz A. Secretion of lipids induced by inhibition of peptidoglycan synthesis in streptococci // *J. Bacteriol*.-1977.-Vol. 132.-P.704–717.
104. Domingue G. J., Thomas R., Walters F., Serrano A., Heidger P. M., Jr. Cell wall deficient bacteria as a cause of idiopathic hematuria // *J. Urol*.-1993.-Vol.150.-P.483–485.
105. Cameron J. S. Progress in glomerulonephritis // Ed. P. Kincaid Smith / *Progress in glomerulonephritis*.- Wiley, New York, 1979.- P. 1.

106. Ooi, B. S., Cohen D. J. Host immune deficiency in immune complex nephritis // J. Am. Soc. Nephrol.-1995.-Vol. 6.-1342-1346.
107. Piepkorn M.W., Reichenbach D.D. Infective endocarditis associated with cell-wall deficient bacteria. Electron microscopic findings in four cases. // Hum. Pathol.-1978.-Vol. 19.-P.163-173.
108. Fleming J.L., Wiesner R.H., Shorter R.G. Whipple's disease, clinical, biochemical, and histopathologic features and assessment of treatment in 29 patients // Mayo Clin. Proc.-1988.-Vol. 63.-P.539-551.
109. Small L.C., Ramakrishnan L., Falkow S. Remodeling schemes of intracellular pathogens // Science.-1994.-Vol. 263.-P.637-639.
110. Rook G.A. W., Stanford J.L. Slow bacterial infections or autoimmunity // Immunol. Today.-1992.-Vol.13.-P.160-164.
111. Zhang S.F. Localization and significance of lysozyme in tuberculosis // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.-1993.-Vol. 2.-P.80-82.
112. Michailova L, Kussovski V, Radoucheva T, Jordanova M, Berger W, Rinder H, Markova N. Morphological variability and cell-wall deficiency in Mycobacterium tuberculosis 'heteroresistant' strains // Int J Tuberc Lung Dis.-2005.-Vol. 8.-P.907-914.
113. Вишневецкая Е.В., Бобченко А.П., Мельникова Н.Н., Вишневецкий В.И. Идентификация Л-форм Mycobacterium tuberculosis с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) // Пробл. туберк.-2001.- № 4.-С.38-40.
114. Wang H, Chen Z. Observations of properties of the L-form of M. tuberculosis induced by the antituberculosis drugs // Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.-2001.-Vol. 1.-P.52-55.
115. Голанов В.С., Андреев Л.П., Богдалова В.Е., Мещеряков В.Г., Ушакова А.Г., Бондин С.В. Характеристики выделения бактерий у пациентов с различными формами туберкулеза легких // Пробл. туберк.-1994.-№ 5.-С.43-45.
116. Дорожкова И.Р., Земскова З.С., Круду В.Н. Л-трансформация микобактерий в свете текущей эпидемиологической ситуации по туберкулезу в мире // Вестн. Рос. Акад. Мед. Наук.-1995.- № 7.-С.30-33.
117. Дорожкова И.Р., Круду В.Н., Попеску Т.Т. Клиническая значимость определения Л-форм Mycobacterium tuberculosis у пациентов с остаточными туберкулезными изменениями в легких // Пробл.туберк.-1990.-№ 12.-С. 5-8.
118. Дорожкова И.Р., Карачунский М.А., Абдуллаева Е.Т., Гамзаева Н.Ф., Кочеткова Е.Я. Выделение Л-форм микобактерий как прогностический критерий рецидива и обострения туберкулеза у пациентов с обширными остаточными туберкулезными повреждениями легких // Пробл. туберк.-1989.- № 3.-С.14-18.
119. Кочорова М.Н., Семеновский А.В., Олейник А.Н. Клиническая картина генитального туберкулеза при различных формах его патогенна // Пробл. туберк.-2002.- № 6.-С.42-46.
120. Горина Л.Г., Романова Р.Ю., Гончарова С.А. Микробные ассоциации при хронических заболеваниях респираторного тракта // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол.-1986.- № 4.-С.18-21.

