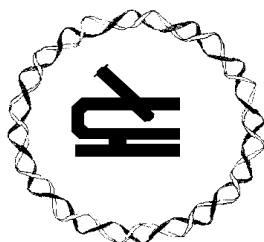


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА  
БІОЛОГІЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ

**М. Ю. Русакова, Т. В. Гудзенко, Н. О. Єлинська**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ПАТОГЕННОСТІ  
МІКРООРГАНІЗМІВ**

*КУРС ЛЕКЦІЙ*



ОДЕСА  
ОНУ  
2018

УДК 579.22:616-092(07)

P88

Рекомендовано до друку Вченою радою біологічного факультету  
ОНУ імені І. І. Мечникова.  
Протокол № 7 від 19.04.2018 р.

**Рецензенти:**

**Л. В. Капрельянц**, доктор технічних наук, професор кафедри біохімії, мікробіології та фізіології харчування Одеської національної академії харчових технологій;

**Б. Н. Мілкус**, доктор біологічних наук, професор кафедри селекції, генетики і захисту рослин Одеського державного аграрного університету;

**С. С. Смола**, кандидат хімічних наук, старший науковий співробітник Фізико-хімічного інституту імені О. В. Богатського НАН України;

**Т. О. Філіпова**, доктор біологічних наук, професор кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І. І. Мечникова.

**Русакова М. Ю.**

P88 Молекулярно-генетичні основи патогенності мікроорганізмів : курс лекцій / М. Ю. Русакова, Т. В. Гудзенко, Н. О. Єлинська. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2018. – 78 с.

Курс лекцій має 5 основних розділів, які стосуються загальних положень патогенності та вірулентності мікроорганізмів, генетично детермінованих факторів патогенності – адгезивності, захисту від імунних сил макроорганізму, інвазивності, токсигенності. Розглянуті еволюційні аспекти формування патогенності у мікроорганізмів, природа і характер взаємодії збудника з клітинами та макроорганізмом в цілому.

Призначений для студентів біологічного факультету.

УДК 579.22:616-092(07)

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b>	<b>5</b>
<b>ЗАГАЛЬНОБІОЛОГІЧНИЙ ЗМІСТ ЯВИЩА ПАТОГЕННОСТІ. ПАТОГЕННІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ І МЕХАНІЗМИ ЇЇ ВИНИКНЕННЯ</b>	<b>6</b>
Вірулентність	9
Інфекція та інфекційний процес	11
Фактори, що обумовлюють патогенність і вірулентність	12
<i>Контрольні питання</i>	13
<b>ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ФУНКЦІЄЮ АДГЕЗІЇ І КОЛОНІЗАЦІЇ</b>	<b>14</b>
Біологічне розпізнавання	15
Природа і розташування сайтів розпізнавання еукаріот	18
Адгезини бактерій	20
Адгезини грамнегативних бактерій	21
Адгезини грампозитивних бактерій	22
Фібрили і фібрилярні адгезини	22
Інші адгезини бактерій	22
Характеристика адгезинів деяких прокариот	23
<i>Адгезини Escherichia coli</i>	23
<i>Адгезія й адгезини стрептококів</i>	25
<i>Адгезія й адгезини нейссерій</i>	26
<b>ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ФУНКЦІЄЮ ЗАХИСТУ ВІД ІМУННИХ СИЛ МАКРООРГАНІЗМУ</b>	<b>26</b>
<b>Фактори, що екранують клітинну стінку бактерій</b>	<b>27</b>
Капсульний поліпептид збудника сибірської виразки	29
Протеїн А стафілококів	30
M-протеїн і капсула стрептококів групи А	31
Антиген клітинної стінки (фракція F-1), V- і W-антигени <i>Yersinia pestis</i>	32
<b>Антигенна мімікрія</b>	<b>33</b>
<b>Фактори бактеріальної природи, що секретуються (антидефенсини)</b>	<b>34</b>
<b>Утворення L-форм і микоплазм</b>	<b>37</b>
<i>Контрольні питання</i>	38
<b>ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ІНВАЗИВНОЮ ФУНКЦІЄЮ</b>	<b>39</b>
Характеристика деяких ферментів, що беруть участь в інвазії мікроорганізмів	41
Гіалуронидаза	41

<i>Гіалуронидаза Clostridium perfringens</i>	42
<i>Гіалуронидаза стрептококів</i>	42
Нейрамінідаза	43
<i>Нейрамінідаза холерного вібріона</i>	43
<i>Нейрамінідаза Corynebacterium diphtheriae</i>	43
<i>Нейрамінідаза Clostridium perfringens</i>	44
<i>Нейрамінідаза стрептококів</i>	45
Колагеназа	45
Лецитиназа	45
Фібринолізин	45
Коагулаза	46
<i>Інвазія бактерій роду Shigella</i>	46
<b>Контрольні питання</b>	47
<b>ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ТОКСИЧНОЮ ФУНКЦІЄЮ.</b>	48
Природа токсинів	48
Основні властивості екзотоксинів	50
Мембранно-активні екзотоксини	52
Суперантигени	53
А-В токсини	43
Прості чи «розрізані» В токсини	55
<i>Токсин C. diphtheriae</i>	55
<i>Екзотоксини C. botulinum</i>	59
<i>Екзотоксини C. tetani</i>	63
<i>А-токсин (α-гемолізін) S. aureus</i>	64
<i>Ентеротоксини стафілококів</i>	65
<i>Ентеротоксин C. perfringens</i>	68
<i>А-токсин (фосфолипаза С) C. perfringens типу А</i>	69
<i>Складні (комплексні) В екзотоксини</i>	70
<i>Токсин V. cholerae</i>	70
Ендотоксини	72
<b>Контрольні питання</b>	75
<b>ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОГО КОНТРОЛЮ СИНТЕЗУ</b>	76
<b>ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ БАКТЕРІЙ</b>	76
<b>Список рекомендованої літератури</b>	76

## ВСТУП

Мікробіота має виняткове значення у нормальному існуванні людини. Завдяки інтенсивним дослідженням в галузі мікробіології, молекулярної біології та біохімії з кожним роком збільшується інформація щодо величезного спектра молекулярних структур клітин мікроорганізмів, які є основою взаємодії мікробіоти та макроорганізмів.

У даному курсу лекцій автори зосередили головну увагу на ключових питаннях мікробіології та молекулярної біології відповідного напрямку, які дозволять студенту отримати базові знання в цих галузі.

Предмет обговорення даного курсу лекцій – питання мікробної взаємодії з організмом людини – напряму, що переживає останнім часом період стрімкого розвитку. Поглиблення уявлень щодо патогенності та вірулентності мікроорганізмів, генетично детермінованих факторів патогенності – адгезивності, захисту від імунних сил макроорганізму, інвазивності, токсигенності вимагає ознайомлення студентів біологічних спеціальностей із сучасними досягненнями в галузі мікробіології та бактеріальної терапії, що має зіграти позитивну роль в їх подальшій практичній роботі.

У результаті вивчення даної навчальної дисципліни студенти можуть на підставі понятійно-термінологічного апарату, що використовується в мікробіології та екології, давати характеристику еволюційним аспектам формування патогенності мікроорганізмів, природа і характер взаємодії збудника з клітинами та макроорганізмом в цілому; характеризувати механізми дії ферментів, токсинів і інших біологічно активних речовин, які виробляються мікроорганізмами, на організм людини.

## ЗАГАЛЬНОБІОЛОГІЧНИЙ ЗМІСТ ЯВИЩА ПАТОГЕННОСТІ. ПАТОГЕННІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ І МЕХАНІЗМИ ЇЇ ВИНИКНЕННЯ

**Термін «патогенність» означає потенційну здатність мікроорганізмів викликати захворювання.** Він складається з двох грецьких слів: *pathos* – страждання, хвороба і *genes* – походження, що народжує. Патогенними є далеко не всі бактерії. **Патогенність – видова генетично детермінована ознака.**

Тому закономірним є питання: як виникли патогенні бактерії і чим визначається їхня патогенність? Однозначної відповіді на нього дати неможливо тому, що патогенність бактерій визначається їх особливими властивостями. Одним з пояснень виникнення патогенних бактерій служить допущення того факту, що їхня поява пов'язана з пристосуванням до паразитичного існування і придбанням у зв'язку з цим таких біологічних властивостей, що забезпечують їм здатність протистояти захисним механізмам макроорганізму.

У зв'язку з цим необхідно згадати: які в природі існують взаємини між макро- і мікроорганізмами? Це, природно, різні форми симбіозу. Під симбіозом (від грецьк. *symbiosis* – співжиття) розуміють взаємне існування організмів різних видів. Іноді вони втрачають здатність існувати окремо внаслідок тісної пристосованості один до одного. Симбіоз має різні форми: мутуалізм, коменсалізм і паразитизм.

Мутуалізм (від лат. *mutuus* – взаємний) – взаємовигідне співжиття. Наприклад, деякі ентеробактерії споживають органічні сполуки, що надходять у нижній відділ кишечника, а вітаміни які вони продукують, необхідні для біокаталітичних реакцій, чи симбіоз бульбочкових бактерій з бобовими рослинами.

Коменсалізм (від лат. *cummensal* – стіл, співтрапезник) – один користується їжею, чи захистом, якими-небудь перевагами за рахунок іншого, причому останній не відчуває від цього ніякого збитку чи шкоди (нормальна мікробіота людини і тварин).

Паразитизм (від греч. *parasitos* – нахлібник). Симбіонти, що існують за рахунок свого співмешканця і завдають йому шкоди, можна назвати паразитом, а форму співжиття – паразитизмом.

Перехід від коменсалізму до паразитизму цілком логічний. Вважають, що перші сапрофіти з'явилися на Землі 3,5 млрд. років тому, бактерії-паразити – значно пізніше – у світі формування рослинного, а потім і тваринного світу (1,5 млрд. років тому).

В основі появи паразитизму лежить:

1. розширення і відновлення екологічних можливостей бактерій-сапрофітів (від грецьк. *sapros* – гнилий, *phytos* – рослина);
2. отримання додаткових генів від бактеріофагів або плазмід;
3. перебудова метаболізму в залежності від умов існування.

**Розширення і відновлення екологічних можливостей бактерій-сапрофітів** самий довгий еволюційний процес. Сутністю процесу є декількоразові мутації і постійний добір таких форм мікроорганізмів, що були найбільш пристосованими до нових екологічних умов. У результаті придбання селективних переваг перед паразитами відкрилися нові екологічні сфери поширення, не заселені їхніми предками. Так, виникли спочатку факультативні паразити, що у залежності від умов середовища поведуться або як сапрофіти або як паразити. Вони не втратили своєї самостійності, що виражається у збереженій здатності до самостійного існування в навколишньому середовищі. Так, наприклад, збудники таких захворювань, як ботулізм, правець, постійно існують у зовнішньому середовищі: природним середовищем існування для них є ґрунт. Їхня патогенність для людини і теплокровних тварин пов'язана зі здатністю виробляти найсильніші токсини. Однак, не відомо, яку роль токсинутворення грає в житті й екології цих бактерій. Періоди паразитизму для них випадкові і мало впливають на збереження виду.

Потім з'явилися облігатні паразити, що розмножуються тільки в організмі своїх хазяїв. Серед них формувалися патогенні форми, здатні в процесі своєї життєдіяльності викликати в організмі хазяїна патологічні зміни. Одні з них задовольняли свої харчові потреби в умовах позаклітинного існування. Такі мікроорганізми називають облігатними позаклітинними паразитами. Вони розмножуються в порожнинах тіла і міжклітинних просторах (збудники сибірської виразки, чуми, холери й ін.). Інші – в результаті наступних мутацій і добору придбали такі властивості, що дозволили їм освоїти нову екологічну нішу – клітину хазяїна, тобто стали внутрішньоклітинними паразитами. Внутрішньоклітинні паразити виявилися більш захищеними, чим позаклітинні, від дії антитіл і фагоцитів.

Серед внутрішньоклітинних паразитів відрізняють факультативних і облігатних, що відрізняються один від одного ступенем залежності від макроорганізму.

Здатність до факультативного внутрішньоклітинного паразитизму виявлена у багатьох патогенних бактерій, що належать до різних таксонів. З ентеробактерій до них відносяться шигели і дизентерієподібні кишкові палички, що розмножуються усередині епітеліальних клітин кишки; сальмонели, що розмножуються в клітинах лимфоїдної тканини. Найбільш типовими факультативними внутрішньоклітинними паразитами є патогенні

нейсерії (гонококи, менингококи), а також бруцели, мікобактерії туберкульозу і вивітки, що фагоцитуються лейкоцитами і розмножуються в них.

Облігатні внутрішньоклітинні паразити втратили здатність до синтезу різних ферментів оскільки придбали здатність використовувати для своїх власних метаболічних реакцій готові продукти, синтезовані клітинами хазяїна.

До облігатних внутрішньоклітинних паразитів відноситься значно менша кількість мікроорганізмів: мікоплазми, рикетсії, хламідії. Механізми внутрішньоклітинного паразитизму у даних бактерій неоднакові. У мікоплазм вони пов'язані з втратою здатності синтезувати речовини, що входять до складу клітинної стінки. В умовах внутрішньоклітинного існування це полегшує проникнення в клітини мікоплазм, позбавлених клітинної стінки, різних метаболітів. Однак серед мікоплазм є непатогенні форми і деякі можуть розмножуватись на штучних живильних середовищах. Це свідчить про те, що паразитизм і патогенність – поняття нерівноцінні.

Внутрішньоклітинний паразитизм рикетсій обумовлює їх нездатність синтезувати деякі ферменти, що беруть участь у гліколізі, а хламідій – втрату здатності до синтезу молекули АТФ. Тому їх відносять до енергетичних паразитів, залежних від джерел енергії клітин хазяїна. Це визначило їхні селективні переваги перед позаклітинними паразитами.

Інший механізм перетворення непатогенних бактерій у патогенні зв'язаний з **одержанням першими додаткових генів від бактеріофагів або плазмід**. Наприклад, дифтерію людини викликають тільки патогенні *Corynebacterium diphtheriae*, а здатність синтезувати дифтерійний екзотоксин вони здобувають у результаті лізогенної конверсії. Інакше кажучи, хвороботворність цих бактерій залежить від передачі їм генів токсигенності від особливих токсигенних корінефагів. Інтегруючи в хромосому непатогенних корінебактерій, такі фаги привносять до них свої гени, що і перетворюють не патогенні корінебактерії в збудників дифтерії.

У свою чергу, багато варіантів діареєгенних кишкових паличок виникли в результаті придбання ними плазмід, у складі яких є гени, що перетворюють не патогенну *E. coli* у патогенну, здатну викликати різні форми ешеріхіозів.

Нарешті, у природі існують різні **види бактерій, здатних за допомогою сенсорно регуляторних систем перебудувати свій метаболізм** у залежності від того, у яких умовах вони існують – у зовнішньому середовищі чи в організмі теплокровних тварин. Ці бактерії (легіонелли, ієрсинії та ін.) одержали назву сапронозних тому, що їх природним середовищем існування є ґрунт і рослинні організми. Однак, потрапляючи в організм людини чи тварини, вони змінюють свій метаболізм у бік, що сприяє їхньому розмноженню й у цих

умовах, тобто при більш високій температурі в живому організмі з його механізмами захисту.

**Патогенність, чи здатність викликати захворювання, не є категорією абсолютною.** Її обумовленість знаходить своє вираження в наступних фактах: патогенність бактерій виявляється завжди щодо визначеного виду (видів) тварин. Є бактерії, патогенні тільки для людини, є патогенні тільки для тварин, але є патогенні і для людини і для тварин (збудники чуми, бруцельозу, туляремії та ін.).

Не патогенний в одних умовах (природних) для макроорганізму, збудник може стати патогенним в інших, змінених умовах, Наприклад, в природних умовах кури не хворіють на сибірську виразку, але якщо температуру тіла штучно понизити, вони нею занедужають.

І природно, що особи з розладами здоров'ям, переважною, неправильним харчуванням, що живуть у несприятливих санітарних умовах, які піддаються важкій нервовій травмі, ослаблені важкими операціями, які були піддані впливу радіаційного опромінення, частіше занедужують інфекційними захворюваннями, чим особи, що живуть у сприятливих умовах. Тобто мікроорганізми, що є непатогенними чи умовно-патогенними для фізіологічно здорових організмів, можуть стати патогенними при ослабленні їхньої природної резистентності.

### **Вірулентність**

Патогенність – видова властивість бактерій, що властива виду в цілому, але вона може виявлятися в різному ступені (коливатися в межах одного виду) у різних представників даного виду. Тому для оцінки ступеня патогенності використовують термін вірулентність (від лат. *virulentus* – отрутний, заразний). Під вірулентністю розуміють кількісну оцінку, тобто міру, ступінь патогенності.

Для кількісного вираження вірулентності мікроорганізмів використовують умовно прийняті одиниці –  $D_{lm}$ ,  $D_{cl}$  і  $D_{l50}$ .

$D_{lm}$  (*Dosis letalis minima*) – мінімальна смертельна доза мікроорганізмів чи їх токсинів, при визначеному способі зараження здатна викликати загибель вразливої тварини завжди стандартної маси і віку за певний період часу. Ця доза – величина відносна і залежить від виду тварини – для кролика, собаки, морської свинки вона буде різна. Визначають  $D_{lm}$  звичайно не на одному, а на групі тварин. При цьому число загиблих тварин повинно бути не менше 95%.

$D_{cl}$  (*Dosis certa letalis*) – смертельна доза, що викликає загибель будь-якої тварини, вона також є відносною.

Тому статистично найбільш достовірною летальною дозою прийнято вважати дозу (кількість мікроорганізмів чи їх токсинів), що викликає загибель 50% заражених тварин  $DI_{50}$ . Вона встановлюється на підставі статистичної обробки результатів по методу Ріда і Менча.

Числове вираження мінімальної смертельної дози буде залежати від видової й індивідуальної стійкості тварин, на яких воно визначається, і від властивостей бактерій, що змінюються в залежності від зовнішніх умов. Природно, що ослаблені тварини, тобто які не одержують повноцінне харчування, які знаходяться в несприятливих умовах існування будуть більш чуттєві до штамів бактерій, що викликають інфекційний процес, чим тварини, що знаходяться в нормальних умовах існування.

При вимірі вірулентності істотне значення має спосіб введення збудника в організм. Так, наприклад, найбільш чуттєвими лабораторними тваринами до туберкульозу є морські свинки. Загибель їх від туберкульозу настає при введенні їм аерогенним шляхом значно меншої кількості туберкульозних мікобактерій (1-2 клітини), чим при пероральному зараженні. При зараженні через кишки смертельна доза збільшується до декількох тисяч клітин.

Вірулентність бактерій, також як і будь-яка інша ознака, може змінюватися, ці зміни носять або фенотиповий характер, або є наслідком мутацій у відповідних генах.

**Вірулентність – штамова ознака мікроорганізмів.** Однак, вірулентність (як і патогенність) – категорія не абсолютна. Вірулентність не повинна розглядатися як властивість даного штаму взагалі тому, що вона може змінюватися, що залежить від віку культури, умов її вирощування, складу живильного, середовища, виду тварини, способу введення мікроорганізмів і ін.

Для патогенних бактерій встановлено, що в момент виділення з хворого організму, вони виявляються більш вірулентними і небезпечними для здорових осіб, чим після деякого перебування в зовнішньому середовищі. Так само, як і бактерії, що виділяються реконвалесцентами менш вірулентні, чим ті, що виділяються хворим організмом.

Вірулентність може бути посилена (підвищена) і послаблена (знижена) у лабораторних умовах.

Методи штучного зниження вірулентності дуже різноманітні. Це досягається різними способами впливу на відповідного збудника. Наприклад, зниження вірулентності спостерігається при старінні бактеріальної культури, вирощуванні її в несприятливих умовах, зокрема, при температурі нижче чи вище оптимальної, висушуванні, проведенні через резистентний до збудника тваринний організм, при впливі бактеріофага. Вірулентність також знижується при тривалому культивуванні бактерій у присутності різних речовин (фенолу,

перекису водню, бичачої жовчі, сапоніну, розчину Люголя й ін.), а також імунної сироватки. Штами, що втратили вірулентні властивості називаються авірулентними. Однак, при пересіваннях даної культури на повноцінне живильне середовище і культивуванні в оптимальних умовах її вірулентні властивості звичайно відновлюються.

Тобто, авірулентні мутанти, з одного боку, можна одержувати при дії на бактерії чи віруси різних фізичних або хімічних мутагенів. З іншого боку, у бактеріальній популяції в результаті спонтанних мутацій часто присутні в більшій чи меншій кількості авірулентні особи.

Значно складніше досягається штучне посилення вірулентності (наприклад, проведення маловірулентного штаму через організм вразливої тварини, але тут результати виявляються не завжди надійними). Але більш конкурентоздатними в бактеріальній популяції виявляються окремі вірулентні клітини, що присутні у бактеріальній популяції. У результаті селективного тиску макроорганізму вірулентні клітини накопичуються в організмі, авірулентні – гинуть. Це остаточно приводить до формування вірулентної бактеріальної популяції.

Застосування молекулярно-генетичних методів (штучне введення генів, плазмід) дозволяє підвищити вірулентність бактерій.

### **Інфекція та інфекційний процес**

Основна властивість патогенних бактерій – здатність викликати інфекційний процес.

Термін інфекція (лат. *infectio*) означає заражати, вносити щось шкідливе.

Інфекція як біологічне явище являє собою взаємини щонайменше одного виду патогенного мікроорганізму з більш організованим макроорганізмом. Інфекція по своїй суті має відносини антагоністичного характеру, вироблені обома сторонами в результаті тривалої еволюції, тобто є однією з форм боротьби за існування.

Збудник визначає виникнення інфекційного процесу, його специфічність, впливає на його плин і результат. Збудниками інфекційних хвороб можуть бути представники різних типів і класів мікроорганізмів: найпростіші, бактерії, віруси. Ці мікроорганізми також називаються інфекційними агентами і є обов'язковими причинами виникнення інфекційного процесу.

Інфекція – процес, під час якого паразит вступає у взаємини з хазяїном. Однак інфекція (синонім – інфекційний процес) нерівнозначна інфекційному захворюванню, що відбиває патогенетичну і клінічну сторону взаємодії між мікро- і макроорганізмами. Також не можна ототожнювати інфекцію винятково зі збудником хвороби, оскільки він є тільки одним з факторів, що обумовлює

зміну внутрішнього середовища організму і розвиток патологічних змін, але не визначає цей стан у цілому.

Інфекційний процес чи інфекція – сукупність фізіологічних і патологічних процесів, що виникають і розвиваються в організмі при впровадженні в нього патогенних мікроорганізмів, що викликають порушення сталості його внутрішнього середовища і фізіологічних функцій. Це складний процес взаємодії між мікроорганізмами і їхніми продуктами, з одного боку, клітинами, тканинами й органами організму людини – з іншої. Інфекційний процес характеризується надзвичайно широкою різноманітністю свого прояву. Він визначається властивостями збудника, станом макроорганізму й умовами навколишнього середовища, у якій відбувається ця взаємодія, у тому числі і соціальних факторах.

Основні етапи цього процесу в організмі людей і тварин такі:

1. проникнення паразита в організм хазяїна;
2. закріплення і розмноження паразита в організмі хазяїна;
3. вихід з організму хазяїна;
4. ефективний механізм передачі новим хазяївам.

