

Биологические свойства бактериальных токсинов

М.В. Супотницкий

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации,
111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19
 e-mail: 27nc_1@mil.ru

Знания по биологическим свойствам бактериальных токсинов постоянно обновляются. В последние два десятилетия интерес исследователей смещался в направлении от природных токсинов к их генетически измененным производным. **Цель работы** – обобщение знаний по биологическим свойствам бактериальных токсинов, накопленных в англоязычной научной литературе за последние годы. **Метод исследования** – аналитический. **Источниковая база исследования** – в основном англоязычная научная литература, доступная через глобальную сеть «Интернет». **Результаты.** В работе рассмотрены: организация и общий механизм действия молекул бактериальных токсинов; достоверность показателей их токсичности, приведенных в научной литературе; токсическое действие токсинов различных групп, различающихся по механизму действия; получение гибридных и модифицированных токсинов; выявление искусственных токсинов. **Выводы.** Среди бактериальных токсинов наибольшую опасность представляют бинарные токсины. Бинарный состав экзотоксинов бактерий, хорошая изученность их субъединиц, функциональных доменов, механизмов сборки и внутриклеточного действия позволяют вести их модификацию в направлении изменения спектра целей, токсичности, механизма поражающего действия и иммуногенности. Для выявления генетически измененных токсинов, малоизученных аналогов и изоформ природных токсинов могут быть использованы специальные программы, основанные на машинном обучении.

Ключевые слова: бинарный токсин; ботулинический; гибридный; дифтерийный; мембраноповреждающий; модифицированный; рекомбинантный; стафилококковый; столбнячный; токсин.

Для цитирования: Супотницкий М.В. Биологические свойства бактериальных токсинов. Вестник войск РХБ защиты. 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>

Прозрачность финансовой деятельности: автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

Конфликт интересов: автор является заместителем главного редактора журнала (с 2017 г.).

Финансирование: федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации (27 НЦ МО РФ).

Поступила 30.12.2023 г. Принята к публикации 27.03.2024 г.

The Biological Properties of Bacterial Toxins

Mikhail V. Supotnitskiy

Federal State Budgetary Establishment “27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky”
of the Ministry of Defence of the Russian Federation
Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation
 e-mail: 27nc_1@mil.ru

© М.В. Супотницкий, 2024

Journal of NBC Protection Corps. 2024. V. 8. No 1

Knowledge of the biological properties of bacterial toxins is constantly being updated. Over the past two decades, the research interest has shifted from natural toxins to their genetically modified derivatives. **The purpose of the work** is to summarize the knowledge of the biological properties of bacterial toxins accumulated in the English-language scientific literature in recent years. **The research method** is analytical. **The source base for the research** is English-language scientific literature, accessible through the global Internet. **Results.** The work examines: the organization and general mechanism of action of bacterial toxin molecules; the reliability of their toxicity indicators given in the scientific literature; toxic effects of toxins of various groups, differing in their mechanism of action; obtaining hybrid and modified toxins; identification of artificial toxins. **Conclusions.** Among bacterial toxins, binary toxins are the most dangerous. The binary composition of bacterial exotoxins, a good understanding of their subunits, functional domains, assembly mechanisms and intracellular action, make it possible to modify them in the direction of changing the range of targets, toxicity, mechanism of damaging action and immunogenicity. To identify genetically modified toxins, poorly studied analogues and isoforms of natural toxins, special programs based on machine learning can be used.

Keywords: binary toxin; botulinum; diphtheria; hybrid; membrane damaging; modified; recombinant; staphylococcal; tetanus; toxin.

For citation: Supotnitskiy M.V. The Biological Properties of Bacterial Toxins. *Journal of NBC Protection Corps.* 2024;8(1):34–64. EDN:jtrfxo.
<https://doi.org/10.35825/2587-5728-2024-8-1-34-64>

Financial Disclosure: The author has no financial interests in the submitted materials or methods.

Conflict of interest statement: The author is deputy Editor-in-Chief of the journal since 2017.

Funding: Federal State Budgetary Establishment “27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky” of the Ministry of Defence of the Russian Federation (27 SC MD RF).

Received 30 December 2023. Accepted 27 March 2024

Токсины бактерий – один из факторов, определяющих их патогенность. Некоторые из бактериальных токсинов полностью ответственны за основные клинические симптомы инфекционной болезни (дифтерия, коклюш, холера, сибирская язва, ботулизм, столбняк, гемолитический уремиический синдром и др.). У отдельных бактериальных токсинов летальные дозы, определенные на экспериментальных животных, на порядок меньше, чем у боевых отравляющих веществ (например, ботулинический, стафилококковый токсин В), поэтому они рассматриваются как потенциальные поражающие агенты биологического оружия (БО). Знания по бактериальным токсинам постоянно обновляются. В последние два десятилетия интерес исследователей смещался в направлении от природных токсинов к их генетически измененным производным с ранее неизвестными свойствами. Поэтому крайне важно иметь представление о том, на основе каких биологических свойств токсинов могут идти такие исследования.

Цель работы – обобщение знаний по биологическим свойствам бактериальных токсинов, накопленных в англоязычной научной литературе за последние годы.

Метод исследования – аналитический.

Источниковая база исследования – в основном англоязычная научная литература, доступная через глобальную сеть «Интернет».

В работе рассмотрены: организация и общий механизм действия молекул бактериальных токсинов; достоверность показателей их токсичности, приведенных в научной литературе; токсическое действие токсинов различных групп, различающихся по механизму действия; получение гибридных и модифицированных токсинов; выявление искусственных токсинов.

Общие знания о бактериальных токсинах. Бактерии производят два вида токсинов: липополисахаридные и белковые. **Липополисахаридные токсины** – это токсичные субстанции липополисахаридной природы, высвобождаемые из клеточной стенки бактерии после ее разрушения. Их еще называют эндотоксинами – в данной работе не рассматриваются. **Белковые токсины** синтезируются внутри бактериальных клеток, выделяются в окружающую среду (экзотоксины) и через свои высокоспецифичные рецептор-связывающие субъединицы взаимодействуют с клетками-мишенями. Экзотоксины представляют собой либо отдельные сложные белки, специфически формирующие поры в цитоплазма-

тической мембране клетки, либо белковые комплексы, организованные в АВ-структуры (АВ toxins), где А-субъединица в цитоплазме клетки проявляет ферментативные (токсические) свойства; В-субъединица определяет ее лиганд-рецепторное взаимодействие с клеткой. Токсины такого типа сегодня рассматриваются учеными как своего рода природные заготовки токсинов с новыми мишенями.

Ю.В. Вертиев [1] обратил внимание ученых на сходство бактериальных токсинов, интерферонов, бактериоцинов и гормонов в отношении целого ряда важных свойств: 1) синтезируются одним типом клеток, в то время как воздействуют на другие типы клеток; 2) действуют на клетки в чрезвычайно низкой концентрации (10^{-11} – 10^{-14} М); 3) обладают сходной молекулярной организацией: т.е. состоят как минимум из двух функционально и структурно различных белков (доменов) – энзиматического и рецепторного (АВ-структура молекулы токсина, см. ниже); 4) имеют сходные звенья молекулярного механизма действия (связывание с рецепторами, активация, транслокация внутрь клетки и модификация клеточных мишеней и сигнальных путей); 5) обнаруживают сходную кинетику биологического эффекта – одноударный эффект; 6) все эти вещества токсичны.

Двухкомпонентный состав и одноударность действия бактериальных токсинов, закрепленные естественным отбором, можно объяснить, сделав предположение, что способность синтезировать токсины позволяла бактерии еще на заре многоклеточной жизни реализовывать какую-то сигнальную функцию в их экосистемах. Преимущество такой структуры для передачи сигналов заключается в том, что при ее распространении из центра сигнал не ослабляется на большом расстоянии. Если бы передача сигнала осуществлялась структурами, не способными к лиганд-рецепторному взаимодействию, то сигнал ослабевал бы по мере диффузии сигнальных молекул. Отсюда, как следствие, способность воздействовать на другие типы клеток в чрезвычайно низких концентрациях [1].

К настоящему времени накоплены данные, показывающие возможность выполнения бактериальными токсинами функций, не имеющих отношения к инфекционным процессам у людей и животных. Среди них: использование бактериями токсинов как средства антагонизма в микробных сообществах (холерный токсин оказывает ингибирующее действие на ряд бактерий); участие токсинов в авторегуляторных процессах в

бактериальных популяциях (энтеротоксин *Clostridium perfringens*) и др. [2]. Рассмотрение таких функций также не входит в задачу данной работы.

Организация и общий механизм действия молекул бактериальных токсинов. S.M. Bezrukov и E.M. Nestorovich [3] по механизму действия на клетки делят токсины на две большие группы: мембраноповреждающие (мембраноперфорирующие) и действующие с помощью каталитического домена на мишени в цитозоле клетки. Как те, так и другие, используют порообразующие или каналообразующие домены в своем составе.

Токсическое действие мембраноповреждающих токсинов проявляется в нарушении целостности мембраны клетки. Для проявления токсичности им не нужен каталитический домен. После связывания с рецептором на поверхности клетки они олигомеризуются с образованием поры, внедряющейся непосредственно в плазматическую мембрану. Сформированные в мембране каналы приводят к нарушению ионного обмена клетки с окружающей ее средой, создается осмотический дисбаланс, и клетка гибнет.

Действие токсинов на мишени в цитозоле клетки заключается в ферментативной модификации этих мишеней и осуществляется путем введения ферментативных субъединиц через сформированные ими же каналы. Структура таких токсинов предполагает наличие двух компонентов: А- и В-субъединиц, где А-субъединица (каталитический домен) проявляет энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина; В-субъединица «узнает» клетку-мишень и доставляет А-субъединицу в цитозоль клетки-мишени через формируемую пору в мембране. Поэтому такие токсины еще называют *бинарными*.