УДК 579.242/.253.2'3:616.9-092

**О РОЛИ ЛАТЕНТНЫХ, ТРУДНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ И НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ ПЕРСИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ В ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

Елисеєва І.В., Бабич Е.М., Волянський Ю.Л., Скляр Н.І., Білозерський В.І.

Институт мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, Харків

Целью данного обзора является анализ имеющихся в литературе данных о роли L-форм бактерий в патологии человека. Представлена их биологическая характеристика, условия индуцирования L-форм, культуральные свойства, морфология, охарактеризована этапность конверсии бактерий в L-формы и реверсии их к родительским бактериям, показана метаболическая активность L-форм, способность выживать в процессе фагоцитоза, а также антигенные, иммуногенные и сенсибилизирующие свойства. Патогенные потенции L-форм суммированы по данным экспериментов *in vitro* и *in vivo*, а также по материалам клинических данных при различных инфекционных заболеваниях человека, аутоиммунных заболеваниях и патологии с неустановленной этиологией. Перечислены некоторые вопросы теоретического и прикладного характера, нуждающиеся в дальнейших исследованиях.

**Ключевые слова:** L-формы бактерий, биологические свойства, фагоцитоз, антигенные свойства, иммуногенность, этиология заболеваний.

УДК 579.242/.253.2'3:616.9-092

**ПРО РОЛЬ ЛАТЕНТНИХ ТА ТАКИХ, ЩО ВАЖКО КУЛЬТИВУЮТЬСЯ АБО НЕ КУЛЬТИВУЮТЬСЯ ПЕРСИСТЕНТНИХ БАКТЕРІЙ В ПАТОЛОГІЇ ЛЮДИНИ**

Єлисеєва І.В., Бабич Є.М., Волянський Ю.Л., Скляр Н.І., Білозерський В.І.

Институт мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, Харків

Метою даного огляду літератури є аналіз даних про роль L-форм бактерій в патології людини. Представлено біологічну характеристику L-форм, умови їх індукування, культуральні властивості, морфологію, охарактеризовано етапність конверсії бактерій в L-форми та реверсію їх до батьківських бактерій, показано метаболічну активність L-форм, здатність виживати в процесі фагоцитозу, а також антигенні, імуногенні та сенсибілізуючі властивості. Патогенні потенції L-форм підсумовані за даними експериментів *in vitro* та *in vivo*, а також за матеріалами клінічних даних при різних інфекційних захворюваннях людини, аутоімунних захворюваннях і патології з невстановленою етіологією. Перелічені деякі питання теоретичного та прикладного характеру, які потребують подальших досліджень.

**Ключові слова:** L-форми бактерій, біологічні властивості, фагоцитоз, антигенні властивості, імуногенність, етіологія захворювань.

UDC 579.242/.253.2'3:616.9-092

**A ROLE OF LATENT, DIFFICULTLY CULTIVATED OR NON-CULTIVATED PERSISTENT BACTERIA IN HUMAN PATHOLOGY**

Yelyseyeva I., Babich Ye., Volyansky Yu., Sklyar N., Bilozersky V.I.

Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology AMS of Ukraine, Kharkiv

The purpose of this literature review is a consideration of a role of bacteria L-forms in human pathology. It was presented biological characteristic of L-forms, their induction's conditions, culture properties, morphology, phases of bacteria's conversion in L-forms and reversion to parent bacteria; it was shown metabolic activity of L-forms, capacity for survival during the phagocytosis and antigenic, immunogenic and sensitizing abilities. L-forms' pathogenic potency were summarized according to the experimental data *in vitro* and *in vivo*, as well as clinical facts about different infectious human illnesses, autoimmune diseases and pathology with unestablished etiology. Some theoretic and practice questions about bacteria L-forms which require a further investigations are listed.

**Key words:** bacteria L-forms, biological properties, phagocytosis, antigenicity, immunizing capacity, etiology of diseases.