### **Фактори, що обумовлюють патогенність і вірулентність**

Патогенність і вірулентність обумовлюється комплексом властивостей бактерій, що сформувалися в процесі пристосування до паразитування в макроорганізмі. Виникнення патогенності в бактерій зв'язано з придбанням ряду властивостей, що забезпечують здатність проникати і поширюватися в макроорганізмі, протистояти його захисним властивостям і викликати враження життєво важливих систем.

Фактори патогенності можна розділити на кілька груп:

- *фактори патогенності з функцією адгезії і колонізації;*
- *фактори патогенності з функцією захисту від імунних сил макроорганізму;*
- *фактори патогенності з інвазивною функцією;*
- *фактори патогенності з токсичною функцією.*

### ***Контрольні питання***

1. Загальнобіологічний зміст явища патогенності.
  2. Патогенність, вірулентність та фактори патогенності – генетично детерміновані ознаки.
  3. Еволюційні аспекти формування патогенності у мікроорганізмів.
  4. Симбіоз. Форми симбіозу.
  5. Перехід від коменсалізму до паразитизму. Виникнення патогенів.
  6. Пристосування до паразитичного існування.
  7. Виникнення факультативних паразитів.
  8. Поява облігатних паразитів: облігатні позаклітинні паразити; внутрішньоклітинні паразити. Приклади.
  9. Факультативні внутрішньоклітинні паразити. Приклади.
  10. Облігатні внутрішньоклітинні паразити. Пристосування хламідій, рикетсій, мікоплазм до внутрішньоклітинного паразитизму.
  11. Перетворення непатогенних бактерій у патогенні за рахунок придбання додаткових генів від плазмід.
  12. Перетворення непатогенних бактерій у патогенні за рахунок придбання додаткових генів від бактеріофагів.
  13. Перетворення непатогенних бактерій у патогенні за рахунок здатності перебудувати свій метаболізм за допомогою сенсорно-регуляторних систем.
  14. Патогенність – видова генетично детермінована ознака мікроорганізмів.
  15. Поняття про вірулентність мікроорганізмів. Вірулентність – міра патогенності.
  16. Кількісне вираження вірулентності.
  17. Умовно прийняті одиниці вірулентності.
  18. Мінімальна смертельна доза мікроорганізмів та їхніх токсинів (D<sub>1m</sub>).
  19. Смертельна доза, що викликає загибель будь-якої тварини (D<sub>c1</sub>).
  20. Летальна доза, що викликає загибель 50% заражених тварин (D<sub>I50</sub>).
  21. Методи штучного зниження вірулентності. Авірулентні штами.
- Атенуація.
22. Штучне посилення вірулентності.
  23. Вірулентність – штамова генетично детермінована ознака мікроорганізмів.
  24. Поняття про інфекцію та інфекційний процес.
  25. Визначення інфекційного процесу.
  26. Інфекційні агенти.
  27. Основні етапи інфекційного процесу.
  28. Проникнення паразита в організм господаря.

29. Закріплення і розмноження паразита в організмі господаря.
30. Вихід з організму господаря.
31. Ефективний механізм передачі новим господарям.
32. Фактори патогенності

## **ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ФУНКЦІЄЮ АДГЕЗІЇ І КОЛОНІЗАЦІЇ**

Адгезивність (від лат. *adhesio* – прикріплення) – здатність до прикріплення є необхідною властивістю для початкового етапу взаємодії мікро- і макроорганізмів. Адгезія мікроорганізмів до епітеліальних клітин є пусковим механізмом інфекційного процесу.

Процес адгезії відрізняється специфічністю. Вона виявляється в тому, що по-перше, спостерігається вибірковість прикріплення бактерій до епітеліальних клітин у визначених ділянках організму: у респіраторному, аліментарному і сечостатевому трактах; по-друге, має місце вибірковість прикріплення визначених штамів бактерій до епітелію хазяїна, у якого вони викликають захворювання. Штами, що викликають захворювання в людей, більш активно прикріплюються до відповідних епітеліальних клітин людини, чим до аналогічних клітин тварини і навпаки.

Розглядаючи бактеріальну інфекцію на клітинному рівні можна сказати, що вона являє собою результат взаємодії бактеріальної клітини з клітиною тканини організму хазяїна. Це означає, що розвиток специфічної патології є наслідком взаємодії клітин прокариот з еукаріотичними клітинами. Крім взаємодії клітина-клітина, що має місце на ранніх етапах розвитку бактеріальної інфекції, на заключних етапах цього процесу переважають молекулярно-клітинні механізми, що приводять до поразки токсичними речовинами найважливіших внутрішньоклітинних мішеней.

Процес взаємодії бактерій з епітеліальними клітинами можна розглянути на прикладі збудників кишкових інфекцій, серед яких зустрічаються представники, що паразитують на поверхні епітелію, усередині епітеліальних клітин і субепітеліально. Усі збудники кишкових інфекцій насамперед «прилипають» до гликопротеїнового покриву ворсинок ентероцитів (клітини циліндричного епітелію) – глікокаліксу, руйнують його і вступають у контакт із мікроросинками щіткової облямівки.

Наступні етапи взаємодії з епітеліальними клітинами у різних видів бактерій відбуваються по-різному. Холерний вібріон, що паразитує на поверхні епітелію слизуватої тонких кишок, прикріплюється до верху мікроросинок ентероцитів, майже не ушкоджуючи їх. Продукований ними екзотоксин діє

місцево на епітеліальні клітини, викликаючи посилену секреторну діяльність ентероцитів.

Збудники дизентерії – шигели – проникають усередину епітеліальних клітин товстих кишок і розмножуються в них. На відміну від холерного вібриона шигели викликають значне ушкодження щіткової облямівки і, не затримуючись в ній, проникають у цитоплазму епітеліальних клітин. При цьому шигели вдавлюють зовнішню мембрану ентероцитів, з якої утвориться вакуоль, потім, руйнуючи стінку вакуолі, виходять у цитоплазму, де розмножуються й вражають клітини, викликаючи їх загибель. Мігруючи в сусідні клітини, збудники дизентерії сприяють поширенню процесу уздовж епітеліального покриву. У субепітеліальні тканини шигели, як правило, не переходять, а у випадку проникнення вони швидко фагоцитуються поліморфноядерними лейкоцитами.

Здатністю проникати крізь епітеліальні клітини володіють сальмонели. Місцем локалізації сальмонел є підвздошна кишка. Механізм проникнення цих бактерій в епітеліальні клітини подібний з таким у шигел, однак на відміну від останніх сальмонели майже не роблять дії, що ушкоджує, на покреслену облямівку ентероцитів. Після проникнення в ентероцити сальмонели разом з вакуолею переносяться в базальну частину клітини, звідкіля, не затримуючись, надходять у підлягаючі тканини і регіонарні лімфовузли. Тут вони інтенсивно розмножуються і з лімфою надходять у кров'яне русло, розносяться по всьому організму, вражаючи багато органів і тканини.

Специфічність адгезії обумовлена наявністю комплементарних макромолекулярних структур у взаємодіючих (прокаріотичної і еукаріотичної) клітин. Структури бактеріальної клітини, відповідальні за розпізнавання і прикріплення, називаються *адгезинами*, чи *лігандами*, а структури клітин хазяїна – *рецепторами*. Локалізуються і адгезини і рецептори на поверхневих структурах клітин.

Однак загальним для всіх етапів є те, що усі вони починаються з біологічного впізнавання, опосередкованого специфічною функцією поверхово розташованих компонентів чуттєвої клітини.

## БІОЛОГІЧНЕ РОЗПІЗНАВАННЯ

Специфічні процеси впізнавання один одного молекулами і клітинами – ключова умова для функціонування біологічних систем і їхньої взаємодії з навколишнім середовищем. До числа таких систем можна віднести і процес бактеріальної інфекції, перший етап якого зводиться до специфічного впізнавання збудником відповідної тканини в макроорганізмі, прикріплення до

клітин цієї тканини і наступному її заселенню (колонізації). На принципі біологічного впізнавання заснована і взаємодія збудника з клітинами фагоцитарної системи макроорганізму, для якого проблема розпізнавання чужорідного агента має вирішальне значення в механізмах захисту від інфекцій. Принцип біологічного розпізнавання відіграє вирішальну роль у знаходженні токсином чуттєвої тканини, зараження якої лежить в основі специфічного синдрому захворювання.

В основі специфічного зв'язування біомолекул чи мікробної клітини з клітиною-мішенню в макроорганізмі лежить принцип комплементарності. Клітини взаємодіють між собою за допомогою макромолекул, розташованих на поверхні. Так, якщо на поверхні однієї молекули є виступ, то на комплементарній їй поверхні іншої молекули повинно бути поглиблення чи напроти позитивного заряду повинний бути негативний; для утворення гідрофобних зв'язків неполярні (гідрофобні) групи повинні розташовуватися одна проти іншої. Принцип комплементарності – один з найбільш важливих принципів біології і в біохімії його ще називають принципом виборчої «злипаємості» молекул. Він говорить: дві молекули, поверхні яких комплементарні, прагнуть взаємодіяти і з'єднуватися один з одним, тоді як молекули, що не містять комплементарних поверхонь, не взаємодіють.

Феномен специфічного розпізнавання молекул один одним можна назвати первинною характеристикою живої матерії. Основна концепція біологічного розпізнавання базується на системі комунікативних зв'язків, що включають прийняття некоординованого сигналу за допомогою рецепції його на клітинній поверхні і його трансляції в дію, як робити це, клітина вже знає. Зв'язок може не спрацювати, якщо немає відповідного рецептора, на який може бути прийнятий сигнал, або якщо відсутній чи дефектний що транслює чи трансдукуючий апарат, тобто ланки, що передають і трансформують сигнали, таким чином, система комунікацій, що лежить в основі біологічного впізнавання містить у собі сигнальну рецепцію, сигнальну трансляцію і біологічну відповідь.

Ліганд-рецепторна взаємодія, що лежить в основі біологічного впізнавання, припускає існування на поверхні клітини: 1) спеціальної структури, здатної прийняти сигнал, що надходить, (розпізнавальний елемент сигнальної рецепції); 2) механізму, що трансформує цей сигнал у дію, якою відповідає клітина (ефекторний елемент) і 3) передавальний механізм, завдяки якому з'єднуються перший і другий елементи (трансдуктор).

На відміну від ефектора розпізнавальний елемент сигнальної рецепції, рецептор, звичайно розташовується асиметрично на зовнішній стороні двошарової мембрани, ефектор же може знаходитися поза мембраною, у мембрані чи в її частині, зверненої до цитоплазми.

Наявність у рецепторі специфічного сайту зв'язування додає процесу впізнавання строгу специфічність. По хімічній природі сайти зв'язування характеризуються надзвичайною структурною різноманітністю, що, відповідно, забезпечує клітині величезні потенційні можливості, що реалізуються в різноманітті рецепторів.

Існує дві моделі, що пояснюють послідовність стадій, що лежать в основі функціонування рецепторів під дією лігандів. Перша припускає, що в результаті контакту ліганду з рецептором відбувається активація рецептора, тобто ліганд потрібний для того, щоб перевести рецептор в активний стан. Після активації рецептора необхідність у присутності ліганду відпадає. Біологічна активність у цьому випадку знаходиться у прямій залежності від кількості рецепторів, що контактують з лігандом за одиницю часу. Оскільки зв'язок ліганд-рецептор оборотна, то дисоціація комплексу приводить до регенерації рецептора, і, мабуть, повторному виконанню ними своєї функції.

Відповідно до другої моделі, взаємодія ліганд-рецептор приводить до утворення інертного комплексу, наявність якого саме по собі необхідно для активації системи, тобто під час відсутності комплексу ліганд-рецептор система трансдуктор-ефектор не функціонує. У цьому випадку біологічна активність пропорційна кількості комплексів, утворених за одиницю часу. Після імпульсу, індукованого зв'язком з лігандом, рецептор відновлюється і може знову функціонувати.

Оборотність ліганд-рецепторної взаємодії свідчить про те, що це зв'язування не носить ковалентний характер, а скоріше в ньому беруть участь більш слабкі зв'язки, такі, як Ван-дер-Ваальсові й електростатичні сили, а також водневі і гідрофобні зв'язки.

Ван-дер-Ваальсові сили відносяться до категорії короткодійних. Обумовлені електростатичним притяганням негативно заряджених електронів одного атома позитивно зарядженим ядром іншого атома.

Електростатичні сили обумовлюють притягання між зарядженими угрупованнями. Часто служать причиною зміни конформації молекул.

Водневі зв'язки відносяться до типу слабких зв'язків, але забезпечують комплементарність поверхням взаємодіючих молекул і забезпечують цим молекулам точне сполучення поверхонь.

Гідрофобні зв'язки. Процес формування гідрофобних зв'язків можна уявити собі переміщенням неполярних частин молекули з води в гідрофобні області, утворені за рахунок асоціації неполярних груп. Про- і еукаріотичні клітини мають негативний заряд. Функція гідрофобних молекул зводиться, мабуть, до того, що з їхньою допомогою клітини бактерій переборюють

електростатичний бар'єр і зближаються, наприклад, із клітинами слизуватої оболонки.

Таким чином, процес прикріплення бактеріальних клітин до клітин тканин організму має характер взаємодії клітина-клітина, оскільки в нього вносять вклад різні по своїй природі сили.

Специфічність зв'язування оцінюється за наступними критеріями:

- ліганди повинні мати структурну специфічність,
- зв'язування повинне бути швидким,
- повинна існувати кореляція між зв'язуванням і біологічною активністю,
- зв'язування повинне бути оборотним,
- зв'язування повинне характеризуватися насичуваністю,
- повинна дотримуватися фізіологічна адекватність щодо тканини, із клітинами якої взаємодіє ліганд.

Зв'язок вважається специфічним тільки при наявності всіх цих умов.

Для того щоб говорити про здатність бактерій до адгезії (а потім і подальшої колонізації) на поверхні клітин макроорганізму, необхідно згадати будову поверхневих структур клітин мікро- і макроорганізмів.

## **ПРИРОДА І РОЗТАШУВАННЯ САЙТІВ РОЗПІЗНАВАННЯ ЕУКАРІОТ**

Специфічні структури, що беруть участь у процесах біологічного розпізнавання, розташовуються на клітинній поверхні, а саме на зовнішній частині плазматичної мембрани клітин еукаріот. Найчастіше – це вуглеводні компоненти.

Плазматичні мембрани характеризуються функціональною і структурною асиметричністю. Серед тваринних клітин найбільше добре вивчені плазматичні мембрани еритроцитів, на частку яких припадає до 1% сухої речовини клітини. Вони складаються в основному з білків і ліпідів, іноді в них присутні в незначних кількостях вуглеводи (менш 5%) і в слідових кількостях РНК (менш 1%). Товщина більшості мембран приблизно 7-11 нм.

Основним елементом структурної моделі мембран служить ліпідний бішар. У мембранах еукаріот присутні три класи ліпідів: фосфоліпіди, гліколіпіди і холестерол. Фосфоліпіди і холестерол знаходяться і на зовнішній і на внутрішній стороні мембрани. Гліколіпіди – тільки на зовнішній стороні мембрани.

На зовнішній стороні мембрани розташовані молекулярні маркери клітинної специфічності і структури, що беруть участь у розпізнаванні клітини клітиною, а також що здійснюють реакцію розпізнавання регуляторів, які діють

на клітину ззовні. Саме ці структури і називаються рецепторами. Невід'ємними компонентами мембрани є білки, глікопротеїни (близько 20 різних молекул) і гліколіпіди, велика частина яких інтегрована з ліпідним бішаром, або знаходиться у вільному стані. При цьому гідрофільні вуглеводні групи таких компонентів звернені назовні у водяну фазу, а неуглеводні знаходяться на поверхні мембрани, зверненої до цитоплазми. Так, орієнтовані гліколіпіди, у яких гідрофобна частина виявляється схованою усередині мембрани, а гідрофільна виступає назовні. Такі мембранні компоненти називаються амфіпатичними. Розташування цукрових послідовностей амфіпатичних глікопротеїнів і гліколіпідів на зовнішній поверхні клітинної мембрани обумовлює їх ключову функцію в процесах рецепції. І якщо до цього ще додати унікальну властивість цукрів піддаватися різноманітним структурним перетворенням, то саме ці сполуки з більшим ступенем імовірності можна розглядати як кандидатів у рецептори, що розпізнають.

Множинні з'єднання цукрових залишків забезпечують клітині структурну і функціональну різноманітність рецепторів. Наприклад, простий дисахарид, що складається з глюкози, може існувати в 11 різних формах, глюкозний трисахарид дає 176 анамерних конфігурацій, а кількість можливих структурних варіантів змішаного трисахариду набагато більше. Мембранні олигосахариди тварин клітин містять у більшості випадків 4-20 моносахаридних залишків, серед яких переважає глюкоза, галактоза, маноза, фруктоза, N-ацетилглюкозамін та ін.

Один з не багатьох компонентів еритроцитарної мембрани, що вивчений досить добре, являє собою глікопротеїн – глікофорин. Він має молекулярну масу близько 31 000, причому майже 60% маси складають вуглеводи. Білкова частина представлена одним поліпептидним ланцюгом, що містить 131 амінокислотний залишок. N-термінальна частина молекули з'єднана з 16 розгалуженими олигосахаридами, що виступають із клітинної мембрани. Усього на один поліпептидний зв'язок приходиться близько 160 молекул цукрів, серед яких переважає сіалова кислота, що додає глікопротеїну негативний заряд. 3-Термінальна ділянка характеризується високою гідрофільністю і містить у переважній кількості залишки проліну, глутамінової і аспарагінової кислот. Між цими двома доменами з N- і 3-кінців знаходиться частина поліпептидного ланцюга, що складається з 32 гідрофобних залишків і утворює спіралевидну ділянку, що пронизує ліпідний бішар.

Серед усіх білків, що знаходяться в мембрані еритроцитів, переважає гідрофобний білок спектрин, на частку якого припадає 1/3 від загальної кількості білка. Він має молекулярну масу 220 000-250 000 і разом з іншим

низькомолекулярним білком (молекулярна маса 43 000) утворює структури паличкоподібної форми розміром 3x200 нм.

Що стосується адгезії бактеріальних клітин до клітин тканин макроорганізму, то найбільш вивчена взаємодія зі слизуватою оболонкою шлунково-кишкового тракту, що має складну архітектуру і фізіологію. У тварин тонкий кишечник, товста і сліпа кишка вистелені одношаровим епітелієм, що складається з циліндричних клітин. У тонкому кишечнику слизувата оболонка організована так, що епітелій покривають пальцевидні ворсинки, що випинаються в просвіт кишки. У товстому кишечнику такі ворсинки не виявлені.

Циліндричний епітелій складається з клітин різних типів, включаючи секретуючі клітини (ентероцити) і бокаловидні клітини (клітини слизуватої). Від цитоплазматичних мембран циліндричних ентоцитів, звернених у просвіт, відгалужуються паличковидні структури, названі мікрворсинками, чи крайовими щетинками (щіткова облямівка). Мембрани мікрворсинок покриті тонким шаром – глікокаліксом, до складу цього шару, що відокремлює мембрани мікрворсинок від просвіту кишечника, входять глікопротеїни і гліколіпіди. Велика частина глікокаліксу покрита слизом, що синтезується бокаловидними клітинами. Слиз складається з глікопротеїнів. Отже, велика частина відділів шлунково-кишкового тракту покрита слизуватим шаром, що містить глікопротеїни, далі іде глікокалікс, що складається з глікопротеїнів і гліколіпідів і вкриває епітеліальну клітинну мембрану.

Деякі види мікроорганізмів, що прикріплюються до ділянок поверхні шлунково-кишкового тракту, де рухливість вмісту просвіту і слизу більш інтенсивна, мають потребу в спеціальних структурах, за допомогою яких вони зв'язуються з компонентами глікокаліксу чи мембрани епітеліальних клітин. Інші мікроорганізми, що заселяють ділянки шлунково-кишкового тракту, де вміст просвіту рухається повільно, не прикріплюються до глікокаліксу чи епітелію мембран. Для них досить фіксуватися в муцинозному шарі і колонізувати його.

### **АДГЕЗИНИ БАКТЕРІЙ**

У бактеріальній клітині функцію розпізнавання і прикріплення несуть субстанції, названі адгезинами. Усі бактеріальні адгезини – компоненти бактеріальної поверхні. Вони беруть участь у прикріпленні бактерій до інших поверхонь. До адгезинів бактерій відносять фімбрії, фібрилярні й інші білкові структури, розташовані на поверхні клітин.

Адгезини на молекулярному рівні виконують функцію розпізнавання мембранного рецептора еукаріотичної клітини, на клітинному рівні вони

забезпечують бактеріям прикріплення до клітин слизуватої оболонки кишечника і на популяційному рівні – колонізацію епітеліальної тканини.

### **Адгезини грамнегативних бактерій**

До адгезинів грамнегативних бактерій відносяться фімбрії. На одну бактеріальну клітину приходиться 100-700 фімбрій. Утворення фімбрій контролюють хромосомні гени.

Усі бактеріальні фімбрії утворені специфічними білками – пілінами, що характеризуються високим вмістом неполярних амінокислот.

Розрізняють 5 типів фімбрій.

Фімбрії I типу – з їхньою допомогою бактерії прикріплюються до грибних гіфів, рослинних і тваринних клітин. Кількість – 400 одиниць на одну клітину. Діаметр 7,0 нм, довжина 2,0 мкм. Розташовані перитрихіально. Інгібуються D-манозою (манозочуттєві фімбрії). Викликають аглютинацію еритроцитів. Беруть участь у прикріпленні бактерій однієї до другої й в утворенні плівки на поверхні бульйонної культури. Виявлені у всіх представників ентеробактерій. До них відносяться сапрофіти (*Klebsiella aerogenes*), коменси (*E. coli*) і облигатні патогени, зокрема сальмонели.

У *E. coli* фімбрії I типу складаються з білкових субодиниць з масою 16 000 – 17 000 і високим вмістом неполярних амінокислот. Не містять метіоніну і триптофану, що відрізняє їх від фімбрій інших бактерій. Є правообертаючимися ( $\alpha$ -спіралі, відстань між витками складає 2,3 нм). Характеризуються високою агрегаційною властивістю, що обумовлює їх прикріплення до таких гідрофобних часток, як латекс.

Фімбрії II типу виявлені у деяких видів сальмонел і шигел. Не беруть участь в адгезії й в утворенні плівки. Вважають, що це мутантні варіанти фімбрій I типу.

Фімбрії III типу беруть участь в адгезії тільки після того, як поверхня еукаріотичної (тваринної) клітини хімічно чи фізично модифікована. Беруть участь у прикріпленні бактерій до клітин рослин і грибів, целюлозних волокон, скла та ін. Діаметр 4,8 нм, довжина 0,5 мкм. Маннозорезистентні. Виявлені у *Klebsiella aerogenes* і *Serratia marcescens*, а також у ґрунтових сапрофітів.

Фімбрії IV типу виявлено у бактерій роду *Proteus*, зокрема в *P. mirabilis*, що викликає пієлонефрити. Маннозорезистентні. Діаметр 40 нм, довжина 2-6 мкм.