В-субъединица состоит из двух функциональных доменов: *рецептор-связывающего* домена, определяющего тропизм молекулы токсина к определенным клеткам; и *транслокационного* домена, доставляющего А-субъединицу через липидный бислой на плазматическую мембрану или в эндосому клетки-мишени. Структура В-субъединиц тесно связана со структурой рецепторов-мишеней, с которыми взаимодействует токсин. Рецепторы токсинов обычно распределены на плазматической мембране в *липидных рафтах*, обогащенных холестерином и гликофинголипидами. Они обеспечивают молекулярную платформу для кластеризации белков, участвующих в передаче сигнала в клетку, запускающего эндоцитоз ферментативной субъединицы и ее последующий

ретроградный транспорт через ранние эндосомы в эндоплазматический ретикулум (ЭР) и через аппарат Гольджи. А-субъединицы более консервативны, чем В-субъединицы, особенно в участках, критических для проявления их ферментативной активности. Большинство бинарных токсинов изначально синтезируются в виде неактивных токсинов (двух отдельных полипептидов) и для их активизации необходим протеолитический процессинг, сходный с тем, который обеспечивает проникновение в клетку вирусов¹ [4–6].

Процесс интоксикации требует участия факторов хозяина, таких как клеточные рецепторы, фуриновые протеазы, факторы трафика и факторы транслокации А-субъединицы и др. Генетические скрининги соматических клеток выявили двенадцать генов хозяина, необходимых для интоксикации цитолетальным токсином, вызывающим растяжение клеток (cytotoxic distending toxin, CDT), и растительным токсином – рицином [7, 8].

Кроме взаимодействия с рецептором клетки-мишени, по мнению Ю.В. Вергиева [1], В-субъединица имеет еще одну важную функцию – предохранителя, предотвращающего «случайный выстрел». Она экранирует ферментативную субъединицу, предотвращая ее случайное взаимодействие с субстратом в клетке-мишени и за ее пределами². Активация токсической субъединицы происходит после протеолитического расщепления В-субъединицы (В-прекурсора), наступающего после ее взаимодействия с клеткой-мишенью.

Бинарные токсины, как правило, являются крупными функциональными белковыми агрегатами. Эволюционно образование таких агрегатов возможно путем объединения двух или более белков в результате как нековалентных взаимодействий (си-

биреззвенный, коклюшный и другие токсины), так и путем образования ковалентной связи между ними (ботулинические и столбнячные токсины). В свою очередь отдельные субъединицы токсинов так же состоят из некогда различных белков, объединенных в пептид, проявляющий несколько активностей сразу. Например, тяжелые цепи ботулинического и столбнячного токсина содержат два домена – регион, необходимый для транслокации токсина, и регион, необходимый для связывания с клеткой. Белки такого типа образовались в эволюционном прошлом слиянием соответствующих генов в один ген, кодирующий полипептидную цепь.

Для бактериальных токсинов характерен «феномен экономии генов», проявляющийся в сходстве их субъединиц на молекулярном и макромолекулярном уровнях, но различным участием в инфекционном процессе. Холерный токсин (СТ-токсин) и относящийся к его семейству температуролабильный энтеротоксин кишечной палочки (LT-токсин) имеют по пяти идентичных В-субъединиц, а коклюшный токсин имеет четыре различных В-субъединицы, но две из В-субъединиц коклюшного токсина свертываются аналогично В-субъединичным пентамерам семейств холерного токсина и шига-токсина [10]. Внекишечная патогенная кишечная палочка (Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*; ExPEC), представитель семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирует коклюшноподобный токсин (*Escherichia coli* pertussis-like toxins; EcPlt)³, который на 50–70 % идентичен белкам *Salmonella* ArtA⁴ [12]. По крайней мере пять АДФ-рибозилирующих токсинов (коклюшный, холерный и дифтерийный токсины, температуролабильный токсин кишечной палочки и экзотоксин А псевдомонад) имеют общий НАД-связывающий сайт [10]. Участок протяженностью в 100 аминокислот ферментативного до-

¹ Например, *фурин* и подобные ему сериновые эндопротеазы на поверхности клетки-мишени, необходимы для отделения узнающей специфический рецептор субъединицы гликопротеина оболочки ВИЧ, вирусов гриппа, лихорадки Денге, SARS-CoV-2, от той, которая обеспечивает проникновение его нуклеиновой кислоты в клетку [9].

Частным случаем АВ-структур являются трехкомпонентные токсины типа сибиреззвенного со структурой типа А1-В-А2, где В – это субъединица, участвующая в связывании токсина с рецептором; А1 и А2 – субъединицы, проявляющие различную энзиматическую (токсическую) активность в клетке хозяина. Трехкомпонентные токсины используют общую В-субъединицу, обеспечивающую ферментативным субъединицам единый механизм проникновения в цитозоль. Такая организация молекулы токсина необходима для проявления синергидного эффекта токсического действия ферментативных субъединиц.

² Сходным образом организованы гликопротеины вирусов, выполняющие функцию узнавания и слияния с клеткой [11].

³ Коклюшноподобные токсины, продуцируемые другими бактериями, менее изучены, механизмы их патогенного действия неясны [12].

⁴ Гены *ArtA* и *ArtB*, кодируемые профагом *S. typhimurium* DT104, являются гомологами генов, кодирующих компоненты коклюшного токсина, включая его субъединицу АДФ-рибозилтрансферазы [17].

мена цитотоксического некротизирующего фактора первого типа (cytotoxic necrotising factor I, CNF1), гомологичен участку ферментативного домена дермонекротического токсина бордетелл. Оба одинаковых участка выполняют одинаковую функцию – активируют Rho⁵ [13].

Обнаружено сходство между ферментативными субъединицами токсинов бактерий и ферментами эукариот. Отечный фактор сибиреязвенного микроба представляет собой аденилатциклазу, по кинетическим и по антигенным свойствам имеющую сходство с действующей на ту же мишень кальмодулин-зависимой аденилатциклазой эукариотических клеток [14, 15].

Особенности процесса самосборки субъединиц на мембране клетки-мишени позволяют разделить бинарные токсины на группы: АВ-токсины, А+В- и токсины АВ_х,

где х – количество субъединиц В (обычно 2, 5 или 7).

В *одноцепочечных АВ-токсинах* стехиометрия АВ составляет 1:1, и токсин синтезируется бактерией в виде одной полипептидной цепи. Обе субъединицы связаны межцепочечной дисульфидной связью. Это связывание через *восстановление дисульфидной связи*⁶ нарушается по пути их проникновения в эндолизосомы, что приводит к высвобождению каталитического домена в цитозоль клетки-мишени. Примерами таких токсинов являются *ботулинический* (BoNT) и *столбнячный* (TeNT) нейротоксины; *дифтерийный* токсин (Dt); *рициновый* токсин (Rtx) и *экзотоксин А псевдомонад* [16]. На *рисунке 1* показаны особенности структуры АВ-токсинов.

Токсины АВ₂ и *АВ₅* состоят из двух и пяти идентичных В-субъединиц соответ-

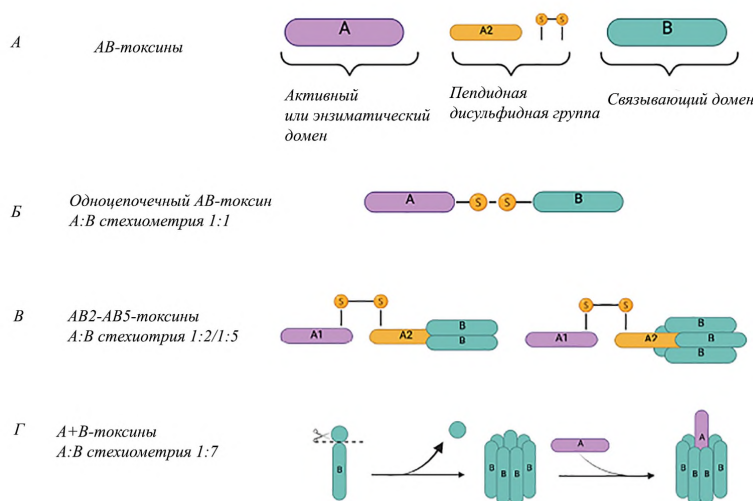


Рисунок 1 – Общая схема активных форм различных типов бинарных токсинов. А – А-субъединица обладает энзиматической активностью, В-субъединица связывает молекулу токсина с рецептором на поверхности клетки-мишени. В зависимости от типа бинарного токсина между субъединицами может находиться линкер, включающий пептидную и/или дисульфидную группу. АВ-токсин становится активным в результате протеолитического расщепления между А- и В-субъединицами или в их пределах. Такие токсины классифицируют в соответствии с их стехиометрией. Б – одноцепочечный АВ-токсин синтезируется бактерией в виде отдельной полипептидной цепи. Его стехиометрия 1:1 А:В. Обе субъединицы соединены через межцепочечную дисульфидную связь. В – А- и В- субъединицы продуцируются бактерией в виде отдельных белков и собираются в голотоксин уже после их синтеза. В активной форме протеолитическое расщепление имеет место в пределах А-домена, образуя А1- и А2-домены, которые остаются связанными через дисульфидную группу. Г – в токсинах типа А+В, субъединицы А и В собираются в активированную форму после того, как фрагмент В подвергнется протеолитическому расщеплению. В этом случае голотоксин обычно находится в форме АВ₇. Члены семейства токсинов АВ_х состоят из семи порообразующих субъединиц В, которые действуют как молекулярный шприц для перемещения ферментативных фрагментов А в цитозоль клеток-мишеней [16]

⁵ Субсемейство маленьких ГТФ-связывающих белков, участвующих в модификации регуляторов актина цитоскелета.

⁶ Восстановление дисульфидной связи – разрыв ковалентной связи между атомами серы (—S—S—).

ственно, связанных с одной каталитической А-субъединицей без образования ковалентной связи между ними. Их домены А и В синтезируются независимо друг от друга и собираются путем формирования водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий в олигомер, состоящий из одной молекулы А, связанной с димером или пентамером из В-субъединиц. Голотоксин⁷ собирается сразу после синтеза обеих субъединиц. Примечательной особенностью каталитической А-субъединицы токсинов АВ₅ является то, что, хотя это один полипептид, после протеолитического расщепления образуются два домена (А1 и А2), связанных между собой дисульфидной связью. А1 представляет собой каталитическую часть, а

А2 – α-спиральный линкерный домен, связывающий субдомен А1 с пентамером В. Он нековалентно вставляется в центральную пору, образующуюся при образовании пентамера из В-субъединиц, и доставляется в цитозоль клетки. Токсины АВ₅ подразделяются на четыре различных семейства в соответствии с гомологией последовательностей А-субъединиц и их каталитической активностью: семейство холерного токсина (Ctx), семейство коклюшного токсина (PТ), семейство шига-токсина (Stx) и субтилазный цитотоксин (SubAB) [5, 16]. Сравнительный механизм действия бинарных токсинов разного типа самосборки показан на рисунке 2.