Фімбрії V типу характерні для псевдомонад, мають полярне, біполярне і перитрихіальне розташування, відрізняються здатністю до скорочення. Їх кількість на клітину коливається в межах від 10 до 100. Діаметр 50 нм, довжина 2-10 мкм. Молекулярна маса 15 000- 18 000, містять понад 50% гідрофобних

амінокислот. Викликають аглютинацію еритроцитів. Маннозозалежні. Слугують рецепторами для бактеріофагів.

Фібриї *Bordetella pertussis*, видів родів *Vibrio*, *Moraxella* і *Neisseria* не ввійшли ні в один із зазначених типів, тому що інформація про їх властивості дуже обмежена. У вібріонів середній діаметр фібриї складає 7,2 нм, вони викликають аглютинацію еритроцитів. У *Bordetella pertussis* фібриї ідентичні ниткоподібному гемагглютиніну, що має діаметр 2,0 нм і довжину 4,0-7,0 мкм. Обумовлюють адгезію до різних видів еритроцитів, викликаючи їх аглютинацію. Види роду *Moraxella* утворюють перитрихіально розташовані фібриї з діаметром 6,0-8,5 нм і довжиною подібною до фібриї I типу. Фібриї *N. gonorrhoeae* мають діаметр 7,0-8,5 нм і довжину 0,5 мкм. Характеризуються високим вмістом гідрофобних амінокислот. Розташовані перитрихіально. Кількість на клітину – 200. Аглютинація еритроцитів має маннозозалежний характер.

Порівняння термінальних послідовностей амінокислот фібриальних білків показало, що фібриї, прикріплення яких не інгибується D-маннозою, мають кінцеві ділянки з подібною послідовністю амінокислот.

### **Адгезини грампозитивних бактерій**

Серед грампозитивних бактерій фібриї виявлені тільки у видів *Corynebacterium*. Молекулярна маса 19 000. Містять високий відсоток гідрофобних амінокислот. Вони характерні для всіх вірулентних культур. Діаметр 20-40 нм, довжина – 0,2-3 мкм. Викликають аглютинацію еритроцитів. Маннозорезистентні.

### **Фібрили і фібрилярні адгезини**

У деяких бактерій (наприклад, у сероварів *Salmonella*, штамів кишкової палички та ін.) функцію прикріплення виконують не фібриї, а спеціалізовані фібрили, при цьому наявність фібрилярних адгезинів не виключає можливості продукції цими мікроорганізмами і фібриї. Маннозозалежні. Викликають гемагглютинацію.

До них відносяться K88-антиген кишкової палички, виділеної від свиней, і K99-антиген кишкової палички, виявлений у бичачих штамів. Бактерії, позбавлені цього антигену, не здатні прикріплюватися до епітелію і викликати діарею.

### **Інші адгезини бактерій**

У стрептококів (наприклад, у *S. mutans* і *S. pneumoniae*), клебсієлл (*K. pneumoniae*) і деяких інших мікроорганізмів функцію адгезії виконує капсула.

У мікоплазм виявлені вирости цитоплазматичної мембрани, що виконують адгезивну функцію. Розміри виростів складають 80-100x250-300 нм. Складаються з напівпрозорої зони, обмеженої зовні і зсередини електроннощільними пластинками.

У стрептококів групи А на зовнішній поверхні клітинної стінки виявлений нефібрилярний адгезин – протеїн Е, що зв'язується з фібринонектином на поверхні клітини макроорганізму.

### **Характеристика адгезинів деяких прокариот** ***Адгезини E. coli***

Штами *E. coli*, що викликають кишкову патологію можуть бути розділені на дві групи. Першу групу складають інвазивні штами, що викликають дизентерієподібний синдром (ентероколіти). В другу групу входять неінвазивні форми, що відповідають за розвиток діарейного синдрому тварин чи людини. Неінвазивні ентеропатогенні штами характеризуються двома особливостями: 1) розмножуються і колонізують область тонкого кишечника і 2) продукують один чи більше ентеротоксинів. У штамів другої групи токсин, відповідальний за розвиток ентеротоксичного ефекту, до першої стадії взаємодії бактерій із клітинами епітелію кишечника відношення немає. Ця стадія здійснюється за допомогою адгезинів. За допомогою адгезинів здійснюється процес впізнавання ентеротоксигенною кишковою паличкою відповідної тканини в тонкому кишечнику, чуттєвої до дії токсину.

У кишкової палички є кілька видів адгезинів, що характеризуються різною специфічністю щодо окремих видів еукаріотичних клітин. Однак жоден з адгезинів кишкової палички не вивчений настільки, щоб здатність впізнавати відповідний рецептор на еукаріотичній клітині можна було зв'язати з певною структурною областю молекули адгезина. Мало що відомо і про природу клітинних рецепторів для адгезинів. Усе це дозволяє розглядати адгезію *E. coli* з окремими видами еукаріотичних клітин в основному на рівні взаємодії клітина-клітина.

Бактерії ентеротоксигенних штамів прикріплюються до ворсинок епітелію в тонкому кишечнику і колонізують його. Колонізація супроводжується швидким збільшенням популяції збудника, що необхідно для достатньої продукції ентеротоксину, відповідального за клінічну картину діареї. При колонізації слизуватої оболонки ентеропатогенні кишкові палички в саму епітеліальну тканину не проникають. Штами, що викликають діарею, виявляються по всій поверхні ворсинок від їхньої вершини до основи і навіть на крайових щетинках. Неентеротоксигенні штами, як правило, залишаються в просвіті кишки, лише наближаючись до вершини ворсинок.

Вважається, що фімбрії I типу в прикріпленні *E. coli* до епітеліальних клітин кишечника участі не беруть. У впізнаванні і колонізації епітеліальної тканини у кишкової палички беруть участь фібрилярні адгезини, позначені як CFA/1, CFA/11, K99, K88, F41 і 987P (табл. 1). Штами кишкових паличок, що втратили ці адгезини, не здатні заселяти кишечник і викликати захворювання.

Таблиця 1

**Характеристика фібрилярних адгезинів *E. coli***

Адгезин	Джерело виділення	O-серогрупа	Діаметр	Молекулярна маса
K88	Поросята	O8, O45, O138, O141, O149, O157	2,1	27 540
987P	Поросята	O9, O20, O141	7,0	20 000
K99	Телята, ягнята	O8, O9, O20, O101	4,8	18 500
K99	Поросята	O64, O101		
F41	Телята	O9, O101	3,2	29 500
CFA/1	Людина	O15, O25, O63, O78	3,2	15 058
CFA/11	Людина	O6, O8	3,2	13 000

Фібрили, утворені адгезином K88 (антигеном K88), мають довжину 0,1-1 мкм. У них відзначена тенденція до скручування й утворення вузлів і агрегатів різного розміру. Фібрили легко відокремлюються від клітини і можуть бути виявлені як у зв'язаному, так і у вільному стані. Макромолекули фібрил складаються з окремих ідентичних субодиниць, кількість яких в поодинокій нитці досягає 100. Адгезин характеризується антигенною гетерогенністю – відомо декілька серологічних варіантів адгезина. Адгезія кишкових паличок, продукуючих адгезин K88, найбільш виражена в новонароджених поросят і різко знижується до кінця п'ятого тижня життя тварин, тобто адгезія мікроорганізмів до клітин епітелію може змінюватися з віком хазяїна.

Адгезин F41 також утворює ниткоподібні структури. У досліді з баранячими еритроцитами показано, що він володіє гемагглютинуючими властивостями і фіксується на ентероцитах теляти.

Адгезини ентеропатогенних *E. coli* безпосередньо взаємодіють з мікроворсинками чи глікокаліксом епітеліальних клітин, тому що можуть окремо від бактеріальних клітин зв'язуватися з клітинами кишкового епітелію. Крім того, в електронному мікроскопі видно, що у випадку адгезії мембрани мікроворсинок і клітинна стінка бактерій не знаходяться в безпосередньому контакті, а між ними є простір, заповнений адгезином.

На відміну від ентеропатогенних штамів культури *E. coli*, виділені від хворих з патологією сечовивідних шляхів, неоднорідні. Одні утворюють маннозочутливі фімбрії I типу, інші – маннозорезистентні, треті – і ті й інші.

Крім цього, в уропатогенних *E. coli*, що викликають маннозорезистентну гемаглютинацію описані фімбрії (P-фімбрії), що агглютинують еритроцити людини.

### **Адгезія й адгезини стрептококів**

У стрептококів одним з важливих адгезивних факторів служить ліпотьєва кислота (ЛТК), що розташована в клітинній стінці. На відміну від тейхєвих кислот, що представляють собою полімер глікозилізованих рибітола чи гліцерола, ковалентно зв'язаних з пептидогліканом, ЛТК мають ліпідну частину, що додає їм особливі властивості. Ліпідний компонент ЛТК може бути представлений гліколіпідом, наприклад, у лактобацилл і деяких стрептококів, фосфодилгліколіпідом, як у *S. faecalis*, чи просто жирною кислотою. Ліпідна частина ЛТК може існувати у вільному виді як складовий компонент плазматичної мембрани. Ліпід ЛТК, як якір, утримує всю молекулу на мембрані, обумовлюючи її специфічну орієнтацію. Якщо клітина позбавляється ліпідного компонента, вона не може взаємодіяти з біологічними мембранами еукаріот.

В основі зв'язування ЛТК із мембранами лежить гідрофобна взаємодія. Кількість сайтів впізнавання для ЛТК на одному еритроциті досягає  $29 \times 10^6$ . ЛТК може зв'язуватися з клітинами слизуватої оболонки ротової порожнини, тромбоцитами людини, а також із клітинами інших тканин.

Які саме рецептори еукаріотичних клітин зв'язуються з ЛТК стрептококів поки остаточно не з'ясовано. Однак від наявності рецепторів, доступних для зв'язування з ЛТК, мабуть, залежить і чутливість окремих тканин до дії стрептококів. Установлено, що відразу після народження дитини клітини слизуватої оболонки ротової порожнини практично не зв'язують ЛТК, а через 48-72 години зв'язування ЛТК цими клітинами різко зростає.

За біологічними властивостями ЛТК подібна з ліпополісахаридом зовнішньої мембрани (ЛПС), за винятком пірогенності і летальності (ендотоксичного ефекту). Має імуногенні властивості, мітогенність, антикомплементарну активність, стимулює ретикуло-ендотеліальну систему, неспецифічний імунітет, викликає вивільнення макрофагами лізосомних ферментів.

Крім цього, як указувалося вище, у стрептококів групи А на поверхні клітинної стінки виявлений нефібрилярний адгезин – протеїн Е.

Адгезія стрептококів (наприклад, до твердих поверхонь – зубної емалі) також здійснюється за рахунок капсули, утвореної гіалуроновою кислотою.

### **Адгезія й адгезини нейссерій**

У всіх представників роду *Neisseria* виявлені органи адгезії – фімбрії, для позначення яких у літературі дотепер застосовують терміни «пілі» чи «соматичні пілі», що є невірним. Нейссерії-комменсали за допомогою фімбрій прикріплюються до клітин лускатого епітелію, збудники гонореї і менінгіту колонізують тільки циліндричний епітелій: *N. meningitidis* – у задньому відділі носоглотки, *N. gonorrhoeae* – у ендоцервікальному і задньому відділі уретри. У музейних штамів *N. meningitidis* фімбрії виявляються досить рідко (у 5% клітин з усієї мікробної популяції) у кількості 2-3 фімбрії на клітину. Свіжо виділенні штами продукують фімбрії у великій кількості від 3 до 34.

На відміну від фімбрій I типу менінгококові фімбрії мають не пряму, а вигнуту форму. Взаємодія з еукаріотичними клітинами здійснюється за рахунок гідрофобних взаємодій і електростатичних сил.

На відміну від капсули стрептококів, що бере безпосередню участь в адгезії, капсула, утворена нейссеріями, до деякої міри екранує фімбрії, заважаючи здійсненню адгезивної функції. Однак здатність до прикріплення до поверхні лейкоцитів є характерною не тільки клітини з фімбріями, але й для клітин, позбавлених цих структур.

Цікаво відзначити, що нефімбриновані форми нейссерій швидше фагоцитуються поліморфноядерними лімфоцитами, ніж клітини, що мають фімбрії.

Вважається, що особисту участь в адгезії можуть брати білки зовнішньої мембрани і, можливо, ЛПС. У зовнішній мембрані гонококків виявлено близько 15 білків, однак велика частина їх міститься в незначній кількості і тільки 2-3 білка складають основну (75%) білкову масу. Участь саме можлива при взаємодії гонококків із клітинними поверхнями чутливих тканин.

## **ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ФУНКЦІЄЮ ЗАХИСТУ ВІД ІМУННИХ СИЛ МАКРООРГАНІЗМУ**

Основною структурою бактеріальної клітини, яку треба «замаскувати», або «кинути», щоб не викликати імунну відповідь в організмі хазяїна є пептидоглікан. Це зв'язано з тим, що саме пептидоглікан, що захищає цитоплазматичну мембрану клітини бактерій, є антигенною детермінантою – відмінною імунологічною мішенню, що присутня тільки в прокаріотичних клітинах і відсутня у еукаріот.

Спираючись на структурно-функціональний принцип адаптації бактерій, можна представити наступні механізми їх персистенції і захисту від імунних впливів макроорганізму:

- 1) фактори, що «екранують» клітинну стінку бактерій;
- 2) «антигенна мімікрія» – наявність загальних гетерогенних антигенів у системі «паразит – хазяїн»;
- 3) фактори бактеріальної природи, що секретуються і інактивують захисні механізми хазяїна;
- 4) утворення форм із відсутністю (дефектом) клітинної стінки бактерій (L-форми, мікоплазми).

### **Фактори, що екранують клітинну стінку бактерій**

Для більшості патогенних бактерій перебування в організмі хазяїна пов'язано зі здатністю протистояти такій захисній системі макроорганізму, як фагоцитоз. Доля збудника бактеріальної інфекції, нездатного перебороти фагоцитарний бар'єр, складається дуже однозначно: спостерігається завершений фагоцитоз, що супроводжується загибеллю мікроорганізму. Отже, наявність спеціальних пристосувань, що захищають від фагоцитозу, є неодмінною умовою для життєдіяльності патогенних бактерій *in vivo*.

Однією з особливостей факторів патогенності, що виконують функцію захисту збудника від фагоцитозу, є їх поверхнева локалізація. Субстанції, за допомогою яких хвороботворний мікроорганізм переборює фагоцитарний бар'єр, часто утворюють у бактеріальній клітині різні структури у виді капсули, мікрокапсули, слизу, поверхневих білків.

Ліганд-рецепторна взаємодія бактеріальних клітин з фагоцитами мало вивчена. Однак, для стрептококів, наприклад, показано, що в їх адгезії на фагоцитах бере участь ЛТК, тобто той же полімер, що обумовлює прикріплення стрептококів до епітеліальних клітин. У випадку кишкової палички зв'язування з фагоцитами інгибується залишками маннози. Аналогічний інгибуючий ефект спостерігається і при взаємодії *E. coli* з еритроцитами.

За хімічною природою група факторів патогенності, що виконують у збудника функцію захисту від фагоцитозу, дуже різноманітна. Тут зустрічаються пептиди, білки, полісахариди і полімери змішаної природи. Загальним для цих субстанцій є те, що вони утворюють високо полімерні структури, що так чи інакше зв'язані з тілом бактеріальної клітини.

Іншою особливістю біополімерів, що виконують функцію захисту від фагоцитозу й інших сил макроорганізму, є множинність модифікацій їх хімічної будови. Це стосується як сполук білкової природи (М-протеїн стрептококів), так й полісахаридів (капсульної речовини пневмококів) і

полімерів змішаної природи (ЛПС бактерій кишкової групи). При збереженні основної біологічної функції хімічна структура цих речовин може варіювати від штаму до штаму, особливо в області, що відповідає за антигенні властивості. Модифіковані форми біополімерів – носіїв антифагоцитарної функції, складають молекулярну основу серологічної неоднорідності багатьох видів бактерій.

Серед екранованих структур, за допомогою яких бактеріям вдається «камуфляж» пептидогліканового біополімера, можна вказати на поверхневі компоненти клітини, що здатні інгибувати специфічні сироватки: К-полісахаридні антигени *Escherichia coli*; гонококкові поверхневі рецептори, що блокують антитіла; О-антигени з полісахаридними бічними ланцюжками гладких форм грамнегативних бактерій. Описаний капсулярний матеріал, інгибуючий поглинання бактерій фагоцитами у сибіровиразкових бактерій, пневмококові і менінгококові полісахариди, протейн А у стафілококів і протейн М у стрептококів групи А. Відома захисна роль капсулярного пептидогліколіпіду – мікозида типу С у збудника лепри, що захищає бактерії від дії лізосомальних ферментів макрофагів. Бактеріальний ліпополісахарид у *Brucella abortus*, що знижує окисний «сплеск» у нейтрофілів, що захищає мікроорганізми від антибактеріальної дії катіонних пептидів лізосом нейтрофілов.

Найважливішим регулятором фагоцитарного процесу є система комплементу. З усіх компонентів цієї системи у впізнаванні беруть участь тільки С3-компонент і, зокрема, його функціонально активні фрагменти С3b чи С3d. Ці фрагменти виникають у результаті розщеплення нативної молекули С3-компонента або по класичному, або по альтернативному шляху активації комплементу. У класичному шляху індукуюча роль належить взаємодії антиген-антитіло, що і надає руху всьому каскаду перетворень комплементарної системи. Альтернативний шлях протікає без участі специфічних антитіл і починається з взаємодії компонентів пропердинової системи з пептидогліканом чи ЛПС бактеріальної клітини. Таким чином, зазначені біополімери, що здатні зв'язуватися з компонентом пропердинової системи, забезпечують фагоцитам впізнавання цієї клітини і наступний її фагоцитоз.

Виявлено роль О-специфічних бічних ланцюгів ліпополісахаридів як фактору стійкості до комплементу грамнегативних бактерій усіх груп. Ліпід А зв'язує С1-компонент комплементу.

Здатність бактеріальних поверхневих структур зв'язувати сироваткові білки, і зокрема імуноглобуліни, – універсальний прийом екранування грампозитивних мікроорганізмів при їх персистуванні. Відома здатність

стрептококів адсорбувати на себе фібриноген і  $\beta_2$ -мікроглобулін, гаптоглобулін, сироватковий альбумін. Стафілококи, стрептококи сорбують також Ig G за рахунок визначеного типу зв'язування – Fc-рецепції. Виявлення в цих мікроорганізмів додаткового капсулоподібного шару було визначено як імуноглобуліновий покрив, що представляє не тільки морфологічний прояв ефекту опсонізації бактерій, але і зміна їх гідратаційної поверхні. Екранування імуноглобуліновим покриттям стафілококів, що має значення для персистенції, було показано методом виявлення розходжень сорбційної здатності імуноглобулінової активності стафілококів і дозволило розробити на цій основі спосіб диференціальної діагностики «резидентних» і «транзиторних» штамів при виявленні стафілококкового бактеріоносійства.

Описані різного роду поверхневі протеїни, що екранують пептидоглікан бактерій і забезпечують штамам стійкість до дії сироватки крові в *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli*.

Більшість сполук, що виконують у бактеріальній клітині функцію захисту від фагоцитозу, мають високі антигенні властивості. На сьогоднішній день виключення складає лише поліпептид глютамінової кислоти збудника сибірської виразки. Слабкі антигенні властивості цього біополімера знаходяться в тісній залежності від його хімічної структури. У той же час приклад капсульного поліпептиду свідчить про відсутність прямого зв'язку між антигенними властивостями полімеру і його здатністю виконувати відповідну біологічну функцію.

Антитіла до факторів патогенності, що захищає збудника від фагоцитозу, являють собою основу захисного імунітету при цілому ряді інфекцій. Так, антитіла до капсульної речовини, вступаючи у взаємодію з бактеріальною клітиною, у якої капсула побудована з цієї речовини, позбавляють клітину гідрофільності і роблять її гідрофобною, тобто доступною до фагоцитозу. Іншими словами, під дією гомологічних антитіл полімер утрачає властивість, що лежить в основі його біологічної функції. Так це є у випадку інфекцій, викликаних пневмококами, *P. aeruginosa* і деякими видами бактерій кишкової групи.

### ***Капсульний поліпептид збудника сибірської виразки***

Капсульний поліпептид *B. anthracis* є одним з найбільш вивчених факторів патогенності з функцією захисту від фагоцитозу. Поліпептид являє собою основний структурний компонент капсули, наявність якої корелює з вірулентністю окремих штамів. За даними цитохімічного й електронно-мікроскопічного аналізу капсула *B. anthracis* має шарувату структуру. Її мембраноподібний зовнішній шар складається з поліпептиду і нейтральних

мукополісахаридів. У середньому шарі капсули виявлений комплекс, що складається з поліпептиду і полісахариду, внутрішній шар містить кислі мукополісахариди.

Капсульний поліпептид синтезується бактеріями як *in vivo*, так й *in vitro*. Необхідною умовою для утворення капсульного поліпептиду є лужне середовище і наявність CO<sub>2</sub>. Процес зборки капсульної структури стимулюється додаванням у живильне середовище Сульфуру і інгибується жирними кислотами, зокрема пальмітиноювою кислотою.

За хімічною природою капсульна речовина *B. anthracis* являє собою монотонний поліпептид D-глутамінової кислоти. Це єдиний дотепер відомий природний полімер, що складається винятково з амінокислоти D-ряду. Молекула пептиду має форму нерозгалуженої нитки, що дозволяє віднести його до лінійних полімерів. Молекулярна вага поліпептиду, встановлена методом аналізу кінцевих аміногруп, дорівнює 33500 ± 3800 Д.

Антигенні властивості поліпептиду D-глутамінової кислоти виражені надзвичайно слабо.

Капсульна речовина *B. anthracis* має високу антифагоцитарну активність. Можна говорити про двояку роль, що грає капсула в процесі «боротьби» *B. anthracis* із клітинами-фагоцитами. З одного боку, наявність капсульного поліпептиду перешкоджає поглинанню фагоцитами бацил сибірської виразки, з іншого боку – капсула сприяє фіксації (прикріпленню) капсульних форм бактерій до клітин макрофагальної системи.

### ***Протеїн А стафілококів***

Доля стафілококів в організмі значною мірою визначається поведінням їх у фагоцитозі. Ступінь завершеності фагоцитозу є навряд чи не вирішальним етапом, від якого залежить подальший розвиток стафілококкової інфекції. Дослідження останніх років показали, що стійкість стафілококів до внутрішньоклітинного переварювання фагоцитами не вдається зв'язати з їхньою здатністю продукувати коагулазу.

Стійкість стафілококів до фагоцитозу корелює з наявністю в них протеїну А, розташованому на зовнішній поверхні клітинної стінки, якому і надається важлива роль в антифагоцитарному ефекті. Показано, що штами, що містять велику кількість протеїну А, мають тенденцію до більшої резистентності, чим ті, у яких цей білок виявлений у меншій кількості чи не виявлений зовсім.

За даними електронно-мікроскопічного аналізу протеїн А знаходиться в самих зовнішніх шарах клітинної стінки стафілококів і рівномірно розподіляється по поверхні всієї клітини. Протеїн А ковалентне зв'язаний з мукопептидом клітинної стінки і може бути звільнений за допомогою

ферментів, що розщеплюють муреїн. Молекулярна вага протеїну А дорівнює 42 000 Д. У протеїні А виявлено 16 амінокислот. Переважають такі амінокислоти, як аспарагінова, глутамінова, лізин. Відсутній триптофан.