Токсины А+В синтезируются бактериальной клеткой в виде двух отдельных поли-

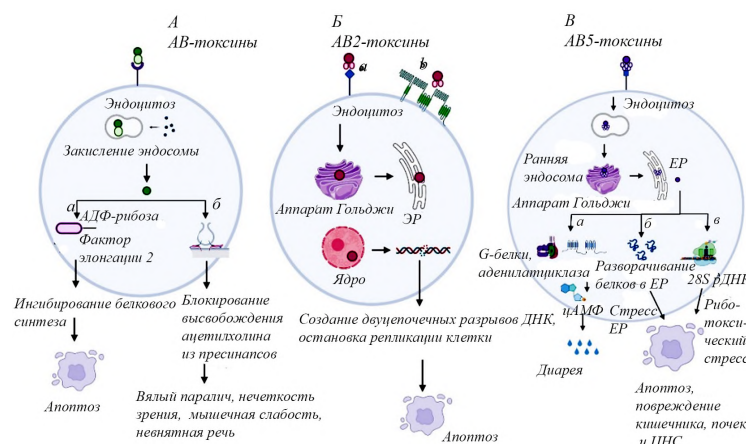


Рисунок 2 – Сравнительный механизм действия бинарных токсинов различного типа самосборки. А – АВ-токсины. Субъединица В токсинов АВ-типа связывается с целевыми рецепторами клеток-хозяев, инициируя рецептор-опосредованный эндоцитоз. Затем внутренняя среда эндосомы закисляется и субъединицы А и В диссоциируют. В случае дифтерийного токсина и экзотоксина *A. aeruginosa*, субъединица А нацелена на фактор элонгации 2, ингибируя синтез белка клетки-хозяина и вызывая апоптоз клетки (а). Субъединица А (легкая цепь) ботулинических нейротоксинов расщепляет специфические белки в комплексах растворимый N-этилmaleимид-чувствительный фактор-активирующий белок-рецептор (SNARE), блокируя высвобождение ацетилхолина из пресинаптических нервных окончаний (б). Слияние везикул, содержащих нейромедиаторы, с пресинаптическими мембранами не происходит, что приводит к вялому параличу, мышечной слабости, нечеткости зрения и невнятной речи; Б – Токсины АВ₂ – CDT. Субъединица В токсинов АВ₂ связывается со специфическими ганглиозидными рецепторами клетки-хозяина (а) или с микродоменами мембранного липидного рафта (б), что позволяет субъединице А подвергаться эндоцитозу. Затем субъединица А локализуется в ядре через аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум (ЭР) и использует свою ДНКазную активность типа I для создания двухцепочечных разрывов в хромосомной ДНК клетки-хозяина, необратимо останавливая клетку в фазе G2/M клеточного цикла с последующей индукцией апоптоза; В – Токсины АВ₅ – холерный, коклюшный, шига-токсины. Голотоксин связывается со специфическими рецепторами на поверхности клеток-хозяев, подвергается эндоцитозу и ретроградному транспорту через ранние эндосомы в ЭР и через аппарат Гольджи. В ЭР голотоксин расщепляется, позволяя субъединице А проявлять свои цитотоксические эффекты. Субъединица А токсинов АВ₅ воздействует на G-белки и аденилатциклазу, что увеличивает внутриклеточные уровни цАМФ и приводит к секреции жидкости в кишечник и диарее (а). Также она нацелена на белки-шапероны ЭР, что приводит к накоплению развернутых белков в ЭР и активирует стрессовую реакцию ЭР (б). Затем субъединица А связывает целевые остатки в 28S рРНК, в результате ингибируется синтез белка, инициируются реакция риботоксического стресса (в) и апоптоз клетки [5]

⁷ Голотоксин – любой белковый токсин со структурой, собранной из нескольких субъединиц.

пептидов. Чтобы собраться в олигомерную форму домен В должен подвергнуться обработке фуриновыми протеазами хозяина, расположенными на поверхности клетки-мишени. Олигомеризуясь он рекрутирует фрагмент А – формируется голотоксин. Стехиометрия АВ₇ означает наличие семи одинаково процессированных фрагментов В, нековалентно связанных с одной субъединицей А (рисунок 1Г). Так обстоит дело с токсином возбудителя сибирской язвы (Atx) и токсином С2 бактерии *Clostridium botulinum* [18, 19].

Достоверность показателей токсичности бактериальных токсинов в научной литературе. Следует учитывать, что количественные показатели токсичности, приведенные в научной литературе, могут иметь ограничения, обусловленные множеством факторов [20]:

- в разных отчетах использовались токсины различной чистоты, особенно в прошлом, когда методы определения химической и физической однородности белковых препаратов не были стандартизированы;

- в старых работах токсичность выражалась как минимальная смертельная доза, которая определяется как минимальная доза токсина, способная вызвать гибель животного (либо всех животных группы – LD₁₀₀, либо половину группы – LD₅₀ и др.), но у разных экспериментаторов существуют различия в количестве используемых животных и времени, проходящем от введения токсина до гибели животного;

- количество белковых токсинов в прошлом часто измерялось не в единицах массы токсина, используемой для эксперимента, а в флокулирующих единицах или в миллиграммах азота⁸;

- большинство данных получены в результате экспериментов на мышах, но ток-

сичность того или иного токсина сильно зависит от вида животного;

- в разных лабораториях использовались разные линии одного вида животных;

- использовались различные пути заражения животных и сами животные содержались в разных условиях;

- токсичность, зарегистрированная в лаборатории, всегда ниже, чем соответствующая токсичность, встречающаяся в дикой природе (например, даже незначительные нарушения зрения у экспериментального животного, которые являются первыми очевидными симптомами ботулизма, не влияют на выживаемость в вольере⁹, но смертельны в дикой природе, когда животное становится беззащитным перед хищником).

Поэтому данные о токсичности того или иного токсина необходимо собирать в виде диапазонов или интервалов, суммирующих данные из разных отчетов или понимать, что они отражают конкретные условия, существовавшие в лаборатории на момент их определения или определять самому под конкретные задачи.

Классификация бактериальных токсинов. Выше мы рассмотрели классификацию токсинов по типам самосборки на клеточной мембране. Наиболее оптимальной для цели данной работы нам представляется классификация С. Schmitt с соавт. [21], подразделяющая все токсины на пять групп по механизму действия, и упрощающая понимание их поражающего действия в качестве потенциальных агентов БО и их прекурсоров (таблица 1 и рисунок 3).

Порообразующие токсины (pore-forming toxins, PFTs) – принадлежат к самому большому семейству факторов вирулентности патогенных бактерий и представляют собой наиболее характерные классы порообразующих белков (pore-forming proteins, PFPs)¹⁰.

⁸ Определение белка по содержанию азота основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может быть принято равным 16 %. По количеству найденного азота во взятой пробе рассчитывают содержание белка в лекарственном средстве, используя коэффициент пересчета азота на белок, равный 6,25. На результаты определения будут оказывать влияние другие азотсодержащие вещества, присутствующие в испытуемом образце (ОФС.1.2.3.0012.15. Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018).

⁹ То же произойдет с человеком в условиях боевых действия или при каких-либо других катастрофических событиях, исключающих своевременную медицинскую помощь.

¹⁰ Порообразующие белки идентифицированы во всех царствах живых организмов (животные, растения, грибы, бактерии, протисты и археи). У животных – как часть их иммунной системы [25]. Например, архитектура поры, образованная перфорином млекопитающих (продуцируются цитотоксическими Т-клетками и натуральными киллерами), сходна архитектурой поры, образованной бактериальными токсинами из подсемейства холестеринзависимых цитолизинов. У некоторых видов животных порообразующие белки играют роль в антибактериальной защите. В кожных выделениях, в крови и тканях, связанных с иммунной системой лягушек (*Bombina orientalis*), идентифицирован аэролизин-подобный белок, способный противодействовать микробной инфекции, вызывая быстрые и эффективные врожденные иммунные реакции хозяина [26]. Порообразующие белки рассматриваются в качестве антибактериальных токсинов [27].

Таблица 1 – Характеристика бактериальных токсинов

Микроорганизм / Токсин	Механизм действия	Мишень	Заболевание	Участие токсина в болезни	LD ₅₀ / кг
Повреждающие мембраны					
<i>Aeromonas hydrophila</i> / Аэролизин	Пороформирующий	Гликопротеин	Диарея	(да)	~7мкг (м)
<i>Clostridium perfringens</i> / Перфринголизин О	То же	Холестерин	Газовая гангрена	?	
<i>Escherichia coli</i> / Гемолизин ^d	То же	Плазматическая мембрана	Инфекция уринарного тракта	(да)	-
<i>Listeria monocytogenes</i> / Листеролизин О	То же	Холестерин	Системные пищевые инфекции, менингиты	(да)	3-12 мкг (м)
<i>Staphylococcus aureus</i> / альфа-токсин	То же	Плазматическая мембрана	Абсцессы ^c	(да)	40-60 нг (м)
<i>Staphylococcus pneumoniae</i> / Пневмолизин	То же	Холестерин	Пневмония ^c	(да)	~1,5 мкг (к)
<i>Streptococcus pyogenes</i> / Стрептолизин О	То же	Холестерин	Стрептококковая ангина, скарлатина ^c	?	~8 мкг (м) 1-2 мкг (к)
Ингибиторы белкового синтеза					
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> / Дифтерийный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	Фактор элонгации-2	Дифтерия	Да	~1,6 мкг (м) 100 нг (ч)
<i>E. coli</i> / <i>Shigella dysenteriae</i> / Шига-токсин	Н-гликозидаза	28SpPHK	Геморрагический колит, гемолитический уремический синдром	Да	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / экзотоксин А	АДФ-рибозил-трансфераза	Фактор элонгации-2	Пневмония ^c	(Да)	~3 мкг (м)
Активаторы путей вторичных мессенджеров					
<i>E. coli</i> : Цитотоксический никротизирующий фактор	Деамидаза	Rho G-белки	Инфекция уринарного тракта	?	-
Термолабильный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белки	Диарея	Да	-
Температурно стабильный токсин ^d	Стимуляция гуанилатциклазы	Гуанилатциклазный рецептор	То же	Да	-
Цитолетальный токсин, вызывающий растяжение клеток - CDT (Cytolethal Distending Toxin) ^d	Блокирование G2	Неизвестна	То же	(Да)	-
EAST	СТ-подобный?	Неизвестна	То же	?	-
<i>B. anthracis</i> / Отечный фактор	Аденилатциклаза	АТФ	Сибирская язва	Да	-
<i>Bordetella pertussis</i> / Коклюшный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белки	Коклюш	Да	21 мкг (м)
Дермонекротический токсин	Деамидаза	Rho G-белки	Риниты	(Да)	-
<i>Clostridium botulinum</i> / C2-токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	Мономерный G-актин	Ботулизм	?	-
<i>C. botulinum</i> / C3 токсин	То же	RhoG-белок	Ботулизм	?	-
<i>Clostridium difficile</i> / Токсин А	Гликозилтрансфераза	RhoG-белок(и)	Диарея / РС	(Да)	-
Токсин В	То же	То же	То же	?	-
<i>Vibrio cholerae</i> / Холерный токсин	АДФ-рибозил-трансфераза	G-белок(и)	Холера	Да	~250 мкг (м)
Активаторы иммунного ответа					
<i>S. aureus</i> / Энтеротоксины	Суперантиген	TCR и MHC II	Пищевое отравление	Да	20-50 мкг (о)

Микроорганизм / Токсин	Механизм действия	Мишень	Заболевание	Участие токсина в болезни	LD ₅₀ / кг
Эксфолиативный токсин	Суперантиген (и сериновая протеаза?)	То же	Синдром шелушения кожи	Да	-
<i>S. pyogenes</i> / Пирогенный экзотоксин	То же	То же	Скарлатина / синдром токсического шока ^с	Да	3–6 мг (м)
Токсин синдрома токсического шока	Суперантиген	То же	Синдром токсического шока ^с	Да	-
Протеазы					
<i>B. anthracis</i> / Летальный фактор	Металлопротеаза	МАРКК1/МАРКК2	Сибирская язва	Да	<114 мкг (м)
<i>C. botulinum</i> / Нейротоксины А-С	Цинк-металлопротеазы	VAMP / синаптобrevин, SNAP-25, синтаксин	Ботулизм	Да	0,5–1,2 нг (м)
<i>Clostridium tetani</i> / Столбнячный токсин	То же	VAMP / синаптобrevин	Столбняк	Да	~1 нг (м)

Таблица составлена автором по данным С. Schmitt с соавт. [21].

Примечание.
Да – строго доказанная связь между токсином и болезнью; (Да) – роль в патогенезе была показана на животных моделях или клеточных культурах; ? – неизвестно; с – другие болезни также ассоциированы с этим организмом; d – токсин продуцируется и другими семействами бактерий; (м) – мышь; (к) – кролик; (ч) – человек; (о) – обезьяны.

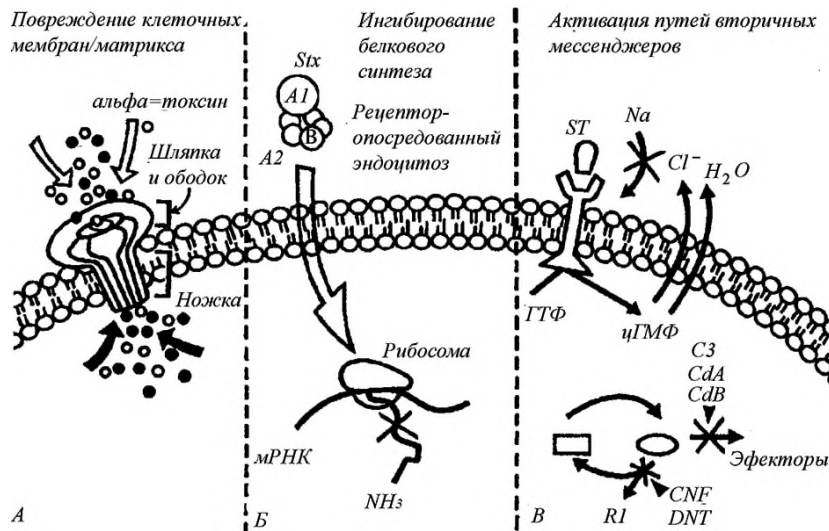


Рисунок 3 – Сопоставление механизма действия бактериальных токсинов. А – Повреждение клеточных мембран альфа-токсином *S. aureus*. После связывания и олигомеризации, ножка похожего на шампиньон гептамера альфа-токсина вставляется в мембрану клетки-мишени и вызывает приток, или наоборот, отток из клетки ионов (обозначены как темные и светлые кружки соответственно). В – Ингибирование белкового синтеза клетки шига-токсином. Голотоксин, состоящий из энзиматически активной субъединицы (А) и пяти связывающих субъединиц (В), входит в клетку через глоботриазилцерамидный рецептор (Gb3). Затем А-субъединица, обладающая N-гликозидной активностью, отсекает аденозиновый остаток с 28S рибосомальной РНК, что останавливает белковый синтез. С – Примеры бактериальных токсинов, активирующих пути вторичных мессенджеров. Связывание температурно-стабильного энтеротоксина (ST) с рецептором гуанилатциклазы приводит к увеличению количества цГМФ, который обращает в обратную сторону ток электролитов. Посредством АДФ-рибозилирования или гликозилирования (соответственно) экзоэнзим С3 *S. botulinum* и токсины А (Cda) и В (Cdb) *S. difficile* инактивируют небольшие Rho ГТФ-связывающие белки. Цитотоксический некротизирующий фактор (CNF) *E. coli* и дермонекротический токсин (DNT) бактерий рода *Bordetella*, активируют Rho через дезаминирование. Для всех токсинов характерна «мультидоменная» структура. Это означает, что разные их части состоят из некогда отдельных глобулярных белков, объединенных естественным отбором в ходе конвергентной эволюции. По С. Schmitt с соавт. [21]

К ним относят бактериальные токсины, функционирующие посредством вставки в плазматическую мембрану хозяина и формирующие в ней трансмембранные поры (каналы), приводящие клетку к лизису. Порообразующие токсины распространены как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий, также они продуцируются археями и эукариотами. Всего их не менее шести семейств с подсемействами (колицины, гемолизины, аэролизины, актинопорины, цитолизины, RTX-токсины¹¹), различающимися по рецепторам узнавания клеток-мишеней, механизмам формирования поры, структурой поры, патологическому действию и другими особенностями. В полимикробных нишах бактерии используют порообразующие белки для конкуренции с другими микробами [22].

Участие в патогенезе болезни человека. Заключается в разрушении эпителиальных барьеров; модулировании или уничтожении клеток иммунной системы; способствовании распространению и росту бактерий; в формировании биопленок; изменении клеточных сигнальных путей, управляющих пролиферацией клеток, воспалительными реакциями, секрецией цитокинов и межклеточными взаимодействиями [23, 24].

Механизмы образования пор порообразующими токсинами. В эукариотических и в прокариотических клетках плазматическая мембрана состоит из двух листов амфипатических фосфолипидов, образующих полупроницаемый физический барьер, отделяющий цитоплазму от внеклеточной среды. Мембрана избирательно проницаема благодаря действию трансмембранных белков, участвующих в различных процессах, от передачи сигнала до транспорта ионов и питательных веществ. Ее целостность необходима для выживания и устойчивости клеток. Разрушение плазматической мембраны считается одним из древних механизмов уничтожения клеток и механизмом проникновения бактерий в многоклеточные организмы [24, 28].

Первый этап образования пор состоит в связывании протомеров токсина с рецептором на поверхности мембраны клетки-мишени. Рецепторами могут быть липиды, гликаны или белки. Связывание с рецептором обычно выполняет две функции: повышения локальной концентрации токсина и его олигомеризация. По механизму порообразования в зависимости от того, состоит

ли структура, принятая их трансмембранной областью, из α -спиралей или амфипатических β -цепей, такие токсины можно разделить на два класса: α -PFT и β -PFT [22].

Большинство α -PFT связываются со специфическими рецепторами. Они одновременно встраиваются в мембрану и олигомеризуются с образованием конечной поры. Механизм образования пор может приводить к образованию незавершенной поры, которая, тем не менее, сохраняет свою функцию. Олигомеризация и мембранная вставка α -PFT обычно сопутствуют, что приводит к более гибкой молекулярной организации α -PFT и делает этот класс токсинов гетерогенным по своей структуре [28].

В альтернативном пути – β -PFT, сначала происходит стадия олигомеризации с последовательным добавлением мономеров на границе мембраны для создания промежуточной структуры, называемой *препорой*. Как только олигомеризация завершена, препоровые субъединицы претерпевают конформационные изменения, чтобы согласованно встроиться в мембрану. В конечной активной поре одна или несколько β -цепей каждого мономера способствуют образованию β -ствола (цилиндра), проходящего через мембрану. Внутри β -цилиндрической структуры устанавливаются водородные связи между боковыми цепями аминокислот различных мономеров, что в конечном итоге придает порам высокую структурную жесткость и стабильность. Стехиометрия и, следовательно, конечный размер просвета пор, образуемых представителями разных семейств токсинов, могут существенно различаться. Поры, формируемые PFT, варьируют от мономерных, вызывающих небольшие повреждения мембран, до очень больших пор, таких как наблюдаемые для холестеролизисных цитолизинных (cholesterol-dependent cytolysins, CDC), состоящих из 30–50 субъединиц [28].

Способность пор различать разные ионы определяется фильтрами селективности. Селективность фильтра диктуется природой аминокислот, выстилающих наиболее узкую часть просвета поры и специфически взаимодействующих с транспортируемыми ионами [29]. Схематическое изображение механизмов образования пор порообразующими токсинами приведено на *рисунке 4*.