Білок А особливо активно синтезується в логарифмічній фазі росту при температурі 41 °С, термолабільний, не руйнується трипсином.

Протеїн А вступає в реакцію з імуноглобуліновою фракцією сироватки при відсутності в цій сироватці антитіл до протеїну А. Відмінною рисою протеїну А є спорідненість до сироваткових імуноглобулінів. Найбільше енергійно протеїн А взаємодіє з важкими ланцюгами імуноглобулінів і, зокрема, з Fc-фрагментом Ig G. Антигенні детермінанти протеїну А та ділянки, що визначають приєднання його до Fc-фрагмента Ig G, мають різну локалізацію. Як антиген, протеїн А взаємодіє з глобулінами не через Fc-область, а через Fab-фрагмент.

Головна функція Ig G полягає в їх опсонуючій дії. У людини ця функція особливо властива субкласам Ig G<sub>1</sub> і Ig G<sub>3</sub>. Опсонізуючі властивості імуноглобулінів обумовлені Fc-фрагментом його молекули. При впливі на бактеріальну клітину Fc-фрагмент підвищує гідрофобність її поверхні. Протеїн А стафілококів, що має спорідненість до цього фрагмента, після взаємодії з ним утрачає свою функцію гідрофільного агента і робить клітину чутливою до фагоцитозу.

Важливою властивістю протеїну А є пригнічення функції комплементзв'язуючої системи. Протеїн А інактивує комплемент сироватки людини, морської свинки, кролячої сироватки. Інактивація відбувається за рахунок утворення комплексу між протеїном і IgG, однак найбільш виражена фіксація комплементу спостерігається при надлишку імуноглобулінів.

Беручи до уваги те, що фагоцитоз бактерій залежить від активності C1, C2, C3, C4 компонентів комплементу, можна припустити, що на пригнічення саме їхньої активності і спрямована дія протеїну А. Протеїн А має здатність викликати реакцію гіперчутливості негайного чи уповільненого типу.

### ***М-протеїн і капсула стрептококів групи А***

М-протеїн стрептококів групи А був відкритий Ленсефілд у 1928 році.

Уведення мишам М-протеїну разом з культурою стрептококів значно збільшує їх вірулентність, при цьому спостерігається пригнічення функції захоплення мікробних клітин лейкоцитами.

М-протеїн, як бахрома, покриває поверхню клітинної стінки стрептококів, але, крім того, М-протеїн виявляється й у культуральній рідині, що вказує на здатність цього поверхово розташованого компонента мікробної

клітини стрептококів легко відокремлюватися і переходити в оточуюче середовище.

M-протеїн стрептококів групи А має виражені антигенні властивості. Антитіла до нього характеризуються типовою специфічністю, що покладено в основу серологічного типування стрептококів.

Перешкоджаючи опсонізуючій дії сироватки, M-протеїн захищає клітини стрептококів від переварювання фагоцитами. При з'єднанні з гомологічними антитілами M-протеїн утрачає здатність інгибувати процес опсонізації і тим самим позбавляється своєї антифагоцитарної функції.

Подібно протеїну А стафілококів, M-протеїн стрептококів групи А має у своїй структурі дві області, що розрізняються за функціональними властивостями. Одна область молекули забезпечує взаємодію M-протеїну з опсонінами, блокування яких приводить до придушення фагоцитозу, а інша область відповідальна за антигенні властивості M-протеїну.

Капсула стрептокока складається з гіалуронової кислоти, аналогічної тій, котра входить до складу тканини. Тому фагоцити не розпізнають стрептококи, що мають капсулу, як чужорідні антигени. Стрептококи, що не мають капсули вірулентними властивостями не володіють.

#### ***Антиген клітинної стінки (фракція F-1), V- і W-антигени Yersinia pestis***

У збудника чуми фактори патогенності, що забезпечують бактеріям захист від фагоцитозу, представлені антигеном клітинної стінки (фракція F-1) і, сполуками, позначеними як V- і W-антигени.

Фракція F-1 – капсульний глікопротеїд, що продукується клітинами як *in vivo*, так і *in vitro*. Найбільш інтенсивний біосинтез спостерігається при 37 °С. При більш низьких температурах фракція F-1, як поверхнева структура не виявляється, однак після руйнування клітин досить легко визначається. Фракція F-1 *Y. pestis* має виражені антигенні властивості, що і послужило підставою назвати її «антиген клітинної стінки».

Незалежно від того, виділена фракція F-1 від вірулентних чи авірулентних штамів *Y. pestis*, що належать до того чи іншого різновиду, серологічні властивості її ідентичні. Антиген клітинної стінки має видову специфічність.

Прийнято вважати, що антиген клітинної стінки *Y. pestis*, що має поверхневу локалізацію, бере участь у захисті бактерій від фагоцитозу. Дія антигену клітинної стінки, видимо, спрямована на пригнічення опсонічної функції сироватки. З'єднання з гомологічними антитілами позбавляє фракцію F-1 її антифагоцитарного ефекту. У досвідах *in vitro* показано, що додавання до бактеріальної культури високо очищеного препарату фракції F-1 приводить до

пригнічення процесу фагоцитозу *Y. pestis*. За сучасними уявленнями антифагоцитарна дія фракції F-1 знаходиться в тісному зв'язку з функцією таких субстанцій *Y. pestis*, як V- і W-антигени.

На відміну від фракції F-1, антигени V- і W (V-W чи Vi-антигени) продукуються *Y. pestis* тільки при температурі 37 °С. Усі відомі вірулентні штами *Y. pestis* містять ці антигени, причому якщо бактерія продукує антиген V, то вона обов'язково продукує і антиген W, тобто наявність цих сполук у вірулентних форм *Y. pestis*, видимо, є зчепленою ознакою. V-фракція білкової природи розташована в цитоплазмі, W-фракція – ліпопротеїн, що розташований у зовнішній мембрані. При культивуванні в рідкому живильному середовищі виявлення їх у культуральній рідині ускладнено. У той же час витяг їх з бактеріальної маси, отриманої в цих умовах, не представляє значних труднощів.

### Антигенна мімікрія

Антигенна мімікрія – інший тактичний прийом «маскування» для виживання бактерій в організмі, що дозволяє паразиту мирно співіснувати з хазяїном за рахунок наявності загальних антигенних чи детермінант їхніх фрагментів.

Описано антигенну тотожність ряду патогенних і умовно-патогенних бактерій з різними субстанціями і клітинами людини.

За рахунок перехресно реагуючих антигенів патогенам вдається протистояти антитіло залежним реакціям хазяїна і, отже, зберегти себе. Структурна гомологія білків, дуже далеких друг від друга видів, висока антигенна мінливість мікроорганізмів у процесі еволюції забезпечили «блокування» утворення антитіл до чужорідної біоінформації і порушили толерантність до власних антигенів хазяїна.

Розшифровується хімічна структура деяких загальних гетерогенних антигенів бактерій, як це зроблено в *E. coli* у відношенні антигенів O1, O4, O5. З'ясовуються біомолекулярні основи антигенної мімікрії, що дозволяють зрозуміти зміст тотожності між протеїнами, закодованими в бактерій, і власними протеїнами хазяїна. Описані гомології детермінант паразита і хазяїна при використанні молекулярно-мімікрічного підходу дають підставу думати, що персистивування збудника в організмі – платформа для індукції аутоімунних процесів.

Розглядаючи «антигенну мімікрію» як один з реальних механізмів бактеріальної персистенції не можна виключати, що це «ключ» до генетичних структур формування бактеріоносійства. Підтвердженням тому можуть служити дані про антиген спорідненні менингококків і еритроцитів людини групи А и В. Було відзначено, що серед захворілих генералізованою

менингококковою інфекцією і серед бактеріоносіїв менингококків частіше переважали особини з групою крові А (II).

Таким чином, наявність загальних гетерогенних структур у настільки далеко віддалених на еволюційних сходах видів, як бактерія і людина, імовірно, можна розглядати, з одного боку, як свідчення єдності живого світу, а з іншого боку – як «інструмент маскування», справжнього наслідування збудника хазяїну (середовище існування).

### **Фактори бактеріальної природи, що секретуються (антидефенсини)**

Відома захисна здатність мікроорганізмів виділяти сполуки різної природи, і зокрема трипсиноподібні ферменти, що розщеплюють імуноглобуліни підкласу А1. Ця група ферментів добре описана. Продукція цих ферментів бактеріями типова для патогенів, що інфікують слизові оболонки організму (*Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus*).

Описані протеази, що продукуються *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, які розщеплюють Ig G, дія яких виявилось неспецифічно, тому що ці позаклітинні протеази руйнували крім імуноглобулінів і інші гуморальні захисні протеїни хазяїна: лізоцим, фібрoneктин і навіть компоненти тканин, включаючи фібробласти.

Виділено і вивчена протеаза псевдомонад – еластаза, що розщеплює лізоцим на 3 фрагменти з втратою бактеріолітичної активності лізоциму, що може мати значення для внутрішньоклітинного виживання бактерій при хронічній інфекції або бактеріоносійстві.

Здатність бактерій специфічно інактивувати лізоцим хазяїна була визначена як їхній протилізоцимна активність і оцінена в персистенції мікроорганізмів. З'ясувалося, що ця ознака зустрічається у великій кількості видів мікроорганізмів з переважною наявністю в грамнегативних бактерій у 88 – 100% випадків.

Антилізоцимна активність виявлена для шигелл, сальмонелл, кишкових паличок, протеїв, йерсиній, гонококків, менингококків, пневмококків і закономірно – у стафілококків (особливо в носіїв цих штамів).

Експериментальним шляхом на тваринах, культурі тканини і методом популяційного аналізу було доведено, що антилізоцимну ознаку можна розглядати як маркер персистенції бактерій, здатних до внутрішньоклітинного паразитування. Була визначена генетична природа ознаки, що дозволила вивчити плазмидний профіль ДНК, що кодує антилізоцимну активність у клебсиелл, із Мм 60 МД.

Антилізоцимна ознака бактерій виявилась конститутивним, декретованим фактором, специфічно взаємодіючим з лізоцимом і інактивує його. Для

антилізоцимних факторів, виділених з *E. coli* 0-114 і *Klebsiella pneumoniae* 22-110, була визначена його хімічна природа – термостабільний аніонний білок із Мм 21000 Д, який інактивується трипсином.

Оцінюючи біологічну доцільність антилізоцимного фактора в бактерій, слід зазначити його не випадкова поява в мікроорганізмів, що, імовірно, зв'язано із широким колом хазяїнів, що розташовують лізоцимом як засобом захисту. Велике значення для селекції найбільш стійких клонів з високим рівнем антилізоцимної активності має середовище існування, включаючи фагоцитуючі клітини організму.

Значення не навантаження придбання цього фактора бактеріями – забезпечити себе додатковим механізмом виживання, «розчищаючи» еконішу в умовах внутрішньоклітинного паразитування. Роль антилізоцимного фактора бактерій, які паразитують у так званих «непрофесійних» фагоцитах, зростає ще більше і може мати істотне патогенне значення.

Здатність паразита ухилятися від зустрічі з професійними фагоцитами хазяїна загальновідома, але в цьому випадку бактерії намагаються проникнути в імунологічне слабо захищені клітки. Такий придатної для них мішенню служать різні епітеліальні устілки внутрішніх органів, захищені лише лізоцимом, де бактерії улаштовуються. Епітелій кишечника може містити шигели, епітеліальні клітини фалопієвої труби поглинають гонококкі, плацентарні клітини корів включають бруцелли, епітеліальні клітини нирок поглинають *Proteus mirabilis*, відзначене перебування псевдомонад в інтимі судин, де збудник добре захищений від імунних механізмів хазяїна. Доведено внутрішньоклітинне виживання стафілококів, менингококків в епітелії носоглотки хазяїна, що погодиться з наявністю в цих мікроорганізмів антилізоцимного фактора.

Приведені приклади повинні припускати одне – деградацію лізоциму епітелію хазяїна антилізоцимним фактором патогену, що і було доведено на моделі шигелльозного інфікування курячих ембріонів і мишей. Відзначено зворотну залежність між рівнем лізоциму кліток хазяїна і величиною антилізоцимної ознаки патогена.

До сполук, що секретуються та забезпечують персистування бактеріальної клітини, варто віднести і так звану анти-інтерферонову ознаку, що характеризує здатність бактерій інактивувати антибактеріальний фрагмент препарату людського лейкоцитарного інтерферону.

Анти-інтерферонна активність бактерій виявлена у великої групи патогенних і умовно-патогенних грамнегативних та грампозитивних мікроорганізмів. Частота зустрічаємості цієї ознаки бактерій знаходилася в залежності від джерела виділення мікроорганізму і мало корелювала з його

видовою приналежністю. Штами ентеробактерій, виділені від хворих, мали дану ознаку в 90,4 – 100% випадків, тоді як серед штамів, ізольованих від здорових і з зовнішнього середовища, цей показник відповідно був знижений до 16,1 і 1,6%.

При розшифровці біологічної ролі анти-інтерферонової ознаки бактерій на генетично родинній парі *Shigella flexneri* 2a (АИА+ АИА-) в умовах експериментальної кератокон'юнктивальної проби на мурчаках був відзначений більш тривалий плин патологічного процесу з формуванням бактеріоносійства у тварин, інфікованих шигеллами з цією ознакою в порівнянні з інфекцією, викликаної штамом без ознаки.

Анти-інтерферонова ознака – автономна властивість мікроорганізмів, призначена для цілеспрямованого, специфічного інактивування бактерицидної фракції людського лейкоцитарного інтерферону. Були проведені роботи з виділення бактерицидного фактора в електрофоретично гомогенному стані. Він представляв гистоноподібний термостабільний білок із Мм 11 000 – 11 500 Д, низьким коефіцієнтом екстинції при 280 нм (за методом Бредфорда) і мав високу антибактеріальну активність широкого спектра дії, у зв'язку з чим йому і була дана назва «Інтерцид». МБК Інтерцида для грампозитивних бактерій коливалася від 0,05 до 1 мкг/мол, для грамнегативних – 10 – 40 мкг/мол.

Крім Інтерцида бактеріальної деградації піддається і комплемент, що серед інших факторів природної резистентності організму підсилює силу і яскравість прояву захисних факторів хазяїна у відношенні патогена. Про здатність *Staphylococcus aureus* руйнувати комплемент відомо. Ця здатність до деградації комплементу виявилася можливою при наявності в *S. aureus* позаклітинної протеази.

Антикомплементарна активність виявлена у *Clostridium histolyticum*, *P. aeruginosa*, де бактеріальні клітини продукували протеолітичні ферменти, що руйнують білки системи комплементу. Описано антикомплементарну активність *E. coli* і *S. epidermidis*.

Розглядаючи роль екзоклітинних секретованих факторів, що забезпечують виживання патогенів в організмі хазяїна, слід зазначити роль бактеріальної каталази, що визначає стійкість до фагоцитозу нейтрофилами людини *S. aureus* і *N. gonorrhoeae*.

Оцінюючи фактичний матеріал щодо секретованих факторів як специфічної, так і неспецифічної природи, слід зазначити величезну розмаїття цих сполук – антидефенсинав, що сприяють інгибуванню клітинних і гуморальних факторів захисту організму. Цей дистанційний механізм бактеріального захисту пептидогликана сприяє виживанню (персистивуванню) патогенних і умовно-патогенних бактерій і, імовірно, не обмежується

описаними факторами деградації захисних механізмів хазяїна. Логічно очікувати «прорив» у накопиченні нових знань про маркери бактеріальної персистенції при експериментуванні з набором відомих лізосомальних ферментів еукариотичних клітин, інактивація яких, очевидно, – найважливіша перешкода в здійсненні фагоцитарного килінга мікроорганізмів.

### Утворення L-форм і микоплазм

Неможливість «замаскувати» чи захистити пептидоглікан бактеріальної клітини іноді приводить до того, що бактерії або частково, або цілком утрачають його разом із клітинною стінкою, утворити так названі L-форми. З погляду паразита – це біологічно виправданий крок, тому що збудник для організму хазяїна знову стає невпізнаний і персистенція його в середовищі існування продовжується.

Така здатність бактерій до існування з дефектами відсутністю клітинної стінки була описана ще в 1894 р. Н.Ф. Гамалією за назвою гетероморфізм.

У наступному явище L-трансформації бактерій було детально описане. Вивчення L-форм різних видів бактерій показало, що безстінкові мікроорганізми – це форма переживання виду в умовах існування, що змінилися. Пристосування бактерій до короткочасного переживання в змінених умовах сприяє появі форм незбалансованого росту, сферопластів, протопластів, що, по суті, є попередниками L- чи форм стабільних L-форм.

Як фактори індукції L-форм відзначають: фактори імунітету – комплемент, імуноглобуліни; ферменти – лізоцим, аутолізини, лізостафін; амінокислоти – гліцин, метіонін, аргінін, фенілаланин, лейцин і, нарешті, антибіотики, що діють на клітинну стінку (пеніцилін, цефалоспорин, бацитрацин, ванкомицин). Найбільш універсальними факторами при трансформації патогенів називають пеніцилін і лізоцим, для яких, як і для інших агентів, що трансформують, мішенню дії є пептидоглікан.

Як стабільні, так і нестабільні L-форми бактерій різних видів можуть довгостроково персистувати в організмі, уникаючи або пригнічуючи фактори захисту хазяїна.

На прикладі *E. coli* і *Streptococcus faecalis* показано, що L-форми цих мікроорганізмів фагоцитують гірше, ніж інтактні бактерії, тому що L-форми поведуться, як інертні частки за рахунок відсутності в них клітинної стінки (пептидоглікана), що і дозволяє їм навіть розмножуватися у фагоцитах і виділятися тривалий час. Вивчення ультраструктурних особливостей L-трансформації йерсиній при експериментальному псевдотуберкульозі виявило утворення мієліноподібних структур навколо протопластів і сферопластів

патогену, що зберігають життєздатність збудника в умовах незакінченого фагоцитозу.

Описано виділення сферопластів і нестабільних L-форм із сечі хворих із хронічної бактеріоуремією за відсутності бактерій у сечі. При бактеріальних посівах ниркового матеріалу від хворих із хронічним пієлонефритом були виділені L-форми гемолітичного стрептокока і плазмокоагулюючого стафілокока.

Описана персистенція L-форм стафілококів, стрептококів, нейссерій, ентеробактерій, клостридій, туберкульозних паличок, бруцелл, листерій і інших мікроорганізмів.

Зовсім очевидно, що своєрідне «бактеріальне роздягання» – змушена міра для паразита, що дозволяє звільнитися клітці від пептидоглікана і перейти в індиферентний стан, що не торкається її життєздатності, з метою збереження бактерій як виду в екологічній ніші.

### **Контрольні питання**

1. Фактори патогенності з адгезивною функцією.
2. Поняття про адгезію і колонізацію.
3. Біологічне розпізнання. Принцип комплементарності.
4. Ліганд-рецепторна взаємодія.
5. Природа і розташування сайтів впізнавання на клітинній стінці бактерій.
6. Природа і розташування сайтів впізнавання на мембрані і оболонках тваринних клітин.
7. Загальні особливості клітинних рецепторів.
8. Специфічність зв'язування.
9. Сили притягання і відштовхування.
10. Ван-дер-Ваальсові сили.
11. Електростатичні сили.
12. Водневі зв'язки.
13. Гідрофобні зв'язки.
14. Адгезини бактерій.
15. Виявлення бактеріальних адгезинів.
16. Фімбрії бактерій. Хімічний склад. Будова.
17. Морфологія і класифікація бактеріальних фімбрій.
18. Фімбрії грамнегативних бактерій.
19. Фімбрії грампозитивних бактерій.
20. Функціональні властивості фімбрій.
21. Фібрили, білки клітинної поверхні, антигени бактерій як адгезини.
22. Капсули бактерій. Хімічний склад. Значення у прикріпленні.

23. Адгезія і адгезини кишкової палички.
24. Адгезія ентеротоксигенних штамів.
25. Взаємодія *E. coli* із клітинами кишкового епітелію.
26. Адгезія сечопатогених штамів *E. coli*.
27. Адгезія та адгезини стрептококів.
28. Адгезія та адгезини вібріонів. Адгезини холерного вібріону.
29. Адгезія та адгезини нейсерій.

### **ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ІНВАЗИВНОЮ ФУНКЦІЄЮ**

Для того, щоб проникнути в макроорганізм, патогенні мікроорганізми повинні перебороти його слизові оболонки, шкірні покриви й інші тканинні бар'єри. В основі проходження крізь тканини лежить молекулярна взаємодія ферментних систем збудника з речовинами, з яких побудовані тканинні структури макроорганізму.

Патогенні бактерії продукують ферменти, здатні деполімеризувати основні речовини тканин, збільшуючи їхню проникність і сприяючи проникненню і поширенню збудника. Фактори інвазії звичайно сполучені з факторами, що пригнічують клітинну активність і сприяють внутрішньоклітинному розмноженню бактерій. Фактори інвазії грамнегативних бактерій звичайно представлені білками зовнішньої мембрани.

Під інвазивністю (лат. *invasio* – вторгнення) розуміють здатність збудників переборювати захисні бар'єри організму, розмножуватися, проникати в його клітини і розмножуватися в них.

Інвазивність мікроорганізмів коливається в дуже широких межах. На одному кінці цієї шкали знаходяться активні продуценти токсинів, наприклад, збудники правця дифтерії. Продуценти токсинів патогенні головним чином внаслідок утворення отруйних хімічних речовин при відсутності вираженої інвазії в тканини. На іншому кінці шкали – високоінвазивні мікроорганізми (збудники сибірської виразки або чуми), у середині – стафілококи і стрептококи.

Інвазивність не має явного зв'язку з токсигенністю. У ряді випадків інвазивність мікроорганізмів може бути зв'язана з наявністю визначених поверхневих компонентів, що захищають бактерії від фагоцитозу і руйнування. Такими поверхневими речовинами можуть бути полісахаридні чи капсули, які складаються з гіалуронової кислоти, а також поверхневий білок М ( $\beta$ -гемолітичні стрептококи) чи поверхневі поліпептиди (збудник сибірської виразки).

Деякі мікроорганізми можуть бути інвазивними і вірулентними завдяки їх здатності зберігати життєздатність усередині фагоцитів і протистояти дії ферментів.

Хоча всі перераховані фактори в якомусь ступені визначають інвазивність мікроорганізмів, необхідно підкреслити, що вона є вираженням сукупності спадкоємних біохімічних властивостей бактерій – великої групи ферментів «агресії і захисту», що руйнують поверхневі структури макроорганізму.

Основні речовини слизуватої макроорганізму – мукополісахариди, являють собою складні високомолекулярні сполуки, звичайно побудовані з гексозамінів, гексуронових кислот і різних гексоз. Мукополісахаридами багаті сполучні тканини тварин і людини: вони входять до складу міжтканинної і міжклітинної речовини. З найбільш відомих мукополісахаридів можна назвати гіалуронову кислоту і гепарини.

До складу слизуватих секретів, тканин і біологічних рідин входять також глікопротеїни, багаті N-ацетилнейраміновою кислотою (сіалові кислоти). У вільному і зв'язаному стані сіалові кислоти присутні у спинномозковій рідині, слизуватій оболонці шлунка і щитовидній залозі. У великій кількості сіалові кислоти містяться в муцинах підщелепної залози різних видів тварин, у глікопротеїнах шкіри, у кислому глікопротеїні сироватки крові, гангліозидах.