Образование пор приводит к выходу из клетки калия и АТФ. Снижение концен-

¹¹ Токсины RTX (repeats-in-toxin) – суперсемейство, насчитывающее более тысячи цитолизинных и цитотоксических, продуцируемых грамотрицательными бактериями. Получили такое название из-за характерных, богатых глицином и аспаратом, нонапептидных повторов: GGXG(N/D)DX(L/I/V/W/Y/F)X, который образует β -ролл и участвует в связывании ионов кальция, важного для фолдинга некоторых RTX.

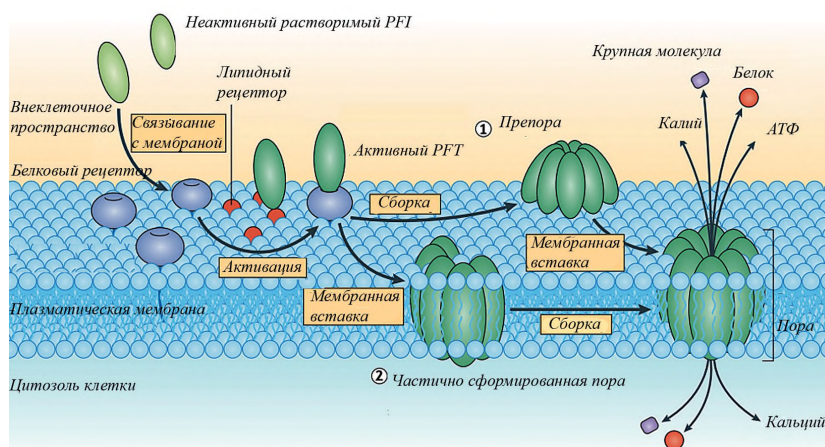


Рисунок 4 – Схематическое изображение механизмов образования пор порообразующими токсинами.

Растворимые PFT рекрутируются на мембрану клетки-мишени хозяина с помощью белковых рецепторов и/или специфических взаимодействий с липидами (например, сфингомиелин для актинопорина или стерины для холестерин-зависимых цитолизин). При связывании с мембраной токсины концентрируются и начинают процесс олигомеризации, который обычно идет по одному из двух путей. По пути, которому следует большинство β -PFT, олигомеризация происходит на поверхности мембраны клетки, образуя промежуточную структуру, известную как препора (механизм 1), которая, в конечном итоге, претерпевает конформационные перестройки, приводящие к ее внедрению в мембрану. По пути, которому следует большинство α -PFT, вставка PFT в мембрану происходит одновременно с механизмом последовательной олигомеризации, который может привести к образованию либо частично сформированной, но активной поры (механизм 2), либо к образованию полных пор. При формировании α -PFT и β -PFT конечным результатом является образование трансмембранной поры с различной архитектурой, стехиометрией, размером и особенностями проводимости, способствующих притоку или оттоку ионов, малых молекул и белков через мембрану клетки и запускающих различные вторичные реакции, связанные с восстановлением мембраны клетки [22]

трации внутриклеточного калия вызывает образование липидных капель (lipid droplet), дефосфорилирование гистонов и остановку синтеза белка. Это последнее событие в сочетании с аутофагией¹² позволяет клеткам при незначительном повреждении мембраны перейти в режим низкого потребления энергии, что может обеспечить им выживание до восстановления мембраны [22].

Многие формируемые поры проницаемы для кальция в направлении через плазматическую мембрану в клетку. Поскольку кальций является мощным вторичным мессенджером, результирующее увеличение концентрации внутриклеточного кальция запускает активацию различных сигнальных каскадов, таких как высвобождение кальция из внутриклеточных запасов и активация каскада Ca^{2+} -зависимых цистеиновых кальпаиновых протеиназ и других протеолитических каскадов, что приводит к нерегулируемой деградации внутриклеточных структур и усилению кальпаинзависимых путей клеточной гибели [22, 23].

Механизм действия β -PFT на мембраны хорошо прослеживается на примере альфа-токсина *S. aureus*, рассматриваемого как прототип олигомеризующегося пороформирующего цитотоксина [21]. Альфа-токсин кодируется одним генетическим локусом, *hla*, и секретируется в виде водорастворимого мономера, синтезируется как прекурсорная молекула из 319 аминокислот, содержащая N-терминальную последовательность из 26 аминокислот. Секретируемый бактерией «зрелый токсин» (протомер), является гидрофильной молекулой с массой 33 кДа, утратившей цистеиновые остатки [30]. Протомер «узнает» клетку-мишень по высокоаффинным рецепторам или неспецифически сорбируется в участках плазматической мембраны, содержащих фосфатидилхолин или холестерин [23].

При связывании своей клетки-мишени α -токсин олигомеризуется до структуры предпор, впоследствии атакуя клеточную мембрану путем экструзии β -цилиндра через липидный бислой с образованием ги-

¹² Аутофагия – процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом или вакуолей и подвергаются в них деградации.

дрофильного трансмембранного канала. На мембране семь протомерных токсинов собираются в пору, формируя грибоподобный гептамер (232 кДа), включающий три различных домена. Полностью собранный токсин имеет ширину 100 Å и высоту 100 Å, а минимальный внутренний диаметр поры составляет 14 Å [23].

Образовавшаяся неселективная пора позволяет маленьким молекулам и ионам двустороннее движение, что, в конечном итоге, приводит клетку к вздутию и гибели от осмотического шока. Цитолитическое действие α -токсина проявляется в отношении различных типов клеток (рисунок 5).

В условиях *in vivo* α -токсин *S. aureus* способен лизировать моноциты, лимфоциты, эритроциты, тромбоциты, и эндотелиальные клетки человека [30].

Восстановление целостности плазматической мембраны. Были предложены три основных механизма восстановления мембран после повреждения, вызванного порообразующими токсинами [22]:

- разборка порообразующего комплекса, но это маловероятно для пор, подобных тем, которые образуются аэролизинем, стабильность которых паразитерна;

- поглощение пор путем эндоцитоза с целью разрушения пор в лизосомах или их секреции во внеклеточное пространство через экзосомы;

- отщепление мембранных участков, содержащих PFT, посредством образования внеклеточных везикул – наиболее вероятный механизм.

Токсины, ингибирующие синтез белка. Субстратами для них служат факторы элонгации, обеспечивающие непрерывную полимеризацию белка в рибосоме; и рибосомальная РНК, осуществляющая считывание информации с мРНК. Дифтерийный токсин (DT) и экзотоксин А псевдомонад (PE) относятся к АВ-типу, их А-субъединицы являются дифтаמיד-специфическими АДФ-рибозилтрансферазами, рибозилирующими фактор элонгации-2 (EF2)¹³. Инактивируя EF2 они подавляют синтез белка в клетке.

Дифтаמיד – неcodируемая, посттрансляционно модифицированная аминокислота гистидин, содержащаяся в EF2. Дифтаמידом она названа «в честь токсина», вырабатываемого бактерией *Corynebacterium diphtheriae*, нацеленного на эту аминокислоту, т.е. DT. На него так же и таким же образом воздействует экзотоксин А, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). Дифтаמיד – единственная мишень обоих токсинов.

Дифтерия – воздушно-капельная инфекция. DT – хорошо изученный и первый описанный в научной литературе бинарный токсин. Продуцируется токсигенными штаммами *C. diphtheriae*. Возбудитель фиксируется в месте внедрения, там же размножается,

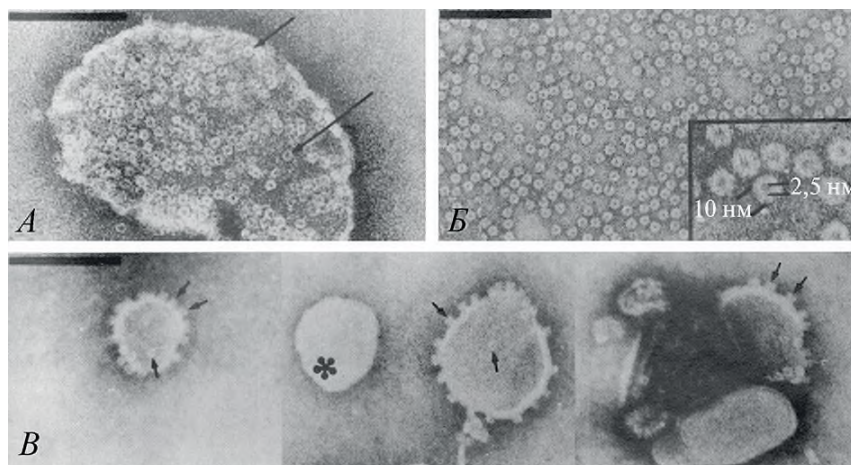


Рисунок 5 – Действие α -токсина *S. aureus* на эритроциты кролика и искусственные липидные мембраны. А – негативно окрашенный фрагмент эритроцита кролика, лизированный α -токсином *S. aureus*. На поверхности мембраны наблюдаются многочисленные кольцеобразные структуры размером 10 нм (показаны стрелками). Б – изолированные гексамеры токсина в растворе детергента. В – лектиновые липосомы, включающие реинкорпорированные гексамеры токсина (последние выглядят как штырьки вдоль краев липосомной мембраны – показаны стрелками). Звездочкой показана липосома, избежавшая включения молекул α -токсина. Черные полосы соответствуют 100 мкм [31]

¹³ То есть АДФ-рибозильный остаток переносится на дифтаמיד.

выделяя DT. В процессе жизнедеятельности коринебактерии продуцируют и другие биологически активные вещества: гиалуронидазу, нейраминидазу, некротизирующий и диффузионный факторы, облегчающие проникновение DT в ткани и кровь.

Патологические изменения в организме заболевшего дифтерией – интоксикация, местный воспалительный процесс, ранние и поздние осложнения – обусловлены повреждающим действием DT, блокирующего синтез белка клеткой. Следствием местного воздействия токсина является коагуляционный поверхностный некроз эпителия, в результате чего усиливается проникновение в глубокие ткани различных токсических субстанций. Происходит паралитическое расширение сосудов с резким повышением проницаемости их стенок и пропотеванием экссудата, богатого фибриногеном. В остром периоде дифтерии в результате воспалительного процесса повышается концентрация фибриногена в крови. Фибриноген под влиянием тромбокиназы, высвобождающейся из некротизированной ткани, свертывается и превращается в фибрин. Так образуется фибриновая пленка – густой серо-белый налет на гортани, носовых ходах и языке, вызывающий затруднение дыхания и глотания. Такая пленка – наиболее характерный признак дифтерии [32]. Из-за локализации инфекционного процесса в гортани, DT проявляет себя болями в горле, опуханием шейных лимфатических узлов, образованием отека [6].

DT синтезируется бактериальной клеткой в форме предшественника, который затем отщепляется от сигнальной последовательности из 25 аминокислот и высвобождается в культуральную среду в виде белковой цепи в 535 аминокислот с молекулярной массой (ММ) 58 кДа. Рецептором входа для DT является про-НВ-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor). Токсин состоит из трех доменов: С-домена, обладающего АДФ-рибозилтрансферазной активностью (21 кДа); Т-домена, или транслокационного домена (20 кДа), способного пересекать мембрану эндосомы и проникать в цитозоль клетки; а также R-домена (17 кДа) – связывающего токсин с рецептором на поверхности клеток-мишеней и способствующий прохождению С-домена (через транслокационный домен) в цитозоль клетки. С-домен соответствует субъединице А бинарного токсина, а домены Т и R соответствуют субъединице В. Субъединицы А и В соединены дисульфидной связью. Попав внутрь эндосомы, комплекс сталкивается с кислой средой, и

Т-домен встраивается в мембрану эндосомы, образуя канал и позволяя каталитической А-субъединице выйти в цитозоль, где она катализирует НАД⁺-зависимое АДФ-рибозилирование EF-2, ингибируя синтез белка. В качестве второго субстрата токсину необходим кофермент никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) [6]. Дифтерийный токсин чрезвычайно опасен. Для уничтожения клетки требуется только одна молекула, достигшая цитозоля [33].

Фиксация токсина в тканях приводит к характерным поражениям нервной и сердечно-сосудистой систем человека. В миокарде рано возникает паренхиматозное перерождение мышечных волокон вплоть до полного миолиза и глыбчатого распада. Характерно жировое перерождение с последующей деструкцией миофибрилл и формированием диффузного склероза. Изменения в периферической нервной системе протекают по типу паренхиматозного неврита с преимущественным поражением миелиновой и шванновской оболочек без вовлеченности аксона [32].

P. aeruginosa (синегнойная палочка) – зоокомиальный патоген, обнаруживается в абсцессах, гнойных и ожоговых ранах, ассоциирован с энтеритами и циститами; особенно часто поражает лиц с ослабленным иммунитетом. До 1960-х гг. считалось, что в патогенезе синегнойной инфекции ведущую роль играл эндотоксин. Экзотоксин А, как фактор патогенности *P. aeruginosa*, впервые описан P.V. Liu в 1966 г. Его ММ ~ 66–72 кДа [34, 35].

Экзотоксин А без особых технических проблем можно получить в специальной жидкой питательной среде при интенсивной аэрации, используя штаммы *P. aeruginosa* с низкой протеазной активностью (РА-103 и РА-7), затем очистить методами аффинной хроматографии. При местном введении очищенного токсина животному возникает характерная реакция – безэритематозный отек, некротизирующийся в течение 2–3 сут. При внутривентральном введении 0,1 мкг токсина мыши погибают через 40–50 ч после инъекции. На других экспериментальных моделях, дающих возможность изучить физиологические параметры реакции организма на введение экзотоксина А (собаках, обезьянах), патологические изменения выявляются через 2–3 мин. Наступает резкое повышение давления в системе воротной вены печени с последующим падением периферического кровяного давления. Животные погибают на следующий день при явлениях сосудистого коллапса, метаболического ацидоза и

дыхательной недостаточности. В сыворотке крови животных резко повышается уровень аминотрансфераз, щелочной фосфатазы и катехоламинов. Клинические проявления отравления и сравнительно длительный период времени, предшествующий гибели животного, свидетельствуют о том, что в основе патологического процесса лежат глубокие нарушения клеточного метаболизма. Прямым подтверждением этого служат данные о подавлении синтеза белка во всех органах и тканях. Уже через два часа после введения экзотоксина А белковый синтез в печени подавляется на 50 %, а к моменту гибели животного он блокируется во всех органах. У погибших животных при вскрытии обнаруживаются выраженный гепатоцеллюлярный некроз, геморрагические поражения в легких и тубулярный некроз почечной ткани [36].

Организация молекулы токсина бинарная. Домен А отвечает за каталитическую активность, а домен В представляет собой рецептор-связывающий фрагмент, который взаимодействует с белком 1, родственным рецептору липопротеинов низкой плотности (LRP1 или CD91). LRP1 также является рецептором токсина *C. perfringens* TpeL [37]. Действие токсина *P. aeruginosa* проявляется в общем токсическом эффекте синегнойной инфекции¹⁴ у госпитализированных иммуноослабленных пациентов (отеки, некрозы, нейтропения, артериальная гипотензия с последующим коллапсом, метаболический ацидоз, дыхательная недостаточность и др.) [36, 38, 39].

Шига-токсин (Stx-токсин, веротоксин) относится к семейству АВ₅-токсинов, продуцируется грамотрицательной бактерией *Shigella dysenteriae* первого серотипа и Stx-штаммами *E. coli* (STEC). Шига-токсин обнаружен японским бактериологом доктором Киёси Сига (1871–1957), описавшим дизентерийную палочку в 1897 г. Токсины-аналоги, продуцируемые кишечными палочками, называются Stx1 и Stx2. Stx1 отличается от Stx в субъединице А на одну аминокислоту, тогда как аминокислотная последовательность Stx2 сходна с последовательностью Stx на 56 % [40].

Эти токсины могут убивать клетки Vero, поэтому их еще называют цитотоксинами Vero или веротоксинами. Для проникновения в клетку веротоксины распознают нейтральный гликофинголипид – глобо-

триаозилцерамид (Gb3/CD77), принадлежащий к группе глобозидов. У человека Gb3 присутствует в эпителии и эндотелии почек, микрососудистых эндотелиальных клетках собственной пластинки кишечника, миофибробластах кишечника, гладкомышечных клетках пищеварительного тракта, мочеполовой системы, плаценте, эндотелиальных клетках, ганглиозных клетках дорсальных корешков периферических клеток нервной системы, а также эндотелиальных клеток и нейронов ЦНС [41].

Stx имеет ферментативную субъединицу А (StxA; 32 кДа), действующую как N-гликозидаза, расщепляющая рибосомальную РНК хозяина. Она состоит из доменов А1 и А2, связанных дисульфидной связью, и пять идентичных субъединиц В (StxB; 7,7 кДа), образующих пентамер, связывающийся с рецептором на поверхности клетки-мишени. Субъединицы А и В соединяются нековалентно путем вставки С-концевой области А-субъединицы в центральное отверстие пентамера. На каждую В-субъединицу приходится три сайта связывания, поэтому один Stx может одновременно связывать до 15 Gb3 [6, 40].

Stx проникает в клетки путем эндоцитоза, включающего кластеризацию рецепторов Gb3 на плазматической мембране клеток-мишеней. Экспрессия Gb3 у людей строго ограничена почками, нервной системой, микрососудистым эндотелием и субпопуляцией В-клеток зародышевого центра [40].

Субъединица А подвергается процессингу фурином и фуриноподобными протеазами хозяина, в результате чего образуются полипептидные фрагменты А1 и А2, которые остаются связанными с субъединицей В. Субъединицы А1 и А2 между собой связаны через одну дисульфидную связь. Домен А1 обладает ферментативной активностью N-гликозидазы. Отщепляя один остаток аденина от 28S рРНК, входящей в 60S-субъединицу рибосомы, он ингибирует ее связывание с доставляющими аминокислоты в рибосому молекулами аминоацил-тРНК. В результате в процессе трансляции нарушается удлинение полипептидной цепи, и синтез белка в клетке ингибируется [6].

Заражение шигеллами и продуцирующей токсин кишечной палочкой может произойти при попадании бактерий в организм

¹⁴ *P. aeruginosa* продуцирует еще один экстрацеллюлярный белок с АДФ-рибозилтрансферазной активностью – экзоэнзим S, цитотоксины, гемолизины (фосфолипаза С, термостабильный гемолизин), энтеротоксины, нейраминазу, протеолитические ферменты (эластаза, щелочная протеаза), адгезины и др. Более подробно о факторах патогенности синегнойной палочки см. в работах А.Ф. Мороз с соавт. [36] и А.В. Лазаревой с соавт. [38].

через зараженную пищу или воду. Опасность Stx-токсинов усугубляется отсутствием их ингибиторов и эффективного лечения поражений. Первые симптомы попадания токсина Шига в кишечник включают ощущение боли в эпигастральной области и водянистую диарею. Токсин поражает мелкие кровеносные сосуды пищеварительного тракта, почек и легких. Тяжелые, опасные для жизни случаи, характеризуются геморрагическим колитом. Специфической мишенью токсина является гликофинголипид – глоботриаозилцерамид (Gb3) сосудистого эндотелия клубочков почки, т.е. их фильтрующей структуры. Просвет капилляров клубочка сужается за счет набухших и поврежденных эндотелиальных клеток, которые отслаиваются от подлежащей базальной мембраны – гистопатологический признак диарейного гемолитико-уремического синдрома. Это приводит к локальной продукции цитокинов и хемокинов, вторичной активации коагуляции и синтезу фибрина. Поврежденные эндотелиальные клетки также могут вызывать отложение тромбоцитов в микрососудистых тромбах, что приводит к тромботической микроангиопатии и разрушению эритроцитов в окклюзионных капиллярах. Сужение капилляров клубочков снижает приток крови к почкам, снижает скорость фильтрации. Дальнейшее повреждение почек происходит вследствие тубулярного некроза с деструкцией канальцевого эпителия почек, приводящего к острой почечной недостаточности и смерти. Повреждение микрососудистых эндотелиальных клеток может также поражать головной мозг, поджелудочную железу и миокард, приводя к развитию энцефалопатии, сахарного диабета (особенно у взрослых), кардиомиопатии, геморрагического колита. Было показано, что StxB способствует развитию тромботической тромбоцитопенической пурпуры, стимулируя секрецию фактора фон Виллебранда в эндотелиальных клетках пупочной вены человека и способствуя адгезии тромбоцитов [5].