Сіалові кислоти визначають в'язкість біологічних рідин, поверхневий заряд клітин, беруть участь у міжклітинних контактах, у процесах рецепції і біологічного розпізнавання. Клітина, позбавлена цих поверхневих рецепторів, не здатна взаємодіяти з вірусами, токсинами бактерій, що перешкоджає інактивації мікроорганізмів і токсинів.

Інвазивні властивості мікроорганізмів залежать від їхньої здатності проникати в епітеліальні, лімфоїдні й інші клітини макроорганізму, де звичайно відбувається їхнє розмноження. Так, гонококки, менингококки, туберкульозні й інші бактерії фагоцитуються лейкоцитами і розмножуються в них. Інвазивні властивості мікроорганізмів зв'язані з їхньою здатністю продукувати такі ферменти, як гіалуронидаза і нейрамінідаза й ін., що підвищують проникність сполучної й іншої тканин, сприяючи тим самим поширенню збудника в організмі.

Вироблені клітинами мікроорганізмів ферменти мають антигенні властивості. Однак, ферменти, подібні за характером каталітичної дії, але з різним таксономічним походженням, не ідентичні в антигенному відношенні. Показано, що антисироватка до гіалуронидази пневмококів пригнічує каталітичну активність ферменту гомологічної культури, але виявляється

нездатної інгібувати аналогічну каталітичну активність бактерій роду *Clostridium*.

Подібну антигенну неідентичність виявлено при вивченні ферментів нейраминидази, лецитинази й інших ферментів. Розходження в антигенній специфічності ферментів на тлі спільності каталітичної дії дозволяють припустити, що область активного центра і ділянки молекули, у яких розташовані антигенні детермінанти ферментів, мають різну локалізацію.

Встановлено, що характер взаємодії в системі фермент – субстрат – антитіло залежить від величини молекулярної ваги субстрату, на який діє фермент. При дії ферменту на субстрат з невеликою молекулярною вагою його каталітичну активність можна інгібувати гомологічними антитілами тільки частково. У той же час, коли фермент каталізує розщеплення крупномолекулярного субстрату, відбувається повне чи майже повне пригнічення активності ферменту.

## **Характеристика деяких ферментів, що беруть участь в інвазії мікроорганізмів**

### **Гіалуронидаза**

У 1939-1940 р. Чейн і Дьюти показали, що екстракти насінників знижують в'язкість синовіальної рідини і викликають появу в розчині вільного N-ацетилглюкозамина і глюкуронової кислоти, тобто здійснюють ензиматичне розщеплення гіалуронової кислоти. Так було доведено, що з каталітичною активністю гіалуронидази зв'язане явище біологічної дифузії.

Субстратом для гіалуронидази служить гіалуронова кислота, що входить до складу сполучної тканини і багатьох інших тканин і клітин макроорганізму. Гіалуронова кислота є високо полімерною сполукою, що складається з еквівалентних частин N-ацетилглюкозамина і глюкуронової кислоти.

В організмі людини і тварин роль гіалуронової кислоти, як і інших кислих мукополісахаридів, зводиться до виконання цілого ряду функцій, серед яких найбільш важливі наступні: утримання води; зв'язування катіонів; регулювання дифузії; змазування тертьових поверхонь; участь у процесах фібриногенеза; регулювання дії ферментів (можливо).

Каталітичний розпад гіалуронової кислоти під дією ферменту відбувається поступово. У результаті ферментативного гідролізу спочатку відбувається деполімеризація гіалуронової кислоти до великих фрагментів, потім – подальший гідроліз фрагментів, що утворилися, до звільнення ацетилглюкозамина і глюкуронової кислоти. Під дією деяких бактеріальних

гіалуронидаз гіалуронова кислота може гідролізуватися відразу до ненасичених дисахаридів. Бактеріальні гіалуронидази діють на зв'язок між Оксигеном і четвертим атомом Карбону глюкуронової кислоти.

Біосинтез гіалуронидази патогенними бактеріями носить індуктивний характер і відбувається за типом зворотного зв'язку: фермент розщеплює гіалуронову кислоту, що потім стимулює синтез ферменту.

У пневмококів і гемолітичного стрептокока основна частина гіалуронидази знаходиться в клітинах, у збудника газової гангрені – виявляється як у клітинах, так і в культуральній рідині при вирощуванні рідкої культури.

### ***Гіалуронидаза C. perfringens***

Гіалуронидаза *C. perfringens* вивчена у виді високо очищеного гомогенного препарату. По хімічній природі – це білок з константою седиментації 5,25S. У складі її встановлена присутність значних кількостей глютамінової і аспарагінової кислот, лізіна, серина, аланіна, лейцину і ізолейцину. Гистидин, пролін, валін, тирозин і фенілаланін знайдено в незначних кількостях, а метіонін практично відсутній.

Гіалуронидазу *C. perfringens* відносять до групи тіолових ферментів.

Фермент є чутливим до дії температури, різке зниження каталітичної активності спостерігається при 60-65 °С, при 100 °С – цілком інактивується. Працює в широкому діапазоні рН – 4,0-11,0. Оптимум рН для прояву каталітичної активності залежить від концентрації солі – оптимальної є 1 ‰ цитратно-фосфатного буфера, рН 7,0. Більш високі концентрації інгібують в'язкість гіалуронидази *C. perfringens*.

Очищені препарати гіалуронидази *C. perfringens* втрачають свою активність під дією ультрафіолетового і рентгенівського опромінення, чуттєві до дії 0,4 ‰ розчину формаліну. Каталітична активність гіалуронидази *C. perfringens* так само, як пневмококової гіалуронидази, інгібуються 0,1N розчином йоду. За даними ряду авторів, інгібітором каталітичної активності є нормальна кроляча сироватка. Фермент не інактивується молекулярним киснем, але цілком утрачає свою активність при впливі  $\text{KMnO}_4$ .

### ***Гіалуронидаза стрептококів***

По високому вмісті дикарбонових кислот гіалуронидаза стрептококів схожа на гіалуронидазу *C. perfringens*. Стрептококова гіалуронидаза існує в декількох молекулярних формах, кожна з яких розрізняється між собою не тільки молекулярними параметрами, але і електрофоретичною рухливістю.

Інактивується під дією високої температури. Гіалуронидаза стрептококів груп А і С швидко інактивується при рН 4,6. Оптимум рН каталітичної дії лежить у нейтральній зоні.

### **Нейрамінідаза**

Вперше фермент нейрамінідаза був виявлений у вірусу грипу, а пізніше (1950-1969 рр.) в інших представників міксовірусів: вірусу хвороби Ньюкасла, вірусів парагрипа, вірусу класичної чуми птахів і вірусу кору. Однак, вірусні нейрамінідази відрізняються від бактеріальних за своїми фізико-хімічними властивостями і видоспецифічністю.

Крім вірусів у даний час відомий цілий ряд інших мікроорганізмів, що продукують фермент нейрамінідазу. Нейрамінідаза виявлена також у тканинах і органах тварин (у нирках, печінці, селезінці, мозку, легенях і насінниках кроликів, пацюків і морських свинок), у слині людини й у курячих ембріонах. Багаті за нейрамінідазою деякі мембрани, мітохондрії і лізосоми.

Відповідно до рекомендації Комісії з ферментів Міжнародного біохімічного суспільства, нейрамінідаза характеризується як сіалідаза чи мукополисахарид – N-ацетилнейрамінілгідролаза і є ферментом, що безпосередньо впливає на мембрани клітин, вибірково відщеплюючи від різних глікокон'югатів (глікопротеїдів, гліколипідів, полісахаридів) сіалові (нейрамінові) кислоти, що знаходяться в термінальному положенні і зв'язані з вуглеводним компонентом глікозидним зв'язком, підвищуючи тим самим проникність різних тканин. Клітина, позбавлена цих поверхневих рецепторів, не здатна взаємодіяти з вірусами, токсинами бактерій, що перешкоджає інактивації мікроорганізмів і їхніх токсинів.

Утворюють нейрамінідазу як патогенні бактерії (холерний вібріон, стрептококи, коринебактерії, псевдомонади, клостридії й ін.), так і представники нормальної мікробиоти тіла людини (бактероїди, фузобактерії, непатогенні діфтероїди, лактобацили).

Нейрамінідаза продукується бактеріями в навколишнє середовище, але може зберігатися в їхніх клітинах. Вона в основному виявлена в бактерій, що розмножуються на поверхні епітелію.

### ***Нейрамінідаза холерного вібріона***

Нейрамінідаза холерного вібріона є важливим чинником вірулентності цього мікроба. Механізм дії нейрамінідази складається в розщепленні сіалових кислот у складі глікопротеїдів глікокаликса тонкої кишки й оголених гангліозидів, що є рецепторами адгезії холерного вібріона. Нейрамінідазу

продукують як вірулентні штами *V. cholerae*, так і невірулентні, щодо 1 і 11 груп Хейберга.

Нейрамінідаза холерного вібриона в чистому виді має здатність утворювати кристали голкоподібної форми, що довгостроково зберігають біологічну активність, що добре розчиняються у воді. Фермент має позитивний заряд і молекулярну масу 90 000. Максимальна активність холерної нейрамінідази виявляється при рН 4,9. Введення в середовище іонів  $\text{Ca}^{2+}$  приводить до зсуву оптимуму рН до 5,6. Іони кальцію активують і стабілізують холерну нейрамінідазу.

Вважається, що в підтримці активного стану нейрамінідази істотна роль належить водневим зв'язкам, хоча конфірмаційні особливості ферменту недостатньо вивчені.

Дія ЕДТА різко знижує активність нейрамінідази. Сильним інгибуючим впливом володіють також такі фізіологічно важливі аніони, як цитрат, оксалат, фосфат і тартрат. У водяних розчинах у край хитлива: при 0-4 °С при збереженні 6 днів активність ферменту різко знижується. При 37 °С в кислій зоні рН фермент інактивується.

### ***Нейрамінідаза C. diphtheriae***

Нейрамінідаза *C. diphtheriae* локалізується як усередині бактеріальної клітини (2/3 нейрамінідазної активності), де фермент локалізується в основному в цитоплазматичній мембрані, так і в культуральній рідині (1/3). Вироблення ферменту *C. diphtheriae* залежить від змісту заліза в середовищі: до збільшення виходу нейрамінідази в 9 разів приводить збільшення змісту цього катіону. Це термолабільний білок, молекулярна вага якого дотепер точно не встановлена. Найменшу молекулярну вагу (34 000) має нейрамінідаза, виділена з нетоксигеного штаму, і найбільшим (100 000) – з токсигенної культури *C. diphtheriae*.

Природними субстратами для нейрамінідази *C. diphtheriae* можуть служити глікопротеїни сироватки крові людини і тварин.

### ***Нейрамінідаза C. perfringens***

Нейрамінідаза *C. perfringens* виявляється як у культуральній рідині, так і в бактеріальній клітині. Однак ці два види нейрамінідаз розрізняються за властивостями: позаклітинна нейрамінідаза термолабільна і має строго визначене рН дії (5,0-5,5), на відміну від внутрішньоклітинної, котра термостабільна і виявляє свою активність у широкому діапазоні рН (5,0-9,0). Активність ферменту зв'язаного з клітиною, лише частково пригнічується

антитілами гомологічної антитоксичної сироватки, позаклітинна нейрамінідаза в цих умовах інактивується цілком. Молекулярна вага обох нейрамінідаз подібна і складає 56 000.

Позаклітинна нейрамінідаза швидко утрачає свою активність у водному розчині і довгостроково зберігається у висушеному стані. Внутрішньоклітинна втрачає 50 % своєї активності при нагріванні до 60 °С впродовж години.

Нейрамінідази не чуттєві до дії ЕДТА, на відміну від нейрамінідаз холерного вібріона. Однак при дії 1 % розчину формальдегіду пригнічення активності спостерігається на 50 %.

### ***Нейрамінідаза стрептококів***

Стрептококи утворюють 2 види нейрамінідаз – всередині і поза клітиною. Продукування ферменту зростає в 5 разів, якщо культивування мікроорганізмів проводиться в анаеробних умовах. Молекулярна вага дорівнює 110 000 Дальтон. Слабко активується іонами кальцію. Сильний інгибуючий ефект роблять іони важких металів.

Поряд з нейрамінідазою у стрептококів виявлені сіалідазоподібні ферменти, що розщеплюють сіаломукоїд, виділений з підщелепної залози бика.

### **Колагеназа**

Колагеназа – протеолітичний фермент, що викликає інтенсивне руйнування тканинних білків, колагенових структур, що веде до розплавлювання м'язової тканини і сприяє поширенню бактерій у тканинах. Продукується збудниками спорових анаеробних інфекцій, зокрема *S. perfringens*.

### **Лецитиназа**

Лецитинази або фосфоліпази виробляються збудниками спорових анаеробних інфекцій, стафілококами й іншими мікроорганізмами. Лецитиназа викликає гідроліз лецитина й інших фосфогліцеридів, що входять до складу клітинних і мітохондріальних мембран, що приводить до порушення їхньої проникності.

Крім цього, продукти гідролізу лецитинів роблять токсичну дію на організм людини і тварин.

### **Фібринолізин**

Фібринолізин стрептокіназа утвориться багатьма гемолітичними стрептококами, стафілококами, *Yersinia pestis*. Стрептокіназа активізує

протеолітичний фермент плазми (плазміноген (плазмін)). Фермент розчиняє згустки фібрину, що утворюються при запаленні, що перешкоджають поширенню бактерій в організмі, тим самим полегшує процеси інвазії.

### **Коагулаза**

Коагулаза виробляється багатьма патогенним стафілококами. Фермент коагулює плазму крові. Це сприяє утворенню навколо стафілококкових поразок фібринових бар'єрів, що сприяють тривалому збереженню мікроорганізмів у тканинах. Крім того, відкладення під впливом коагулази фібрину на поверхні клітин стафілококів утрудняє їхній фагоцитоз і лізис.

### ***Інвазія бактерій роду *Shigella****

У шигелл ідентифіковано кілька генів, необхідних для інвазії в тканинній культурі. Ці гени локалізовані на великій плазмиді. Первісна фіксація шигелл на поверхні клітин викликає ущільнення ниток актину й акумуляцію міозину біля ділянки бактеріального прикріплення. Утворення мікрониток дозволяє сформуватися псевдоподіям, що потім поглинають бактерії і формують фагоцитарний пухирець. Для інвазії бактерій у клітини потрібно наявність на з поверхні протеїнів В і С, синтез яких кодується спеціальними генами. Лізуюча здатність протеїна В підсилюється при зниженні рН, падіння рН від 7 до 5,5 у фагоцитарної вакуолі, імовірно, є пусковим моментом для початку лізису мембрани фагосоми, у результаті чого відбувається вислизнення бактерій з вакуолі в цитоплазму, де клітини починають розмножуватися, причому цикл реплікації настає кожні 40 хвилин. Коли бактерії розмножуються, нитки актину з цитоплазми формують «хвіст» на одному кінці бактеріальної клітини і відіграють роль пропелера при виході бактерій через клітину на шляху інфікування до іншої клітини. Було показано, що шигелли виділяють спеціальний протеїн зовнішньої мембрани (Мм 95 Кд), що сприяє міжклітинному поширенню і, можливо, лізує обидві мембрани. У дослідженнях на мавпах встановлено, що вхідними воротами для шигелл є М-клітини слизуватої оболонки товстої кишки. Ці клітини є спеціалізованими епітеліальними клітинами, що функціонують як антиген-презентуючі клітини підлягаючої лимфоїдної тканини. М-клітини слизуватої кишечника є природними фагоцитами; бактерій, що виявлялись усередині цих клітин, виходить через їхню нижню поверхню, входять у ентероцити крізь базолатеральні рецептори, і після цього вони поширюються міжклітинне, тобто від клітини до клітини.

Після інвазії шигелл настає загибель клітини, механізм якої неясний. Передбачається, що це може бути зв'язане з виснаженням цитоплазматичних субстратів за рахунок розмноження чи бактерій зі зменшенням рівня АТФ у

клітині макроорганізму, що, відповідно, супроводжується підйомом рівня пірувата. *S. dysenteriae* екзотоксин, що володіє термолабільністю, вираженим тропізмом до клітин нервової системи і слизуватій оболонці кишечника. Інші види шигелл токсинів не утворюють, але містять речовини глюцидо-ліпідно-протеїнової природи – ендотоксини. Екзотоксин *S. dysenteriae* (токсин Шига) є В токсином, що звільняється при лізисі клітки. Структура токсину Шига дуже схожа на структуру холерного токсину. На відміну від інших В токсинів, токсин Шига не АДФ-риболізує G-протеїн у клітині макроорганізму, токсин розщеплює зв'язок аденозинового радикала в 28S рибосомної РНК (рРНК), у результаті чого відбувається порушення синтезу білка, при цьому токсин не діє на бактеріальні рибосоми.

Токсин Шига є найбільш ймовірною причиною гемолітичного уремічного синдрому – потенційно фатальної форми ниркової недостатності, що може розвинути в дітей незабаром після інфікування *S. dysenteriae*. Інші бактерії роблять токсини, що можуть бути нейтралізовані антитілами до токсину Шига, і тому називаються Шига-подібними токсинами. Більшість з цих токсинів мають амінокислотні послідовності, відмінні від токсину Шига, і не викликають гемолітичного уремічного синдрому.

### Контрольні питання

1. Фактори патогенності з інвазивною функцією. Поняття про інвазію мікроорганізмів.
2. Розподіл мікроорганізмів за ступенем їх інвазивності. Низько-, середньо- і високоінвазивні види.
3. Біологічно активні речовини, які вироблюються мікроорганізмами.
4. Ферменти інвазії, що продукують мікроорганізми.
5. Субстрати дії ферментів.
6. Гіалуронідаза і її дія. Мікроорганізми, що продукують гіалуронідазу.
7. Нейрамінідази (сіалідази) і їхня дія. Мікроорганізми, що продукують нейрамінідазу.
8. Нейрамінідази вірусів (орто- і параміксовіруси).
9. Колагеназа і субстрати її дії. Колагеназа *C. perfringens*.
10. Лецитінази (фосфоліпази).
11. Фібринолізин (стрептокіназа).
12. Коагулаза.
13. Гемолізени та лейкоцидіни і субстрати їхньої дії.
14. Специфічні інвазини на прикладі лістериолізіна.
15. Ундулююча мембрана.

## ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ З ТОКСИЧНОЮ ФУНКЦІЄЮ

### Природа токсинів

Фактори патогенності з адгезивною, інвазивною і антифагоцитарною функціями відіграють роль у початкових етапах розвитку інфекції. Вироблення цих факторів і їхній вплив на клітини і тканини є пусковим моментом у виникненні інфекційного процесу.

Подальший же розвиток процесу, формування специфічних патологічних поразок при багатьох інфекціях визначається переважно групою факторів з токсической функцією. Вважається, що токсигенность – здатність виробляти токсические речовини – є більш пізнім еволюційним придбанням патогенних мікроорганізмів у порівнянні з агресивними факторами.

Пошуки бактеріальних токсинів почалися незабаром після відкриття ролі бактерій у виникненні хвороб людини. До 1890 р. були виявлені токсини двох важливих патогенних для людини мікроорганізмів – *C. diphtheriae* і *C. tetani*. В обох випадках були поставлені однакові досліди: бактерії вирощували в культуральному середовищі *in vitro* і стерильний фільтрат, приготовлений з культури, вводили тварині. Тварини гинули, а при їхньому розтині виявлялися симптоми, характерні для відповідної природної інфекції. Токсичні речовини виявилися чутливими до нагрівання, і, як з'ясувалося пізніше, були білками. Оскільки вони були присутні в середовищі і не були зв'язані з бактеріальними клітинами, їх назвали екзотоксинами. Згодом за допомогою подібних методів було показано, що екзотоксини, що роблять специфічну дію на організм, утворюються і поруч інших патогенних бактерій, їхня роль у виникненні відповідних хвороб була чітко встановлена. Однак фільтрати, приготовлені з культур багатьох патогенних мікроорганізмів, не були токсичними. Це змусило вчених почати дослідження бактеріальних клітин, вбитих нагріванням, з метою з'ясування, чи не є вони джерелами токсичних агентів. Такі експерименти показали, що клітки майже всіх грамотрицательных патогенних бактерій токсичні самі по собі; більш того, таке ж токсическое дію роблять і убиті нагріванням клітки багатьох непатогенних грамотрицательных бактерій. Стійкі до нагрівання токсини, зв'язані з клітинами грамнегативних бактерій, були названі ендотоксинами. Ендотоксини відносно неспецифічні, при введенні експериментальною твариною вони усі викликають багато в чому подібні клінічні чи патологічні симптоми. Вивчення їхньої структури і локалізації в клітині зажадало багатьох літ інтенсивних досліджень, у даний час відомо, що ендотоксини – це комплекси ліпополісахаридів з білками, що знаходяться в зовнішніх шарах клітинних стінок грамнегативних бактерій.

Терміни «екзотоксини» і «ендотоксини», якими називають ці два класи токсичних речовин можуть ввести в оману, тому що наявні в даний час дані, показують, що багато «екзотоксинів» зв'язані з бактеріальними клітинами під час їхнього росту і вивільняються тільки після загибелі і лізису бактерій.

Численними матеріалами показано, що локалізація токсичних сполук як у клітині, так і поза нею – це усього лише питання умов, у яких секретуються токсини бактеріальною клітиною. Класичний правцевий екзотоксин виявляється й у культуральній рідині, і в мікробних клітинах, причому за певних умов більше його міститься в клітинах. Подібно цьому, у дев'ять разів більше ботулінічного токсину можна виділити з молодих клітин *S. botulinum*, ніж з навколишньої позаклітинної середовища. Ендотоксини деяких грамнегативних бактерій виділяється в навколишнє середовище не тільки під час чи лізису дезінтеграції мікробних клітин, але й у процесі росту культури у виді так званих міхурів, що відбруньковується від поверхні клітинної стінки. Нарешті, у трохи відособлену групу входять такі токсини, як мишачий токсин *Yersinia pestis* і летальний токсин *B. cereus*. Біосинтез цих токсинів у клітині здійснюється на клітинній мембрані, тому віднести їх, суворо говорячи, до екзо- чи ендотоксинів дуже важко.

Усе це разом узятє свідчить про те, що розподіл токсинів на позаклітинні і внутрішньоклітинні дуже умовно й у свій час виникло через відсутність інших характерних ознак, що дозволяють диференціювати субстанції патогенних бактерій, що володіють токсическим дією.

Однак екзотоксини можна відрізнити від ендотоксинів за хімічною структурою. Перші є простими білками, другі – молекулярними комплексами, що містять білок, ліпід і полісахарид.

Функція, що виконує токсин, неясна: багато нетоксигенних штамів розмножуються в організмі хазяїна також успішно, як і відповідні токсигенні штами. Гени, що визначають синтез бактеріальних екзотоксинів, у багатьох випадках локалізовані в плазмидах чи профагах, що несе бактерія, а не в бактеріальній хромосомі.