Токсины, генерирующие образование вторичных мессенджеров (посредников). Бактериальные токсины могут влиять на функцию отдельных белков эукариотической клетки, не приводя ее к гибели. Для этого они активируют так называемых вторичных посредников (циклический АМФ, циклический ГМФ, инозитолтрифосфат, диацилглицерин, кальций, оксид азота(II) и др.), способных усиливать и искажать клеточную реакцию на внеклеточные сигналы [21]. Рассмотрим механизм действия таких токсинов на примере холерного и коклюшного токсинов.

Холерный токсин (СТ, Ctx) – токсин АВ₅-типа, пять субъединиц которого собраны в кольцеобразную структуру, а С-конец субъединицы А выступает через центральную пору. Ctx – классический пример бактериального токсина, влияющего на активность *аденилатциклазы*. Продуцируется возбудителем холеры, болезни, эндемичной в более чем в 50 странах. Существование Ctx впервые постулировано Р. Кохом (нем. Heinrich Hermann Robert Koch; 1843–1910) в 1886 г. Он полагал, что симптомы холеры вызваны «ядом», выделенным холерной бактерией. Открытия Ctx пришлось ждать более полувека. С. Де (англ. Sambhu Nath De; 1915–1985) в 1959 г. сообщил, что бесклеточный фильтрат культуры *V. cholerae* способен вызывать массовое накопление жидкости в виде «рисовой воды» в перевязанных петлях подвздошной кишки взрослых кроликов [42, 43].

Структура Ctx похожа на структуру Stx. Токсин состоит из крупной субъединицы CtxA (240 аминокислот; ММ 28 кДа) – расположена в центре гомопентамерной субъединицы CtxB с ММ 55 кДа (103 аминокислоты; ММ 11 кДа каждая). CtxA образован двумя доменами: токсичным А1 (CtxA1) и нетоксичным А2 (CtxA2). Центральная пора CtxB нековалентно связывается с α -спиралью CtxA2 и собирается в гетерогексамерный голотоксин. Разница между CtxB и StxB заключается в том, что CtxB имеет дополнительную α -спираль и более длинные вторичные структурные элементы. Пять идентичных мономеров субъединицы CtxB взаимодействуют с пятью рецепторами GM1 (моносиалоганглиозид GM1) в клетках млекопитающих [6, 44].

Достигнув ER, CtxA диссоциирует от субъединицы B и вызывает АДФ-рибозилирование белка G (другое название – гуанин-нуклеотид-связывающий белок), расположенного на внутренней поверхности клеточной мембраны и связанного с рецептором, реагирующим на токсин. Его конформация меняется активировав расположенные ниже эффекторы, такие как аденилатциклаза, фосфодиэстераза, фосфолипаза C и ионные каналы. В клетках кишечного эпителия начинается интенсивный синтез цАМФ, что стимулирует выход воды и ионов. Возникает электролитный дисбаланс. Его следствием становится тяжелая диарея и рвота – основные клинические признаки холеры. Диарея, если ее не лечить, приводит к тяжелому обезвоживанию, электролитным нарушениям, метаболическому ацидозу, почечной недостаточности, почти неизбежно приводящими человека к смерти [43].

Установлены энтеропатогены, экспрессирующие токсины аналогичного действия, включая *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Citrobacter freundii*, а также респираторные патогены, такие как *Bordetella pertussis* [43].

Коклюшный токсин (pertussis toxin, PT, Ptx) – секретируется возбудителем коклюша, грамотрицательной палочковидной неподвижной бактерией *B. pertussis*. Его вклад в летальный исход болезни описан сравнительно недавно, в 1984 г. [45]. Относится к АВ₅-типу и представляет собой аденозиндифосфат (АДФ)-рибозилирующий белковый токсин. Он ингибирует в клетках млекопитающих передачу сигналов через подмножество рецепторов GPCR¹⁵, связанных с G-белками – трансмембранными рецепторами, выполняющими функцию активатора внутриклеточных путей передачи сигналов. Прохождение таких сигналов в итоге приводит к множественному клеточному ответу: увеличению цАМФ; изменению функции калиевых и кальциевых каналов; лейкоцитозу; нарушению функции макрофагов; изменению трафика лейкоцитов; гиперинсулинемии; повышению чувствительности к гистамину, брадикинину и серотонину [46].

PT состоит из ферментативной субъединицы – А-протомера PTS1 (субъединица 1 коклюшного токсина), и четырех различных В-субъединиц: PTS2, PTS3, PTS4 и PTS5 в соотношении 1:1:2:1. В-пентамер, состоящий из субъединиц PT с 2-й по 5-ю и PTS1, собирается посредством нековалентных связей в периплазме¹⁶ бактерий с образованием голотоксина PT, формирующего пирамидальную структуру поры. Голотоксин секретируется системой секреции IV типа. В-пентамер связывается с поверхностью клетки через сиалогликопротеины, находящиеся на поверхности большинства эукариотических клеток. Конкретный рецептор пока не идентифицирован. Схематическое изображение клеточного поглощения и механизма действия PT показана на рисунке 6.

Для успешной колонизации мерцательного эпителия дыхательных путей человека *B. pertussis* необходимы факторы адгезии,

такие как нитевидный гемагглютинин (filamentous hemagglutinin, FHA) и фимбрии. Другими токсинами, помимо PT, изменяющими физиологические функции верхних дыхательных путей, являются трахеальный цитотоксин, поражающий и убивающий мерцательные клетки эпителия; и аденилатциклаза, ингибирующая фагоцитоз за счет избыточной генерации цАМФ в фагоцитах, тем самым защищая бактерии от элиминации иммунной системой¹⁷. Точная роль PT и других факторов вирулентности, а также их взаимодействие в патогенезе *B. pertussis* подробно не выяснены. Например, до конца не понятно, как возникает тяжелая патология кашля при коклюше. Введение очищенного PT экспериментальным животным не вызывает кашлевой патологии. Но и при заражении экспериментальных животных штаммами *B. pertussis*, не продуцирующими PT, кашлевого эффекта не происходит. Предполагается, что патология кашля является продуктом сложной реакции организма хозяина на инфекцию продуцирующих PT *B. pertussis* в сочетании с активностью других выделяемых токсинов [48, 49].

Коклюш заразен, *B. pertussis* передается воздушно-капельным заражением верхних дыхательных путей. Наиболее тяжело болезнь проявляется у младенцев в возрасте <3 месяцев. Характерный симптом – сильный, продолжительный приступообразный кашель. В тяжелых случаях – пневмония, энцефалопатия, судороги или апноэ, кровоизлияния в мозг, смерть. Лейкоцитоз является характерным признаком тяжелого коклюша и коррелирует с плохим прогнозом. Также плохой прогноз у младенцев, у которых на ранней стадии инфекции наблюдается коклюшная пневмония. Описано образование лейкоцитарных тромбов в мелких легочных кровеносных сосудах и предполагается, что окклюзия таких сосудов, вызванная лейкоцитозом, приводит к повышению давления в легочной артерии и развитию легочной гипертензии. Судороги обычно возникают после эпизодов цианоза и, как полагают, являются результатом аноксии. Однако боль-

¹⁵ Рецепторы, сопряженные с G-белком (англ. G-protein-coupled receptors, GPCRs), также известные как миспиральные рецепторы или серпантинные рецепторы, составляют большое семейство трансмембранных рецепторов. GPCR выполняют функцию активаторов внутриклеточных путей передачи сигнала, приводящими в итоге к клеточному ответу.

¹⁶ Периплазматическое пространство представляет собой пространство, заключенное между плазматической и внешней мембранами бактерий. Содержимое периплазматического пространства называется периплазмой или периплазматическим пространством.

¹⁷ Видимо этот механизм был отработан в ходе эволюции жизни еще до появления многоклеточных организмов предшественниками фагоцитов – одноклеточными простейшими.

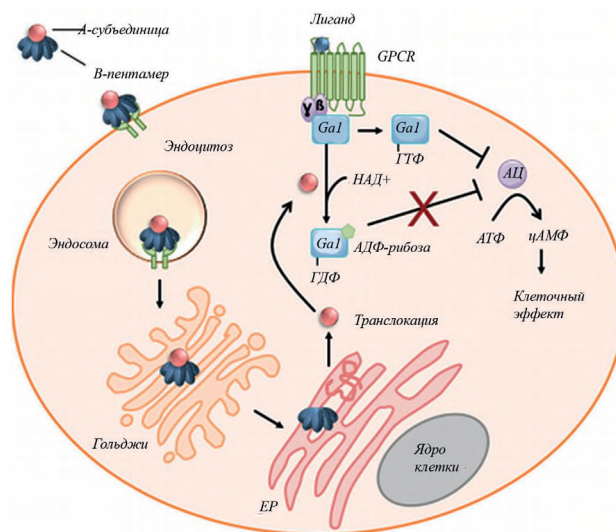


Рисунок 6 – Схематическое изображение поглощения клеткой коклюшного токсина и механизма его внутриклеточного действия. Токсин связывается через свою В-субъединицу с поверхностью клетки и после эндоцитоза следует ретроградным путем через аппарат Гольджи к эндоплазматической сети (ЭР). В физиологических условиях PTS1 термически нестабилен, что приводит к его разворачиванию. Так как голотоксин PT движется по так называемому пути «деградация белков, связанных с эндоплазматическим ретикуломом» (ERAD), нацеленным на неправильно свернутые белки, то попавшая в нее А-субъединица PTS1 диссоциирует от В-олигомера и транслоцируется в цитозоль. Здесь PTS1 АДФ-рибозилирует ингибирующие α -субъединицы (Gai) GPCR, тем самым инактивируя их. Таким образом, если соответствующий GPCR активирован, Gai больше не способен ингибировать аденилатциклазу (АЦ), что приводит к усилению и нарушению передачи сигналов цАМФ [47]

шинство форм патологии головного мозга связаны с нарушением целостности гематоэнцефалического барьера. Исследования *in vitro* показали, что РТ проникает в микрососудистые клетки головного мозга человека и усиливает трансмиграцию макрофагов и моноцитов через эндотелиальный слой микрососудов головного мозга человека [50].