На синтез деяких бактеріальних екзотоксинов сильно впливає концентрація різних іонів металів у середовищі. Наприклад, утворення дифтерійного, правцевого і деяких інших токсинів придушується іонами заліза у високих концентраціях, а для утворення  $\alpha$ -токсину необхідні іони цинку. Механізм цього явища невідомий; висловлювалося предпорложение, що гени токсинів входять до складу оперонов. У такому випадку залізо і цинк можуть впливати на синтез токсинів шляхом зв'язування з продуктами регуляторних генів, репресорами чи активаторами. Гіпотези такого роду можна прямо перевірити, тому що в даний час удається синтезувати, наприклад, дифтерійний

токсин у безклітинної белоксинтезуючої системі, програмувальної ДНК токсигенного фага.

Екзотоксини продукують як грампозитивні, так і грамнегативні бактерії. У грампозитивних бактерій екзотоксини активно секретуються через цитоплазматичну мембрану і клітинну стінку в навколишнє середовище з використанням спеціальних секретуючих систем. У грамнегативних бактерій (сальмонелли, холерний вібріон, токсигенні кишкові палички) деякі екзотоксини (ентеротоксини) синтезуються тільки за певних умов безпосередньо в інфікованому організмі і нерідко зберігаються в цитоплазмі, звільняючись із клітини тільки після її руйнування.

### **Основні властивості екзотоксинів**

Усі відомі бактеріальні екзотоксини – *білки*.

Хімічною природою екзотоксинів обумовлюється їхня мала стійкість до факторів зовнішнього середовища, зокрема до підвищеної температури. Більшість екзотоксинів (дифтерійний, правцевий і ін.) *термолабільні*, руйнуються при 60 °С впродовж 20-60 хвилин. Виключення складають ботулінічний токсин, ентеротоксини стафілокока, кишкової палички, що витримують кип'ятіння впродовж декількох хвилин. Ці токсини не руйнуються впродовж декількох хвилин. Ці токсини не руйнуються під дією травних ферментів і при пероральному уведенні викликають отруєння організму.

Відмінною рисою більшості екзотоксинов є виражена *органотропність*, що виявляється у виборчій паразиті визначених органів і тканин.

*Висока специфічність дії* екзотоксинів обумовлює характерну клінічну картину захворювання. В основі патогенетического дії токсинів лежить їхня здатність руйнувати визначені клітинні чи структури порушувати визначені клітинні функції (табл. 2). Наприклад, при влученні в рану *Clostridium tetani*, токсин поширюється по периферичних рухових нервах до центральної нервової системи, де зв'язується з поверхневими рецепторами нейронів і пригнічує нормальне синаптичне гальмування. По-іншому діє на нервову систему токсин *C. botulinum*. Він пригнічує виділення ацетилхоліну в нервово-м'язовому синапсі, блокуючи передачу нервового імпульсу на м'язове волокно.

Зв'язування токсину з клітинним рецептором специфічно. За допомогою імунодифузних методів показано, що холерний токсин реагує з високоочищеним гангліозидом Gm1, що є рецептором для цього токсину, утворити в агаровому гелі чітку лінію преципітації (аналогічно як при взаємодії антигену й антитілу), і не вступає в реакцію з іншими гангліозидами.

Однак у багатьох випадках ушкодження являє собою вторинну, неспецифічну реакцію хазяїна на первинну дію токсину. Розглянемо наступний

приклад. Вихід іонів і води з тканин регулюється епітеліальними клітинами кишечника. Ця регуляція може бути порушена безліччю різних агентів зокрема токсином, виділюваною холерним вібрионом, що викликає дуже сильну і часто приводить до летального результату втрату рідини. У такий спосіб утрата рідини – неспецифічна реакція хазяїна на зв'язування токсину холерного вібриона клітинами кишкового епітелію.

Таблиця 2

### Органотропність і механізм дії деяких токсинів

Мікроорганізм	Екзотоксин	Мішень	Механізм дії
<i>Clostridium botulinum</i>	нейротоксин	Нервово-м'язовий синапс	Пригнічує виділення ацетилхоліну
<i>Clostridium tetani</i>	-“-	Центральна нервова система	Пригнічує синаптичне гальмування
<i>Clostridium perfringens</i>	α-токсин	Будь-яка тканина в місці поразки	Лецитиназна активність (приводить до лізису клітин)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	дифтерійний токсин	Будь-яка тканина (поширюється по всьому організмі)	Пригнічує синтез білка
<i>Staphylococcus aureus</i>	α-токсин	Будь-яка тканина	Приводить до лізису клітин
	«ентеротоксин»	Нервові клітини	Невідомий
<i>Shigella dysenteriae</i>	ентеротоксин	Епітелій кишечника	Порушує регуляцію переносу електролітів
<i>Vibrio cholerae</i>	-“-	Те ж	Те ж
<i>Yersinia pestis</i>	мишачий	Будь-яка тканина	Невідомий

Інша неспецифічна реакція тканин хазяїна на зараження – запалення, що являє собою складну послідовність клітинних змін. Неспецифічний характер запальної реакції дуже утрудняє з'ясування питання про те, чим є продукт бактерії, що викликає реакцію, – токсином алергеном – антигенним продуктом мікроорганізму, що індукує запальну алергійну реакцію в попередньо сенсibilізованого хазяїна. Попереднє сенсibilізуючий вплив антигену, що потрапив в організм із чи їжею пилом, майже неможливо виключити навіть в експериментах на безмікробних тваринах.

*Органотропність і специфічність* дії екзотоксинів зв'язані з наявністю на поверхні чутливих клітин організму специфічних рецепторних структур, до яких приєднуються молекули токсину, і особливостями будівлі токсинів.

Роль клітинних рецепторів для більшості відомих бактеріальних екзотоксинів (правцевого, ботулінічного, холерного й ін.) виконують молекули гангліозидів. Гангліозиди являють собою глікофінголіпіди, що містять сіалові кислоти, причому особиста участь у зв'язуванні з токсином приймає вуглеводна частина гангліозидної молекули. Саме тому вплив нейрамінідазою, що розщеплює сіалові кислоти, знижує ступінь зв'язування гангліозида з токсином, а гангліозиди, позбавлені залишків сіалової кислоти, не володіють токсино зв'язуючою здатністю.

Деякі токсини, що володіють літичною дією щодо клітин, зокрема еритроцитів (пневмолізін, О-стрептолізін, тетанолізін), фіксуються на холестеринвмісних рецепторах клітини.

Екзотоксини надзвичайно *токсичні*, діють у малих дозах. Найбільш сильним з бактеріальних токсинів є ботулінічний. В 1 мг чистого токсину міститься близько 1 000 000 D<sub>50</sub> для мурчаків.

Токсичність обумовлена наявністю в структурі токсинів активного центра, блокування якого шляхом обробки формаліном (0,3-0,4% формаліну протягом 30 днів при 38 °С) приводить до втрати токсичних властивостей. Такі знешкоджені токсини іменуються анатоксинами (чи токсосоїдами). Вони широко застосовуються як вакцини для профілактики захворювань, у патогенезі яких основну роль грає токсичний фактор (дифтерія, правець і ін.).

У всіх екзотоксинів добре виражені *антигенні й імуногенні властивості*, що зберігаються після їх детоксикації. Антитіла проти екзотоксинів мають захисну дію і складають основу антитоксичного імунітету. Для лікування і створення штучного імунітету проти правця, ботулізму, дифтерії й інших інфекцій використовують антитоксичні сироватки, що містять антитіла – антитоксини.

В даний час по механізму дії виділяють три групи екзотоксинів:

- 1. Мембранно-активні екзотоксини;**
- 2. Суперантигени;**
- 3. В-екзотоксини, що у свою чергу підрозділяються на прості або «розрізані» і складні.**

### **Мембранно-активні екзотоксини**

Мембранно-активні екзотоксини діють на клітини макроорганізму шляхом порушення цілісності їх мембран. Ці екзотоксини іноді називають **гемолізинами**, тому що вони легко руйнують мембрани еритроцитів. Крім

цього, екзотоксини з механізмом дії, що є мембрано-руйнівним, руйнують тромбоцити, лейкоцити (лейкоцидини), базофили й інші клітини, а також клітини культур тканин, протопласти і сферопласти.

Зокрема фосфоліпази екзотоксинів руйнують стабілізуючу частину мембранних фосфоліпідів, у результаті чого мембрана дестабілізується і настає лізис клітини. Крім того, передбачається, що однієї з функцій цих токсинів є звільнення речовин з їх комплексів (наприклад, звільнення заліза), необхідних для росту бактерій.

Виділяють тип мембранно-активних екзотоксинів, що продукується деякими грамнегативними бактеріями. Ці екзотоксини називають дупліцированими токсинами, тому що мають подвоєння дев'яти амінокислот. Дані протеїни мають здатність «висвердловати» пори в мембранах еукариотів. Наприклад, низькі рівні мембранно-активного екзотоксина, виробленого уропатогеними штамми *E. coli*, можуть стимулювати виділення цитокинів і супероксидну продукцію нирковими клітинами; високі рівні цих токсинів лизують ниркові клітини.

### Суперантигени

Ці токсини зв'язують прямо антигенна ділянка 2-го класу великого комплексу гістосумісності або макрофагів антигени інших клітин, що антиген-представляють, і активізують до 20% усіх Т-лимфоцитів. Наслідком цієї активації є утворення великої кількості інтерлейкіна (МУЛ), що у свою чергу сприяє синтезу фактора некрозу пухлин (ФНП) і інших цитокинів, що може привести до розвитку циркуляторного колапсу, а також порушенню функцій багатьох органів. У нормі клітини, що антиген-представляють, поглинають протеїнові антигени й обробляють їх, розщеплюючи протеїни до пептидів; один з розщеплених пептидів потім з'єднується з поверхнею мембрани клітин, що представляють антиген. Тільки невелике число Т-хелперов мають рецептори, що можуть розпізнатися антигенною ділянкою 2-го класу великого комплексу гістосумісності макрофагів. Ця маленька підгрупа Т-хелперов після з'єднання з антигенами продукує цитокини, що стимулюють проліферацію Т-лимфоцитів, що викликають продукцію антитіл В-лімфоцитами.

У такий спосіб виявляють свою дію ентеротоксини, які продукуються стафілококами. Ці білки мають властивості суперантигенів, тобто антигенів, що стимулюють синтез зайвої кількості Т-лімфоцитів. Останні починають виробляти величезну кількість інтерлейкіна-2, а це приводить до токсичного ефекту. Токсична дія на організм стафілококкових ентеротоксинів реалізується через індукований ними синтез інтерлейкіна-2.

## А-В токсини

В-токсини – екзотоксини, що складаються з двох білкових фрагментів – А і В. Кожен фрагмент сам по собі не активний. Властивості токсину вони мають, якщо є зв'язаними один з одним. При цьому фрагмент У виконує дві функції – акцепторну (розпізнає акцептор на мембрані і зв'язується з ним) і функцію формування внутрішньомембранного каналу. Фрагмент А проникає через канал у клітину і виявляє в ній токсичну активність, впливаючи на різні процеси метаболізму клітини.

В-токсини підрозділяють на дві груп – прості і складні. До простого («розрізаного») токсину відносяться такі, котрі складаються з одного поліпептидного ланцюга. До складних (комплексних) відносяться токсини, що складаються з декількох компонентів, зв'язаних між собою хімічними, фізико-хімічними або іншими зв'язками.

У-екзотоксини, як прості так і складні, синтезуються патогенними бактеріями у виді неактивних попередників, т. зв. протоксинів, і виявляють біологічну активність тільки після активації. Процес активації протоксинів *in vivo* здійснюється за типом обмеженого протеолізу, очевидно, під дією протеаз, вироблених або самою бактеріальною клітиною, або тканиною-мішенню. Після активації протоксина спостерігається фрагментування поліпептидного ланцюга, і токсичні властивості має вже не один поліпептидний ланцюг, а два з'єднаних один з одним пептида.

Для простих токсинів характерної є стадія активації, що протікає за типом протеолізу. У результаті розщеплення поліпептидного ланцюга протоксина утвориться система, що складається з фрагментів раніше нетоксичної молекули. Фрагменти, видимо, залишаються з'єднаними між собою, як показано на прикладі дифтерійного токсину, і в такому виді підходять до чуттєвої клітини. Особливо варто підкреслити, що функція фрагментів різна: один з них забезпечує рецепторну взаємодію, іншій є специфічним активатором.

У цілій молекулі протоксина ці функції не диференційовані. Отже, можна думати, що зміст активації полягає в утворенні біфункціональної системи, що складає з рецептора й активатора. У той же час модель системи, у якій рецепторна й активаторна функції розмежовані між окремими її компонентами, прийнятна і для складних токсинів, наочним прикладом яких є холерний екзоентеротоксин.

За характером токсичної дії В екзотоксини відрізняються один від одного. Механізм дії екзотоксинів зв'язаний з ушкодженням життєво важливих процесів у клітині: пригнічення біосинтезу білка (дифтерійний екзотоксин) і переносу електронів у ланцюзі їхнього переносу («мишачий» токсин *Y. pestis*).

Ентеротоксини холерного вібріона і патогенних грамнегативних бактерій, впливаючи на ацетилацетатну систему еритроцитів, викликають вихід іонів і води з тканин у кишечник, що й обумовлює патогенез холери й інших форм діареї. Екзотоксин *C. botulinum* пригнічує виділення ацетилхоліну в нервово-м'язовому синапсі і блокує передачу нервового імпульсу на м'язове волокно. Механізм дії екзотоксина *C. tetani* також зв'язаний з гальмуванням передачі синаптичних медіаторів ( $\gamma$ -аминомасляної кислоти, ацетилхоліну, норадреналіну й ін.).

### **Прості чи «розрізані» В-токсини**

Прості, або «розрізані», токсини синтезуються в бактеріальних клітинах у вигляді єдиного неактивного поліпептидного ланцюга. В активну форму протоксин перетворюється в результаті розрізування його протеазою. При цьому активний токсин, що утворюється, складається з двох зв'язаних між собою дисульфідними зв'язками пептидних ланцюгів. Активація токсину (розрізування поліпептидного ланцюга) може здійснюватися або власної бактеріальної протеазою, або протеазами кишкового тракту макроорганізму. Такий тип екзотоксинів синтезує *C. tetani*, *C. botulinum*, причому в їхніх токсинах містяться додаткові білки з іншими, нетоксичними властивостями.

З'єднання токсину з рецептором клітини здійснюється за допомогою визначеної ділянки молекули. Установлено, що екзотоксини є біологічно активними макромолекулярними системами з двома чітко розмежованими функціями. Одна частина молекули містить активовані групи, відповідальні за специфічне патогенетичну дію токсину. Інша частина несе акцепторні групи, відповідальні за приєднання токсину до визначених рецепторних структур на чуттєвій клітині. Взаємодія токсину з чуттєвою клітиною, що приводить до розвитку інтоксикації, здійснюється в кілька послідовних етапів і зв'язано з його активацією.

Докладний механізм дії й активації простих токсинів розглянемо на прикладі токсину *Corynebacterium diphtheriae*.

### **Токсин *C. diphtheriae***

*Corynebacterium diphtheriae* продуцирует екзотоксин (його вперше одержали Ру і Йерсен у 1888 р.), що представляє собою односторонній білок із Мм 60 000 і двома внутрішніми дисульфідними зв'язками. Токсин виявляє усі властивості екзотоксина – термолабільний, високотоксичний, імуногенний білок, який нейтралізується антитоксичною сироваткою; має інкубаційний період дії, втрачає активність при 40 °С и під дією 0,4 % розчину формаліну.

Кристалічний токсин містить 51,47 % Карбону, 6,75 % Гідрогену, 16,0 % Нітрогену, 0,75 % Сульфуру і 0,05 % Фосфору.

Для токсинування *in vitro* живильне середовище має бути доповнено амінокислотами, пептонами і солями  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  і ін.; останні повинні бути присутнім у строго визначених кількостях; особливу значимість має вміст солей заліза.

Токсин нестійкий у зовнішнім середовищі; руйнується під дією світла і при нагріванні до 60 °С. Активність токсину виражають в одиницях DIm: 1 OD DIm дифтерійного токсину дорівнює найменшій концентрації, що убиває морську свинку масою 250 г на 4-5 добу. Для одержання анатоксину (ослабленого нагріванням при 40 °С дифтерійного токсину) використовують штам *C. diphtheriae* PW-8.

При культивуванні *in vivo* і, мабуть, *in vitro* мікроб продукує токсин у вигляді єдиних неактивних білкових молекул, що активуються під дією протеолітичних ферментів і тіолових сполук. Щоб перевести інтактний токсин в активний стан, необхідно відновити дисульфідні угруповання, проте пептидний зв'язок, що знаходиться між атомами Сульфура внутрішнього дисульфідного містка, гідролізувати. Протеоліз є якби підготовчим етапом, що відкриває доступ до дисульфідному містка, що з'єднує два фрагменти молекули токсину.

У простих токсинів, зокрема токсину *C. diphtheriae*, у результаті протеолізу відбувається розщеплення одноланцюгової молекули з утворенням біфункціональної системи, що складає з активаторного й акцепторного фрагментів. Так, активація дифтерійного токсину відбувається під дією протеолітичних ферментів і тіолових сполук і супроводжується розщепленням пептидної зв'язку і відновленням дисульфідних угруповань у сульфгідрильні. В результаті утвориться два з'єднаних між собою поліпептидних фрагмента, що відрізняються за фізико-хімічними властивостями. Амінотермінальний фрагмент А має Мм 22000-24000 і характеризується високою стійкістю до дії температури, кислот і лугів, СООН-термінальний фрагмент В з Мм 38000-39000 – високолабільний. Фрагмент А виконує функцію активатора і виявляє активність тільки за присутності В-фрагмента, відповідального за акцепторну функцію.

Значення активації протоксинів протеолізом полягає в тім, що вона веде до появи в них ферментативної АДФ-рибозилтрансферазної активності. Вважається, що в результаті протеолізу в молекулі токсину відбуваються конформаційні зміни, що відкривають доступ до структури каталітичного центра цієї активності, що схований в інтактній молекулі протоксина.

Після активації токсин інгібує важливу для життєзабезпечення клітини-мішені функцію шляхом двоступінчастого NAD-залежного процесу. Активаторна частина токсину проникає усередину клітини і викликає гідроліз NAD з утворенням аденозиндіфосфорибози (АДФ-рибози) і нікотинаміда, а потім здійснює перенос АДФ-рибози на відповідний субстрат клітини-мішені. Як субстрат виступає той чи інший ключовий фермент клітинного метаболізму, блокада якого внаслідок приєднання АДФ-рибози викликає порушення, що обумовлюють специфічний ефект.

Здатність до токсиноутворення виявляють лише лизогенні штами *C. diphtheriae*, інфіковані бактеріофагом, що несе ген *tox*, що кодує структуру токсину. Утворення останнього найбільш виражене при вступі бактеріальної популяції в стадію відмирання; перехід помірної фага в літичну форму мало впливає на синтез токсину.

Ще в 50-і рр. було встановлено, що нетоксигенні штами *C. diphtheriae* перетворюються в токсигенні шляхом лізогенізації бактеріофагом  $\beta$  або деякими спорідненими фагами. Тривалий час залишався невідомим, яку функцію виконує геном фага в біосинтезі токсину: чи контролює біосинтез токсину визначена область фагового генома або участь фагового генома носить опосередкований характер. Вирішити це питання удалося в порівняльних дослідках щодо лізогенізації нетоксигених дифтерійних бактерій нормальними і дефектними мутантами помірних  $\beta$ -фагов. Був отриманий мутант фага  $\beta$  – фаг  $\beta_{45}$ . При фаговій конверсії, культура, інфікована фагом  $\beta_{45}$ , так само, як культура, заражена нормальним помірним  $\beta$ -фагом, здійснювала заліозалежний синтез білка. Однак білок, синтезований при участі дефектного фага  $\beta_{45}$ , не володів токсичними властивостями і по молекулярній вазі був менше, ніж дифтерійний токсин. Його молекулярна вага дорівнює 45 000 дальтон у порівнянні з 62 000 нормального токсину. Протеоліз нетоксигенного білка й обробка його дитіотріетолом призводили, як й у випадку токсину, до виникнення двох фрагментів, один із яких, що відповідає пептиду А, мав таку ж молекулярну вагу (24 000 дальтон). Інший же фрагмент мав молекулярну вагу не 38 000, як фрагмент У, а 21000 дальтон.

Фрагмент із молекулярною вагою 24000 дальтон був серологічно ідентичний фрагменту А токсину. Як з'ясувалося пізніше, за рахунок фрагмента А нетоксичний білок виявляв часткове споріднення у серологічних тестах з нормальним дифтерійним токсином.

При порівняльному вивченні В-фрагментів дефектного білка і токсину було встановлено, що в поліпептиді з молекулярною вагою 21 000 дальтон (фрагмент У дефектного білка) відсутня 3-термінальна ділянка, рівна 17 000

дальтон. Тим часом, зазначена ділянка, грає надзвичайно важливу роль у прояві токсином його функціональної активності.

Дифтерійний екзотоксин, переведений за допомогою формаліну в нетоксичну форму, має виражені антигенні властивості і використовується для створення захисного антитоксичного імунітету проти дифтерії.

Кожний з пептидів окремо (фрагмент А і В) викликає утворення антитіл у імунізованих ними тварин і реагує з гомологічними антитілами у серологічних тестах. Між собою фрагменти А і В серологічно неідентичні. В антитоксичній дифтерійній сироватці 1/3 складають антитіла до фрагмента А, 1/3 – антитіла до молекули токсину, позбавленої ділянки з молекулярною вагою 17 000 дальтон, і 1/3 – антитіла ділянці фрагмента В з молекулярною вагою 17 000 дальтон.

Імунохімічне вивчення фрагментів А і В з кінської і кролячий антитоксичних сироваток дозволило картувати локалізацію антигенних детермінант на молекулі токсину й встановити їх значення для захисного антитоксичного імунітету при дифтерії. Показано, що особливе значення мають антигенні детермінанти, локалізовані на 3-термінальній ділянці фрагмента В (ділянка з молекулярною вагою 17 000). Вони нейтралізують токсичну дію *in vivo*, запобігаючи, як припускають, приєднання В-фрагмента до клітинної мембрани. У результаті чого фрагмент А позбавляється можливості проникнути в цитоплазму.

Антитіла до фрагмента А не захищають тварин від дії токсину, хоча і нейтралізують ензиматичну активність зазначеного пептиду. Передбачається, що антигенні детермінанти А-фрагмента масковані в інтактному токсині і можуть вивільнятися або після протеолізу, або в результаті деградації більш лабільного фрагмента В.

Незважаючи на значні успіхи, досягнуті останнім часом в області вивчення структури дифтерійного екзотоксина, механізм його дії в значній мірі залишається нез'ясованим. Основна функція дифтерійного екзотоксина зводиться до пригнічення білкового синтезу в клітинах організму хазяїна. При цьому до дії токсину вразливе тільки невелике число видів тварин, хоча в досвідах *in vitro* показано, що інгибування білкового синтезу під дією токсину спостерігається в будь-яких еукаріотичних клітинах, включаючи рослини. На біосинтез білка прокаріотними клітинами токсин не робить ніякого впливу. У клітинах еукаріотів дифтерійний токсин інгибує білковий синтез шляхом блокування трансферази II, що приймає участь у біосинтезі на стадії трансляції. У клітинах прокаріотів трансфераза II відсутня, а її функцію виконує інший фермент, що є вирішальним чинником у несприйнятливості прокаріотних клітин до дії дифтерійного токсину

Біологічну дію дифтерійного токсину пов'язують з його здатністю пригнічувати синтез білка в клітині-мішені шляхом інактивації фактора елонгації-2 (EF-2), що бере участь у синтезі білка на стадії трансляції. Після активації дифтерійний токсин фіксується за допомогою фрагмента В на відповідному рецепторі клітини, а активаторний фрагмент А, проникнувши в клітину, гідролізує NAD з утворенням АДФ-рибози і здійснює перенос її на фактор елонгації.

У результаті акцепції АДФ-рибози на EF-2 утвориться неактивний комплекс, не здатний брати участь у процесі синтезу білка. Припинення синтезу білка веде до порушення нормальних фізіологічних функцій клітини і її загибелі. Мішенню дії дифтерійного токсину може бути будь-як тканина, однак найбільше часто він уражає м'яз серця, кору наднирників, нервові клітини. Результат дії токсину на нервову тканину – демієлінізація нервових волокон, що часто приведе до паралічів і парезів.

Вивчення мембранних рецепторів еукариотних клітин для дифтерійного токсину в даний час знаходиться в стадії інтенсивного пошуку. Проблема ускладнюється тим, що для інгубування білкового синтезу в клітинах чутливих тканин потрібно, видимо, усього кілька молекул токсину. У той же час методи, застосовані з цією метою для вивчення інших токсинів, не мають достатню здатність, що дозволяє уловлювати дифтерійний токсин у кількості декількох молекул. Ці основні методичні труднощі є головною перешкодою на шляху встановлення хімічної природи і структури рецепторів для токсину *C. diphtheriae*.

### ***Екзотоксини C. botulinum***

Ботулінічні токсини відносяться до категорії простих токсинів, тому що складаються з одного поліпептидного ланцюга. Відомі трохи серологічно різні типи ботулінічних нейротоксинів. Однак за характером біологічної дії усі вони подібні, що вказує на наявність загальних токсичних властивостей у їхній білковій молекулі. Вважають, що ботулінічні токсини чотирьох типів (А, У, Е, F) мають основний токсичний компонент, що характеризується молекулярною вагою 150 000 і константою Сведберга, приблизно рівної 7 S. У нативном стані кожний з токсинів асоційований з нетоксичним компонентом, величина якого варіює й у підсумку визначає розмір токсичного комплексу.

Нетоксичним компонентом у кристалічному препараті токсину типу А є гемагглютинин. Токсичний компонент зв'язаний з гемагглютинином нековалентно, і в кислих розчинах такий комплекс за рядом фізико-хімічних показників поводить, як гомогенний препарат.

Комплекс токсину і гемагглютинина стабільний в інтервалі значень рН від 9,5 і зберігає тривалий час активність. Токсин без гемагглютинина швидко інактивується навіть на холоді. На одну вагову частину токсичного компонента приходить від 4 до 9 частин гемагглютинина. За даними електронно-мікроскопічного дослідження, токсичний компонент має форму довгого подвійного тяжа або циліндра шириною 9 нм, що складається з круглих чи дископодібних часток діаметром 4,5 нм, розташованих попарно. На відміну від токсину, частки гемагглютинина, що мають діаметр 9 нм, зібрані в регулярну спіраль з поперечним перерізом 20 нм. Внутрішній простір спіралі становить 9 нм. У середині спіралі й міститься тяж токсичного білка, якщо вивченню піддається кристалічний препарат токсину, у якому токсичний компонент і гемагглютинин знаходяться в асоційованому стані. З ботулінічним токсином типу В знаходиться в асоціації звичайно два види нетоксичних компонентів, що розрізняються між собою за молекулярною вагою. Один нетоксичний компонент має молекулярну вагу 150 000, інший – 350 000 дальтон. Наявність двох форм нетоксичного компонента, що асоціюються з токсином типу В, припускає існування імунологічних розходжень у препаратів токсину типу В, отриманих від протеолітичних і непротеолітичних штамів *C. botulinum*.

Нетоксичний компонент, що утворює комплекс із токсином типу Е, має молекулярну вагу 150 000. Гемагглютинуючими властивостями він не володіє.

Отже, здатність утворювати комплекси з визначеними нетоксичними білками є однією з характерних рис ботулінічних токсинів усіх типів.

Синтезується ботулінічний токсин мікробною клітиною, видимо, у формі протоксина, що вступає в асоціацію з нетоксичними компонентами. Чи утворюються ці комплекси на стадії неактивованого протоксина, і потім активації піддається комплекс у цілому чи з нетоксичним компонентом з'єднується активований токсин – питання залишається відкритим.

Активація протоксинів здійснюється відповідними протеолітичними ферментами. Якщо токсин продукується протеолітичним (культури типу А – усі протеолітичні, а типу В – лише деякі), то попередник токсину активується власними ендogenousними ензимами. Якщо ж культура непротеолітична, що відноситься до всіх штамів типу Е, то для активації попередника токсину потрібна обробка його або трипсину трипсиноподібними ферментами.

Як встановлено для токсину типу Е, або попередник «протоксин» має єдиний поліпептидний ланцюг, що у результаті протеолізу фрагментується з утворенням двох пептидів. Розривається, як мінімум, один пептидний зв'язок, що знаходиться між залишками цистина, що утворюють дисульфідний місток. Обробка високо очищеного попередника токсину типу Е протеїназою, отриманої з протеолітичної культури типу В, робила менший активуючий

ефект, ніж вплив трипсину. Отже, для активації протоксина може мати значення субстратна специфічність протеїнази. Вторинна обробка трипсином частково активованого попередника призводить до значного підвищення активності, що вказує на розщеплення білкової молекули не за одним пептидним зв'язком, а – за двома або більше.

Протоксин *C. botulinum*, підданий протеолізу, здобуває усі властивості, характерні для ботулінічних нейротоксинів. Біологічна активність активованих токсинів зникає практично цілком після впливу на них таким агентом, що відновлює сульфідні групи, як дитіотритол чи  $\beta$ -меркаптоетанол. Приведений факт вказує на те, що між пептидами, що утворилися після протеолізу, існує один чи декілька дисульфідних містка, наявність яких є вирішальною умовою в прояві токсином його специфічної активності. Розрив дисульфідних зв'язків, очевидно, призводить до зміни конфігурації активованого білка і як наслідок – до втрати активності. Дисульфідні групи токсину мають, видимо, важливе значення і для збереження його антигенних властивостей. Рівень захисного імунітету, створеного анатоксином, попередньо підданим тіоліванню, значно нижче, ніж після імунізації тварин не відновленим токсином.

Останнім часом усе більше з'являється експериментальних даних, що дозволяють зв'язати продукцію з інфікуванням бактеріальної клітини специфічними бактеріофагами. Подібно збуднику дифтерії, явище фагової конверсії було відкрито й у збудника ботулізму. Значення фагової конверсії для токсигенності *C. botulinum* уперше було встановлено на токсинах типу С и D. Зараження, що конвертується фагом того чи іншого типу *C. botulinum*, залежить від структури рецептора, розташованого на поверхні бактеріальної клітини.

Здійснення контролю за біосинтезом токсину з боку генома фага наочно демонструється тим, що інфікування бактеріальної клітини фаговим мутантом, що втратив ген токсигенності, не супроводжується продукцією токсину. Показано, що ген, що контролює продукцію токсину, не інтегрується з клітинною хромосоною. Крім типів С и D, явище фагової конверсії для інших типів ботулінічних токсинів не показано.

Незважаючи на спільність біологічної дії, за своєю антигенною специфічністю ботулінічні токсини розділені на ряд типів, позначених буквами латинського алфавіту (А, У, З, D, Е, F і т.п. ). Мається досить значне число літературних джерел, що стосуються антигенних і імуногенних властивостей ботулінічних токсинів. При цьому, вивчення проводилося на препаратах токсинів, знешкоджених дією формальдегіду. На моделі ботулінічних токсинів типів А и Е, отриманих у вигляді індивідуальних компонентів і знешкоджених

формаліном, показано, що антитіла до цих препаратів захищають тварин від зараження культурою *C. botulinum* тільки гомологічного серотипа.

Структуру антигенних детермінант ботулінічних токсинів не вивчено. Відомо лише, що дисульфідні угруповання відіграють важливу роль у прояві токсинами їх імуногенних властивостей. Відновлення дисульфідних груп меркаптоетанолом приводить до того, що імунізація такими препаратами не створює захисного імунітету в щеплених тварин. Треба сподіватися, що характеристика структури антигенних детермінант буде з'являтися в міру розшифровки структури молекули токсинів у цілому.

Незалежно від серологічного типу всі ботулінічні токсини відносяться до групи нейротоксинів. У відмінність правцевого нейротоксина ботулінічні токсини уражають, в основному, периферичну нервову систему. До ботулінічного токсину чуттєві усі види домашніх тварин, а з лабораторних – найбільш чуттєві морські свинки і кролики.

Досліди з гангліозидами мозку показали, що трисіалогангліозид  $G_1$  ( $G_{T1}$ ) як окремо, так і в суміші з іншими гангліозидами інактивує ботулінічні токсини типів А, У, D, Е. Введення мишам 0,1 мл суміші, що складає з  $10^3$  DLM токсину/мл і 100 мкг/мл гангліозида, не викликало загибелі тварин. Інактивація токсину гангліозидом відбувалася досить швидко (менш ніж за 5 хв) у широкому діапазоні температури (від 2 до 40 °С).

Сфінголіпіди, стероїди, а також жирні кислоти (пальмітинова і стеаринова), фосфоліпіди і простагландин Е не робили інгибуючої дії на ботулінічні токсини.

Передбачається, що молекули ботулінічних токсинів з їх вираженими полярними властивостями взаємодіють з рецепторами, у структуру яких входять сіалові кислоти, що володіють значним негативним зарядом. Вплив на трисіалогангліозид  $G_1$  нейрамінідазой знижує ступінь зв'язування гангліозида з токсином. Гангліозиди, позбавлені залишків сіалової кислоти, не виявляють токсинзв'язувальної здатності взагалі.

При експериментальному ботулізмі паралітичний синдром виникає в результаті виборчої поразки  $\alpha$ -моторних нейронів передніх рогів спинного мозку.

Крім специфічної дії, що лежить в основі патологічного синдрому, характерного для ботулізму, у ботулінічних токсинів виявлена здатність впливати на фагоцитарний процес. Токсин не впливає на здатність фагоцитів захоплювати спори *C. botulinum*, однак токсин впливає на бактерицидні властивості лейкоцитів. При цьому пригнічення бактерицидної дії лейкоцитів спостерігається за приблизно 8 год, коли спори проростають і переходять у вегетативну форму. Таким чином, захоплення спор лейкоцитами забезпечує

збуднику життєдіяльність в умовах макроорганізму, а наступне інгибування токсином здатності переварювати вегетативні клітини створює умови для розвитку бактерій.

### ***Екзотоксини *C. tetani****

Правцевий нейротоксин (тетаноспазмін), подібно дифтерійному і ботулінічному токсинам, можна віднести до групи простих токсинів. Існує у вигляді двох форм – клітинної і позаклітинної. За цілим рядом параметрів клітинна і позаклітинна форми правцевого токсину виявляють ідентичність. У молекулі того й іншого токсину виявлено шість сульфгідридних угруповань і два дисульфідних зв'язки. У молекулі обох токсинів переважають дикарбонові кислоти, аспарагінова і глутамінова, а також ізолейцин і лізин. Тирозин, триптофан, гистидин і фенілаланин є тими амінокислотами, що або входять у структуру детермінант, що визначають активність правцевого токсину, або додають таку конформацію молекулі, що необхідна для реалізації її токсичної дії.

Молекулярна вага правцевого токсину, за даними різних авторів, коливається від 68 000 до 176 000 дальтон. Подібна токсична активність препаратів, що характеризуються константою седиментації, рівної 7,1, а також константою, що має майже в 2 рази меншу величину – 4,5S і 3,9S, дозволила зробити припущення про підвищену здатність правцевого токсину до агрегації й існуванні його в складі агрегатів різної величини. У той же час одержання токсину в гомогенному стані, вільному від домішок інших білків, вказує на те, що біологічно активна форма токсину може існувати і поза агрегатами.

На відміну від позаклітинної форми токсину, білок, виділений із клітин *C. tetani*, складається з одного поліпептидного ланцюга. Вплив на клітинний токсин дитіотрієтолом і додецилсульфатом Натрію не призводить до фрагментування поліпептидного ланцюга. Однак якщо такій обробці передують протеоліз трипсином, то поліпептидний ланцюг клітинного токсину розпадається на два фрагменти А і В. Два поліпептиди, що утворилися, залишаються з'єднаними дисульфідними містками й у такому вигляді існують як позаклітинна форма токсину.

Говорячи про протеоліз, необхідно помітити, що розщеплення поліпептидного ланцюга інтактного токсину здійснюється, видимо, специфічними протеазами типу трипсину. Дія ж такої протеази, як папаїн, призводить до більш грубої деградації білка, у результаті чого утворюються атоксичні фрагменти з молекулярною вагою 40 000 дальтон.

Вплив на правцевий токсин (як клітинний, так і позаклітинний) сульфатом Міді призводить до зниження токсичності приблизно в 1000 разів.

При цьому відбувається розщеплення токсину на три фрагменти. ЕДТА і гліцин перешкоджають розщепленню токсину під дією  $\text{CuSO}_4$ , що свідчить про участь іонів важких металів у розриві дисульфідних зв'язків, що з'єднують окремі ділянки пептидного ланцюга.

Вивчення антигенної структури правцевого токсину дозволило знайти в ньому чотири групи антигенних детермінант. При заморожуванні до  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  і збереженні в такому виді впродовж чотирьох діб токсин розщеплюється на дві самостійні антигенні одиниці. У цих умовах губиться велика частина токсической активності і знижується флоккуююча здатність токсину.

Антигенні детермінанти анатоксину і токсину, видимо, збігаються, про що свідчать досліди по імунізації чуттєвих і нечуттєвих до токсину тварин (птахів). Імунохімічний аналіз, проведений з отриманими антисироватками, показав серологічне споріднення антитіл, продукуємих під дією як токсину, так і анатоксину. Структура і локалізація антигенних детермінант, що визначають специфічність правцевого токсину, залишається ще невивченою.

Відомо, що правцевий токсин має нейротропну дію. Для розвитку характерних симптомів правця необхідно, щоб токсин проникнув у центральну нервову систему, де він гальмує інгибування синаптичних імпульсів на спинномозкових моторних нейронах.

Рецепторами для правцевого токсину служать гангліозиди – сполуки, на які дуже багата нервова тканина. У нервовій тканині відомо три види гангліозидів, що розрізняються між собою за змістом в них залишків сілової кислоти і характером їх зв'язку з іншими компонентами.

Суміш гангліозида і правцевого токсину в молярному співвідношенні  $4 \cdot 10^5 : 1$  не знижує токсичної активності білка. Змішування гангліозидів і токсину в молярному співвідношенні  $3 \cdot 10^9 : 1$  привозить до втрати токсином його біологічних властивостей. Гангліозиду при цьому не завдається змін.

### ***A-токсин ( $\alpha$ -гемолізін) *S. aureus****

Стафілококковий  $\alpha$ -токсин є простим білком. Серед амінокислот переважають аспарагінова кислота, лізин і треонин.  $A$ -токсин чуттєвий до нагрівання. Під дією трипсину  $\alpha$ -токсин розщеплюється на два фрагменти: фрагмент А и фрагмент В. Фрагмент А має летальну дію, що зберігається після повторної обробки фрагмента трипсином. Цей факт дозволяє розглядати летальний фрагмент А стафілококкового токсину як стійкий до протеолізу пептид. На противагу фрагменту А, фрагмент В токсину легко агрегує й у результаті протеолізу деградує.

В інтактному стані стафілококковий  $\alpha$ -токсин не має будь-якої протеолітичної активності. Однак після взаємодії  $\alpha$ -токсину з еритроцитами він здобуває протеолітичні властивості.

A-токсин за антигенними властивостями є видоспецифічним білок патогенних стафілококів. Антигенна специфічність  $\alpha$ -токсину є одним із критеріїв для виділення його з групи інших гемолізинів, продукованих цими мікроорганізмами. Гемолізини  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\Delta$ ,  $\gamma$  та  $\epsilon$  за характером антигенної специфічності не ідентичні між собою.

Оскільки  $\alpha$ -токсину надається велике значення як фактору патогенності стафілококів, те відповідно й антитоксичним антитілам приділяється важлива роль у створенні антистафілококкового імунітету. Як прищеплювальний препарат звичайно використовують вакцини на основі  $\alpha$ -токсину, знешкодженого формаліном. Такий анатоксин має високу імуногенність щодо для мишей. Дворазова вакцинація мишей очищеним сорбованим стафілококковим анатоксином створює у тварин імунітет до наступного внутріочеревинного зараження патогенними стафілококами.

Стафілококковий  $\alpha$ -токсин має декілька видів біологічної активності: летальну, дермонекротичну і цитотоксичну.

Здатність  $\alpha$ -токсину викликати лізис еритроцитів дозволяє розглядати його як класичний гемолізин. Летальна доза ( $LD_{50}$ ) стафілококкового  $\alpha$ -токсину для мишей при внутрішньочеревинному зараженні складає 27-34 мкг на 1 кг ваги тварини, мінімальна летальна доза для кроликів при внутрішньовенній ін'єкції дорівнює 1,3 мкг/кг. В експерименті на кроликах показано, що мінімальна дермонекротична доза  $\alpha$ -токсину характеризується величиною 0,03 мкг. Загибель настає впродовж декількох хвилин при введенні кроликам внутрієнно великої дози  $\alpha$ -токсину. При цьому відзначається параліч респіраторного центра і виникнення м'язових спазмів.

Стафілококковий  $\alpha$ -токсин викликає порушення периферичного кровообігу, а також діє на серце і центральну нервову систему. A-токсин обумовлює звуження коронарних артерій і систолітичне гальмування.

Крім мікроорганізмів, токсична дія  $\alpha$ -токсину встановлена на цілому ряді тканинних культур. A-токсин індукує бласттрансформацію в культурі кролячих лімфоцитів. У дослідах з частково очищеними препаратами показано, що  $\alpha$ -токсин інгибує транспорт іонів.

### ***Ентеротоксини стафілококів***

Стафілококкові ентеротоксини відносяться до групи простих токсинів. Відомо дещо серологічно відмінні типи стафілококкових ентеротоксинів, позначених відповідно буквами латинського алфавіту від A до F. Незалежно від

типу всі стафілококкові ентеротоксини мають подібну біологічну дію, що вказує на спільність окремих ділянок їхньої структури. У теж час розходження за антигенними детермінантами свідчить про відсутність повної ідентичності їх молекулярної будівлі.

Молекулярна вага стафілококкових ентеротоксинів коливається в межах 30000 дальтон і залежить, видимо, від методу виділення й очищення, а також від способу визначення молекулярної ваги. У поліпептидному ланцюзі стафілококкових ентеротоксинів переважають лізин, аспарагінова і глутаминова кислоти, містяться тільки два полуцистиїнові залишки й один чи два залишки триптофану.

Всі стафілококкові ентеротоксини в нативному стані стійкі до дії протеолітичних ферментів, таких як трипсин, папаїн, химотрипсин і ренін. Пепсин інактивує стафілококкові ентеротоксини при рН близько 2,0.

Стафілококкові ентеротоксини відрізняються термостійкістю, однак чутливість їх до температурного впливу пов'язана зі ступенем очищення токсину, величиною рН і іонної сили. Антигенні і токсичні сайти по-різному реагують на вплив високих температур, що підтверджує їхню різну локалізацію в білковій молекулі токсину.

За своєю антигенною специфічністю стафілококкові ентеротоксини поділяються на ряд типів. До кожного із серологічних типів можна одержати гомологічні антитіла, однак поряд з цим, у сироватці, як правило, виявляються гетерологічні антитіла, що свідчить про спільність деяких антигенних детермінант у токсинів різних серотипів. Серологічними методами було встановлено антигенне споріднення між ентеротоксинами типів А – Е та В – С. Ці типи токсинів подібні між собою не тільки в антигенному відношенні, але й за амінокислотним складом.

Подібно до інших бактеріальних токсинів, стафілококкові ентеротоксини втрачають специфічну біологічну активність під дією формаліну (0,7 %), зберігаючи при цьому свої антигенні властивості. Так може бути отриманий анатоксин, придатний згодом для імунізації.

У порівнянні з іншими білковими токсинами стафілококкові ентеротоксини є слабкими антигенами. Саме з цієї причини використовуються напружені схеми імунізації, тому що тільки такий підхід дозволяє одержувати антисироватки до зазначених токсинів з більш-менш високим титром специфічних антитіл.

Після імунізації кроликів «прогрітим» препаратом токсинів у крові тварин з'являються преципітуючі антитіла, що виявляються в реакції дифузії в агаровому гелі.

Преципітація стафілококкових ентеротоксинів з гомологічними антитілами широко використовується для діагностики харчових інтоксикацій, а також для виявлення зараженості харчових продуктів стафілококами.

Для біологічної активності стафілококкових ентеротоксинів характерний, в основному, ентеротоксичний ефект. У лабораторних умовах ентеротоксичну активність стафілококкових ентеротоксинів встановлюють у дослідах на мавпах і кішках.

Дані про механізм дії стафілококкових ентеротоксинів дуже обмежені. На відміну від холерного екзоентеротоксина, що діє на аденилциклазну систему, порушення будь-якого конкретного біохімічного процесу, властиве стафілококковим ентеротоксинам, не встановлено. У досвідах *in vitro* на мітохондріях печінки кроликів показано, що дія стафілококкових ентеротоксинів типу В приводить до порушення обміну аденоцинтрифосфата й іонів  $Mg^{2+}$ . У зв'язку з цим передбачається, що в основі клінічної картини, спричиненою стафілококковими ентеротоксинами, лежить поразка функцій мітохондрій окремих чуттєвих тканин.

Стафілококковий ентеротоксин типу В індукує мітоз лімфоцитів, викликає генералізований хемотаксис нейтрофілів, інгибує міграцію макрофагів, викликає цитотоксичний ефект тканинних культур. Кожний із зазначених видів впливу можна нейтралізувати специфічною антитоксичною сироваткою.

При введенні стафілококкового ентеротоксина типу В в кров'яне русло до 15 – 20% його виявляється в лейкоцитах, інша частина міститься в альбуміновій фракції сироватки. Лейкоцити, що містять ентеротоксин, локалізуються, в основному, у легеневій тканині.

Патологоанатомічне дослідження шлунково-кишкового тракту свідчить про те, що стафілококкові ентеротоксини викликають поразки слизової, а саме: гіперемію, регіонарні набряки, руйнування ворсинок, ерозію, розширення лімфатичних судин. Описаний пирогений ефект, викликуваний введенням очищених препаратів стафілококкових ентеротоксинів типів А і В.

Дія стафілококкових ентеротоксинів на блювотний центр, що знаходиться в ІV шлуночку довгастого мозку, відбувається опосередковано через симпатичну і парасимпатическую нервову систему. Через парасимпатическую нервову систему дія токсину, очевидно, поширюється на блювотний центр при введенні його *per os*. При внутрішньовенному введенні ентеротоксина дія його на блювотний центр здійснюється через симпатичну нервову систему. Для захисту тварин від біологічної дії токсину необхідно блокувати обидві ланки.

### *Ентеротоксин C. perfringens*

За хімічною природою ентеротоксин *C. perfringens* є простим білком. Токсин продукується в період споруляції мікроорганізму, за 3-5 год з моменту внесення вегетативних клітин у середовище, що містить м'ясний бульйон, і може бути виділений лише після лізису. Вегетативні клітини не виробляють токсин. Встановлено, що токсичний білок є структурним компонентом оболонки, і його біосинтез корелює з процесом спороутворення. На мутантах *C. perfringens* типу А, що розрізняються між собою за здатністю утворювати спори, показано, що біосинтез ентеротоксина здійснюється, видимо, під контролем того ж гена, що регулює і спороутворення цього мікроорганізму. Однак яка функція токсичного білка в споруванні *C. perfringens*, – питання залишається нез'ясованим. Найбільш інтенсивне спороутворення і продукція ентеротоксина спостерігається за рН 8,0-8,5 і температурі 37 °С. Чи підвищення зниження температури, так само як і закислення середовища, несприятливо визначається на споруляції і спороутворенні.

Для виділення ентеротоксина спори дезінтегрують, наприклад за допомогою ультразвуку, після чого токсин виокремлюють препаративними прийомів.

Молекулярна вага ентеротоксина *C. perfringens* остаточно не встановлений і коливається від 33 000 до 40 000. Вважається, що токсин знаходиться в декількох молекулярних формах, що характеризуються не тільки величиною молекули, але й різної ізоелектричною точкою. Кожна з цих форм володіє специфічною біологічною активністю.

Білок ентеротоксина руйнується під дією пронази і протеїнази *B. subtilis*, але стійкий до дії ряду ферментів, наприклад, трипсину та папаїну. Ентеротоксин добре розчиняється у воді і сольових розчинах. Токсический білок чуттєвий до нагріву: при температурі 60 °С зберігає свою активність лише впродовж 4 хв.

Ентеротоксин *C. perfringens* має виражені антигенні властивості. При введенні його кроликам у крові останніх накопичуються антитіла, що можуть нейтралізувати біологічну дію ентеротоксина. Антигенна специфічність ентеротоксина *C. perfringens* не збігається зі специфічністю інших токсинів, вироблених цим же мікроорганізмом. Антитіла до інших токсинів, що є у діагностичних сироватках до *C. perfringens* типів А, В, З, D і Е, не робили нейтралізуючого ефекту на ентеротоксин.

За дослідями ентеротоксина *C. perfringens* в експерименті на тваринах вважають, що йому властиві 2 види біологічної активності: здатність викликати діарею і летальна. Розвиток діареї є основним показником специфічної дії ентеротоксина. Ці симптоми були встановлені на мавпах і волонтерах, а в

дослідах на легованій кишці кролика і ягняти було показано, що здатність викликати діарею корелює з властивістю стимулювати нагромадження рідини в кишковій петлі.

Про летальну дію ентеротоксина судять за дослідженням його на мишах. Внутрішньовенне введення ентеротоксина *C. perfringens* мишам викликає загибель за 20-30 хв після ін'єкції. Замічено, що якщо миші не гинуть впродовж цього часу, то надалі ентеротоксин уже не робить на них летальної дії.

Вивчення механізму дії ентеротоксина *C. perfringens* показало, що нагромадженню в кишечнику рідини і діареї передують різке підвищення капілярної проникності і збільшення просвіту судин кишечника. Морфологічні зміни, зв'язані з некротизуванням слизової тканини кишечника, відсутні. Встановлено, що ентеротоксин викликає зміну транспорту води, натрію і хлоридів. Значно інгибується адсорбція глюкози під дією токсину, у той же час транспорт калію і бікарбонату практично залишається незмінним.

#### ***A*-токсин (фосфоліпаза C) *C. perfringens* типу A**

*A*-токсин *C. perfringens* являє собою білок, що має ферментативні властивості з молекулярною вагою в межах 50 000 дальтон.

У складі  $\alpha$ -токсину *C. perfringens* знайдено 17 амінокислот, з яких кількісно переважали глутаминова й аспарагінова кислоти, а також лізин; серед амінокислот був відсутній метіонін. У ензиматично активному стані  $\alpha$ -токсин містить цинк, що крім ролі активації, додає молекулі токсину ще й значну стабільність. У досліджах щодо виявлення ролі цинку у ферментативній активності  $\alpha$ -токсину було встановлено, що бактерії продукують токсин у вигляді неактивного білка, і тільки після з'єднання з металом цей білок здобуває властиву йому специфічну активність.

Під дією термічної обробки  $\alpha$ -токсин втрачає лише частину своєї фосфоліпазної активності. Після нагрівання при 100 °C за 10-15 хв фосфоліпазна активність токсину зберігається приблизно на 45 %.

Антитіла до  $\alpha$ -токсину є основою захисного імунітету при газовій гангрені.

Говорити про біологічну дію  $\alpha$ -токсину трохи важко, тому що навіть високо очищені препарати токсину містять такі домішки, як гемолизин, протеазу, дезоксирибонуклеазу, фосфатазу, сульфатазу й ін. Вважається, що основу дії  $\alpha$ -токсину складають ферментативні процеси, що каталізують гідролітичне розщеплення ліпопротеїнів, що входять до складу біологічних мембран. Порушення структури і функції мембран приводить до зміни клітинної проникності, деструкції клітин і виникненню набряку. Формування набряку супроводжується зниженням окислювально-відновного потенціалу в

тканинах, активацією ендогенних протеїназ і як результат – автоліз ураженої тканини.

Гістохімічні дослідження, проведені з високоочищеним препаратом  $\alpha$ -токсину, показали, що внутрім'язове введення його морським свинкам викликало жирову дистрофію м'язів, руйнування мієліна нервів і цитоплазматичних оболонок жирових клітин, жирову декомпозицію оболонок еритроцитів і ліпемію. Колагенові, ретикулярні і еластичні волокна були відносно стійкі до  $\alpha$ -токсину. Глікоген у зоні первісного некрозу зберігався впродовж 40 хв без змін.

### ***Складні (комплексні) В екзотоксини***

У складних екзотоксинах бифункціональна система виникає без участі протеолітичних ферментів – у результаті незалежного синтезу і наступного з'єднання в комплекс активаторного й акцепторного фрагментів, і роль активації по типу протеолізу в них зводиться до перекладу активаторного фрагмента з неактивного в активний стан.

### ***Токсин *V. cholerae****

Токсин холерного вібріону відноситься до групи складних В токсинів. Холерний екзотоксин є нейтральним білком з молекулярною вагою близько 84000 дальтон. Він складається з двох нековалентно зв'язаних один з одним пептидів. Ця двухкомпонентна система стійка в нейтральній зоні рН і легко дисоціює при рН 3,2-3,5.

Молекула холерного ентеротоксина має кільцеву структуру, у якій фрагмент А оточений п'ятьма субодинамиціями фрагмента В. Фрагмент А, синтезований бактеріальною клітиною у вигляді поліпептидного ланцюга з Мм 29000, не має активності. Під дією протеаз і тіолових агентів у процесі активації токсину фрагмент А дисоціює на дві субодинамиці, одна з яких – А1-субодинамиця (Мм 23000) виконує активаторну функцію, інша – А2-субодинамиця (Мм 6000) бере участь у транспорті активатора крізь цитоплазматичну мембрану клітини-мішені. Крупномолекулярний фрагмент пептиду А являє собою димер, у якому мономери один з одним зв'язані дисульфідним містком. Незалежно від компонента В, що обумовлює взаємодію токсину з рецептором чуттєвої клітини, компонент А не здатний викликати розвиток специфічної холерної діареї. Компонент А реагує з антитоксичною сироваткою й в імунологічних тестах виявляє не ідентичність з компонентом В токсину. «Легкі» субодинамиці, що входять до складу компонентів В, з'єднані нековалентно, і цей зв'язок порушується при нагріванні в додецилсульфаті Натрію. Стабільність компонента В значно зростає при обробці його

формаліном. За даними імунохімічного аналізу компонент В холерного токсину не виявляє антигенного споріднення з компонентом А. За допомогою компонента В холерний токсин взаємодіє з гангліозидом  $G_{M1}$ , що представляє собою рецептор для цього токсину. Однак з гангліозидом вступає в специфічне зв'язування компонент В не тільки в складі цілого токсичного комплексу, але й знаходиться у вільному вигляді. Більш того, такою же здатністю володіють і окремі «легкі» субодиниці, з яких побудований компонент В.

Холерний токсин у кислому середовищі дисоціює на складові компоненти. Дисоціація супроводжується втратою активності й утворенням двох самостійних пептидів. Спонтанно утворений пептид, що відповідає компонент У токсину, був використаний для створення антитоксичного імунітету і тому став фігурувати, як чи антитоксин по-іншому, як холерогеноїд, на відміну від холерогена – терміна, що позначає цілісний токсин. Таким чином, холерогеноїд, чи антитоксин, являє собою щось інше, як компонент В інтактного токсину. Кролики, імунізовані холерним антитоксином здобувають стійкість до дії токсину при введенні його в кишечник, а рівень виявляється при цьому специфічній резистентності корелює з титром антитіл, що знаходяться в сироватці крові.

Сам по собі компонент В не має токсичних властивостей й в експерименті на тварин дає лише слабку шкірну реакцію.

Компонент В холерного токсину має клітинне походження, у той час як компонент А є позаклітинним продуктом *V. cholerae*.

Важлива роль у зв'язуванні токсину з гангліозидом належить залишкам лізіна. Очевидно, залишки цієї амінокислоти структурно входять і в область молекули, що містить антигенні детермінанти, антитіла до яких є основою антитоксичного імунітету до холери. Експериментально показано, що холерний антитоксин може бути з успіхом використаний для вакцинації проти холери.

Антитоксичні антитіла охороняють не тільки від розвитку холерного ефекту в заражених тварин, але і перешкоджають виникненню запальної реакції при внутрішкірній пробі.

Аналогічно дифтерійному токсину біологічна активність холерогена виявляється тільки за присутності акцепторного В-фрагмента. Компонент В холерного токсину є агрегатом з молекулярною вагою 56000-60000 дальтон, побудований з «легких» субодиниць. Величина «легкої» субодиниці, за даними різних авторів, варіює від 8000 до 15000 дальтон.

Біологічна дія холерного ентеротоксина зв'язана з його здатністю викликати стійку активацію мембранної аденилатциклази, що каталізує перетворення АТФ у цАМФ, шляхом інактивації білка, що зв'язує ГТФ, здійснюючу регуляцію системи через гідроліз ГТФ до ГДФ.

Аденилатциклазна система активується внаслідок приєднання до її гуанин-нуклеотидного центра ГТФ, гідроліз якого блокує її активність. Після фіксації холерогена за допомогою фрагмента В на гангліозидному рецепторі епітеліальної клітки тонких кишок фрагмент А проникає через утворений В-субодиницями канал усередину клітини, де піддається активації і розщепленню на субодиниці А1 і А2. Активаторна субодиниця А1 каталізує гідроліз NAD і перенос утвореної АДФ-рибози на білок, що зв'язує ГТФ. Ріболізування інактивує білок, що зв'язує ГТФ, унаслідок чого процес гідролізу ГТФ інгибується, а активація аденилатциклази й утворення цАМФ здобувають стійкий характер. Збільшений рівень цАМФ обумовлює порушення регуляторних процесів у клітинах кишок, зокрема збільшення швидкості виділення іонів хлору і натрію і зниження швидкості усмоктування іонів калію, що спричиняє виділення великих кількостей води. Масивна гіперсекреція води приводить до різкої втрати рідини і розвитку діареї.

Подібне з холерогеном дію виявляють також ентеротоксини, які продукуються *E. coli* і *S. enteritidis*, причому антитіла проти токсину збудника холери нейтралізують і токсини цих бактерій, що вказує на спільність їхньої хімічної структури.

### **ЕНДОТОКСИНИ**

Ендотоксини маються тільки в грамнегативних бактерій. Вони представлені ліпополісахаридами і зв'язаними з ними білками.

Основні розходження між екзо- і ендотоксинами представлені в таблиці 3.

Ендотоксини входять до складу зовнішнього шару клітинної стінки грамнегативних бактерій. За хімічною природою вони являють собою ліпополісахариди (ЛПС) і є структурним компонентом соматичного О-антигену, що, крім, ЛПС, включає також протеїн. До складу ЛПС входить ліпід А и полісахаридна область, що складається з базальної структури і про-специфічних бічних ланцюгів.

Ліпід А, що є істотною частиною ендотоксина, відповідальною за його токсичні властивості, має подібну структуру і хімічний склад у різних видів грамнегативних бактерій і складається з ацетилглюкозамина і довголанцюгових жирних кислот: лауринової, міристинової, гідроксиміристинової, пальмітинової й ін.

Базальна структура полісахарида різних грамнегативних бактерій також побудована за єдиним принципом і включає (у сальмонелл) внутрішню область, що складається з гептозних залишків і кетодіосиоктоната, і зовнішньої частини, представлену олігосахаридом, що складається з глюкози і глюкозамина.

## Розходження екзо- і ендотоксинів

Екзотоксини	Ендотоксини
Утворюються грамозитивними і грамнегативними мікроорганізмами	Утворюються грамнегативними мікроорганізмами
Виділяються живими клітинами, виявляються у високих концентраціях у рідких середовищах	Компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій, що звільняється при їхній дезинтеграції
Поліпептиди	Ліпополісахаридні комплекси, Ліпід А, мабуть, відповідальний за токсигенність
Відносно нестабільні, швидко руйнуються при температурі понад 60 °С	Відносно стабільні, витримують нагрівання понад 60 °С кілька годин без втрати активності
Високоантигенні, стимулюють утворення антитоксину, що нейтралізує токсин	Не стимулюють утворення антитоксину, викликають утворення антитіл до полісахаридів
Переходять в антигенні нетоксигенні анатоксини за допомогою формаліну, кислот, нагрівання	Не переходять в анатоксини
Високотоксичні, викликають загибель лабораторних тварин при введенні декількох чи мікрограмів навіть менше	Слабкотоксичні, викликають загибель лабораторних тварин при введенні декількох сотень мкг
Не викликають лихоманки в організмі-хазяїна	Часто викликають лихоманку у хазяїна

О-полісахариди бічних ланцюгів ЛПС, на відміну від базальної структури полісахариду і ліпиду А, характеризуються надзвичайною розмаїтістю і визначають серологічну специфічність різних бактерій. Вони побудовані з повторюваних олігосахаридних одиниць, що звичайно містять залишки, що чергуються в різній послідовності, маннози, рамнози, галактози, глюкози й один чи більш незвичайних дидезоксисахаров, таких як абеквоза, колитоza, паратоza чи тивелоза, що займають термінальне положення і грають иммунодоминантну роль.

Ліпополісахаридна фракція володіє пірогенною активністю і токсичністю, білкова – ні тієї, ні іншої, але повідомляє всьому комплексу антигенні властивості. Антисироватки до ендотоксинів не цілком нейтралізують їх токсичні властивості, що порозумівається тим, що ендотоксин індукує утворення антитіл до полісахаридної частини, а токсичність обумовлена ліпідним компонентом.

Ендотоксини мають характеристики, часто прямо протилежні таким екзотоксинів. Ендотоксини термостабільні, деякі з них витримують тривале кип'ятіння і навіть автоклавування при 120 °С впродовж 30 хвилин. При обробці формаліном ендотоксини знешкоджуються лише частково. Ендотоксини в порівнянні з екзотоксинами менш токсичні: LD<sub>50</sub> для середнього ендотоксинового препарату складає від 200 до 400 мг на мишу.

Усі три компоненти ЛПС – ліпід А, ядро полісахарида і його бічний ланцюжок з повторюваних цукрів – володіють вираженими антигенними властивостями. ЛПС стимулює синтез інтерферонів, активізує систему комплементу по класичному шляху, володіє митогенним дією щодо лімфоцитів, а також алергенною дією.

Найбільш вивчені ендотоксини ентеробактерий: сальмонелл, шигелл, ешерихий. Крім токсичності вони володіють пірогенністю – здатністю викликати підвищення температури тіла. За пірогенність, рівно як і за токсичність, відповідальна ліпідна фракція токсину.

Температура тіла тварини регулюється за допомогою механізмів, що контролюються визначеними центрами в головному мозку; багато речовин при введенні в кров викликають підвищення температури. Оскільки самі різні типи запалення супроводжуються підвищенням температури, була почата спроба знайти пірогенні сполуки в ушкоджених тканинах. Зрештою виявилось, що всі пірогенні препарати містять домішки бактеріальних ендотоксинів.

У зв'язку з цим при дослідженні пірогенності всі зусилля були спрямовані на вивчення токсинів, що, як виявилось, мають надзвичайно високу активність. Ендотоксини не діють безпосередньо на терморегуляторні центри головного мозку; вони викликають вивільнення ендогенної пірогенної речовини з поліморфноядерних лейкоцитів і макрофагів. Це речовина, хімічна природа якого дотепер невідома, і викликає підвищення температури.

Очищені ендотоксини як вірулентних, так і авирулентних ентеробактерий при уведенні тварині викликають багато патологічних симптомів. Вони є запальними агентами, що збільшують проникність капілярів і викликають руйнування клітин. Зі зруйнованих клітин у свою чергу виділяються запальні агенти, біологічно активні сполуки (гістамин, серотонин, простагландини, лейкотриєни й ін., усього більш 20), синтез яких індукується в організмі людини і тварин, і які обумовлюють розвиток поразки.

Запальна і пірогенна дія ендотоксинів неспецифічні. Хоча і той і інший ефекти, безсумнівно, вносять свій внесок у загальну картину захворювання, але не вони визначають специфічні симптоми хвороби, викликані грамнегативними патогенними бактеріями. Важливо також підкреслити, що

підвищення температури і токсикоз супроводжують важкі інфекції, викликані і грамполозитивними бактеріями, що не містять ендотоксинів.

Ендотоксини ентеробактерій при введенні їхньою твариною в невеликих дозах викликають тимчасові зміни неспецифічної стійкості до інфекції. Після введення мишам очищеної ліпополісахаридної фракції ендотоксина, перевірялася стійкість мишей до інфекції шляхом уведення їм через різні проміжки часу вірулентного штаму *E. coli*. Відразу після введення ліпополісахариду чутливість мишей до бактеріального зараження різко збільшувалося: ЛД<sub>50</sub> (число бактеріальних клітин у розрахунку на одну тварину, необхідне для загибелі 50 % випробуваних тварин) знижувалося в тисячу разів. Але впродовж наступних 24 годин їхня чутливість до інфекції сильно знижувалася: ЛД<sub>50</sub> зростала, поки не досягала величини приблизно в 100 000 разів перевищуючої ЛД<sub>50</sub> для контролю. Підвищена стійкість зберігалася 3-5 днів і потім зникала.

Роль ендотоксина в збільшенні стійкості тварин до зараження неспецифічна; очищений ліпополісахарид, отриманий з одного виду грамнегативних бактерій, виявив стійкість до зараження іншими видами грамнегативних бактерій. Механізм цього явища невідомий. Воно може грати дуже важливу роль у природі, оскільки всі ссавці (включаючи людини) постійно піддаються дії ендотоксинів кишкових бактерій.

### **Контрольні питання**

1. Фактори патогенності з токсичною функцією.
2. Локалізація і природа токсинів. Одержання бактеріальних токсинів.
3. Екзотоксини. Продуценти екзотоксинів.
4. Основні властивості екзотоксинів.
5. Одержання анатоксинів (токсоїдів).
6. Механізм дії екзотоксинів.
7. Основні групи екзотоксинів.
8. Мембрано-активні екзотоксини: гемолізени та дупліковані токсини.
9. Суперантигени. Механізм дії.
10. А-В екзотоксини.
11. Етапи взаємодії токсинів із клітинами еукаріот.
12. Прості («розрізані») А-В токсини.
13. Активація простих токсинів.
14. Розпізнавання мембранних акцепторів і зв'язування токсину з ними.
15. Складні А-В екзотоксини.
16. Активація складних токсинів. Конформаційні зміни в молекулі токсину.
17. Механізм дії складного токсину холерного вібріона. Діарея.
18. Ендотоксини. Продуценти ендотоксинів.
19. Хімічна природа ендотоксинів.

20. Будова ліпополісахариду клітинної стінки грамнегативних бактерій. Ліпід А. Базальна структура. О-полісахаріди бічних ланцюгів.
21. Основні властивості ендотоксинів.
22. Пірогенна активність.

## ОСОБЛИВОСТІ ГЕНЕТИЧНОГО КОНТРОЛЮ СИНТЕЗУ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ БАКТЕРІЙ

У бактерій виявлені 3 типи генів, що здійснюють контроль синтезу факторів патогенності: гени власної хромосоми, гени, привнесені плазмидами, гени, привнесені помірковано конвертують фагами.

Наприклад, синтез холерогена в *V.cholerae* здійснюється генами *tox*-оперона власної хромосоми. Синтез екзотоксинів і факторів адгезії в ентеротоксигенних штамів *E.coli* здійснюється генами, привнесеними Ent-плазмидами. Синтез ексфолиативного токсину типу А у стафілококів контролюється хромосомним геном, а типу В – плазмидний геном, синтез екзотоксина в *C. diphtheriae* – привнесеними *tox*-генами коринефага.

Наявність у світі бактерій додаткових джерел генів патогенності, генами яких виявилися віруси і плазмиди, безсумнівно з'явилося одним з факторів виникнення патогенних для людини тварин і бактерій.

## СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Гавришева Н.А., Антонова Т.В. Інфекційний процес: Клінічні і патофізіологічні аспекти. – Спб.: Спеціальна література, 1999. – 255 с.
2. Громов Б.В. Будівля бактерій. – Л.: Изд. Ленінградського ун-та, 1985. – 190 с.
3. Далин М.В., Фиш Н.Г. Білкові токсини мікробів. – М.: Медицина, 1980. – 223 с.
4. Езепчук Ю.В. Биомолекулярные основы патогенности бактерий. -М.: Наука, 1977. – 215 с.
5. Езепчук Ю.В. Патогенність як функція біомолекул. – М.: Медицина, 1985. – 238 с.
6. Коротяев А.И., Бабічев С.А. Медична мікробіологія, імунологія і вірусологія. – С.-Пб.: Спеціальна література, 1998. – 580 с.
7. Медична мікробіологія /Під ред. Королюк А.Н., Сбойчакова В.В. -С.-Пб., 1999. – 272 с.
8. Медична мікробіологія /Під ред. Покровського В.И., Поздеева О.К.- М.: ГЭОТАР Медицина, 1999.- 1200 с.
9. Поздеев О.К. Медична мікробіологія. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 765 с.
10. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1998. – 391 с.

Навчальне видання

Русакова Марія Юріївна  
Гудзенко Тетяна Василівна  
Єлинська Наталія Олексійовна

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСНОВИ ПАТОГЕННОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ**

*КУРС ЛЕКЦІЙ*

В авторській редакції

Підп. до друку 20.12.2018. Формат 60x84/16.  
Ум.-друк. арк.4,65. Тираж 20 пр.  
Зам. № 1833.

**Видавець і виготовлювач  
Одеський національний університет  
імені І. І. Мечникова**

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12  
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р. Р 51