Таксономически *B. pertussis* тесно связан с *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*. *B. parapertussis* вызывает аналогичную, но более легкую версию болезни у людей и овец, а *B. bronchiseptica* заражает многих млекопитающих, включая собак и свиней, но очень редко заражает человека. Но только *B. pertussis* синтезирует РТ. *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* имеют гомологичные области молчащих структурных генов, кодирующие функциональный РТ, и они могут быть экспрессированы при вставке промоторной области от РТ *B. pertussis*. Движущие силы естественного отбора, способствующие потере экспрессии РТ *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica*, неизвестны [46].

В мире бактерий широко распространены гены, кодирующие коклюшный токсин [12, 17]. *Salmonella enterica*, кишечный патоген, секретирует токсин, аналогичный РТ, называемый ArtAB. Впервые он обнаружен у бак-

терий серовара *S. enterica typhimurium* DT104. Представляет собой АДФ-рибозилирующий токсин, кодируемый профагами, такими как PhInv-1b и Gifsy-1. ArtAB классифицируется как член семейства коклюшных токсинов из-за гомологии между А-субъединицами Art и РТ [51].

Цитолетальные токсины, вызывающие растяжение клеток (cytolethal distending toxins, CDTs) – продуцируются грамотрицательными патогенными бактериями, такими как *E. coli*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Haemophilus ducreyi*, *S. dysenteriae*, *Salmonella enterica* и отдельными представителями видов *Campylobacter* sp., *Helicobacter* sp. Впервые описаны в 1988 г. W.M. Johnson и H. Lior, обнаружившими, что в культуральных фильтратах, полученных из клинических изолятов *Campylobacter* spp., *E. coli* и *Shigella dysenteriae*, содержатся белковые вещества, вызывающие прогрессирующее вздутие клеток CHO, Hep-2, Vero и HeLa в течение 96 ч и в конечном итоге приводящие к потере их жизнеспособности между 96 и 120 ч от момента экспонирования [52].

CDT являются уникальными и мощными факторами вирулентности бактерий, способными ослаблять защиту инфицированного ими хозяина следующими путями: разру-

шением эпителиальных барьеров; подавлением приобретенного иммунитета; стимулированием провоспалительных реакций. Они играют ключевую роль персистенции бактерий по организму инфицированного человека. CDT – первые, ставшие известными, бактериальные *генотоксины*, действующие в ядре клетки-мишени и вызывающие повреждение ДНК и злокачественное перерождение клетки [53, 54].

CDT состоит из трех полипептидов, обозначенных CdtA, CdtB и CdtC, ММ 25–35, 28–30, 20–21 кДа соответственно [55]. По типу самосборки CDT представляют собой токсины А-В₂ типа, где субъединицы CdtA и CdtC необходимы для опосредования связывания на поверхности клеток-мишеней ферментативной субъединицы CdtB. Тем самым они обеспечивают ее интернализацию в клетку. На основании структурной гомологии с ДНКазой I млекопитающих CDT считают функционально гомологичной дезоксирибонуклеазе I [56]. У большинства бактерий, синтезирующих CDT, кластер генов, кодирующий субъединицы CDT, состоящий из соседних или слегка перекрывающихся генов *cdtA*, *cdtB* и *cdtC*, расположен на хромосоме. Исключения встречаются у некоторых штаммов *E. coli*, у которых оперон находится на большой конъюгативной плазмиде, названной pVir [52].

Природа поверхностного рецептора (рецептора входа) CDT все еще плохо охарактеризована, однако известно, что для связывания с клеткой таким токсинам необходимы интактные липидные рафты (богатые сфинголипидами и холестерином области на мембране клетки). Субъединицы CdtA и CdtC представляют собой молекулы лектинового типа, имеющие структурную гомологию с повторами В-цепи растительного токсина рицина. Их суммарная роль типична для В-субъединиц бинарных токсинов, но индивидуальная заметно менее ясна, что можно объяснить трудностью очистки каждого белка по отдельности из-за их склонности соединяться с внешней мембраной бактерий. В целом структура голотоксина CDT имеет сходство со структурой растительных токсинов – рицина и абрина [57].

После связывания голотоксина CDT с клеткой CdtA остается на мембране, а CdtB и CdtC проникают в ранние эндосомы, где комплекс распадается. В поздние эндосомы попадает только CdtB. Через комплекс Гольджи и эндоплазматический ретикулум он транспор-

тируется в ядро. Попав в ядерный компартмент, CdtB оказывает токсическое действие на клетку через повреждение ДНК. Активация ответов на поврежденную ДНК увеличивает геномную нестабильность и приводит к необратимой остановке деления клеток-мишеней в фазах G1 и/или G2 клеточного цикла. Тип остановки клеточного цикла, индуцируемой CDT, аналогичен индуцируемому ионизирующим излучением. Когда повреждение ДНК становится слишком разрушительным, клетки, не способные восстановить повреждения ДНК, подвергаются апоптозу [58]. Так как CDT модулируют цикл эукариотических клеток путем приостановки перехода фазы G2/M, их определили, как *цикломодулины*¹⁸ [59].

Протеолитические токсины. Столбняк и ботулизм – болезни человека и животных, вызываемые нейротоксинами спорогенных бактерий рода *Clostridium*. Клостридии присутствуют в анаэробных средах, окружающих человека, и в кишечнике животных преимущественно в виде спор. Производимые ими ботулинический (BoNT) и столбнячный токсины (TeNT) – цинк-металлоэндопротеазы, специфически расщепляющие белки, осуществляющие слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной или органеллой-мишенью (sensitive factor attachment protein receptor, SNARE), необходимых для высвобождения через синаптическое пространство между нейронами нейротрансмиттеров, обеспечивающих связь между нейронами. В опытах на животных они обнаруживают наименьшую из известных LD₅₀ [60].

Высокая токсичность клостридиальных нейротоксинов обусловлена уникальным сочетанием двух факторов: очень быстрого связывания с нейронами, функционирование которых важно для выживания человека или животного, а также их ферментативной активности, высокоспецифичной для трех белков SNARE. Расщепления любого из них достаточно, чтобы блокировать экзоцитоз синаптических пузырьков и высвобождение нейромедиатора с последующим развитием нейропаралича [20]. Это очевидно для позвоночных, но также верно и для беспозвоночных, особенно для летающих насекомых, о чем свидетельствует совсем недавнее открытие BoNT-подобного нейротоксина, специфичного для комаров *Anopheles* [61].

Известно несколько изоформ столбнячного нейротоксина и множество изоформ

¹⁸ Цикломодулины – бактериальные токсины, которые препятствуют клеточному циклу эукариотических клеток.

ботулинического нейротоксина, сгруппированных в один серотип TeNT и в 8 серотипов BoNT (обозначены буквами A, B, C, D, E, F, G, DC и X; изотипы обозначаются арабскими цифрами, следующими за заглавной буквой серотипа). Серотипы включают множество изотипов, различающихся аминокислотной последовательностью, что влияет на их нейротоксичность и нейтрализацию поликлональными и моноклональными антителами серотипирующих антисывороток [62]. Различные типы BoNT блокируют различные белки SNARE в холинергических нервных окончаниях, вызывая блокаду холинергических нервно-мышечных и вегетативных синапсов. Исследования на животных указывают на наибольшую продолжительность действия BoNT типа A (BoNTA), за которым следуют типы B, F и E [63].

Изоформы TeNT и BoNT очень похожи по аминокислотным последовательностям, трехмерной структуре и биохимическому механизму действия внутри нейронов. Тем не менее, TeNT и BoNT вызывают две разные формы нейропаралича: *спастический* и *вялый* соответственно, поскольку они действуют на разные типы нейронов: TeNT парализует центральные тормозные интернейроны спинного мозга, тогда как BoNT парализуют периферические холинергические нейроны и могут влиять на центральные холинергические нейроны [60].

Также они различаются путями проникновения. Например, ботулинические токсины проникают в организм человека энтерально, столбнячный же токсин с поверхностей ран, колонизированных *S. tetani* [10].

BoNT, как и TeNT, не убивают интоксцированные нейроны, и, если пациент преодолевает дыхательный дефицит с помощью искусственной вентиляции легких, то в конечном итоге выздоравливает более или менее полностью. Фактически, оба этих нейротоксина внутри нейронов имеют ограниченное время жизни, которое зависит от нескольких факторов, включая чувствительность нейронов, вид животных и восприимчивость нейротоксинов к системам внутриклеточной деградации белков. В целом продолжительность паралича у людей варьируется от 2 нед. после поражения BoNT/E1, и до 3–4 мес. после поражения BoNT/A1 [64, 65].

Но эти наблюдения отражают естественное возникновение и течение отравления ботулиническим и столбнячным токсинами, знакомое специалистам. Их диапазон действия гораздо шире. Например,

при введении столбнячного токсина в область четверохолмий головного мозга или в блуждающий нерв на шее, животные погибают в короткое время при явлениях острого отека легких без типичных признаков столбняка. При инъекции в область теменной зоны коры головного мозга у животных, помимо своеобразных двигательных расстройств, развиваются кровоизлияния в области конечностей [66].

BoNT и TeNT, являясь самыми смертельными, имеют и наиболее сложные молекулы среди известных токсинов. Синтезируются в виде неактивных полипептидов массой 150 кДа и высвобождаются из лизированных клеток. Включают легкую (light chain; L, 50 кДа) и тяжелую цепи (heavy chain; H, 100 кДа), связанные одной дисульфидной связью [67].

L-цепь представляет собой Zn²⁺-зависимую эндопептидазу, специфичную для одного или нескольких из трех белков SNARE (VAMP, SNAP-25, синтаксин). Эти белки образуют гетеротримерный комплекс SNARE, являющийся ядром наномашины, которая опосредует нейроэкзоцитоз и высвобождение нейротрансмиттеров. *Тяжелые цепи* обоих токсинов содержат два домена – регион, необходимый для транслокации токсина (*N-терминальная последовательность, HN-домен*) и регион, необходимый для связывания с клеткой (*C-терминальная последовательность, CN-домен*) [68].

Ботулинические токсины связываются с рецепторами на поверхности пресинаптической мембраны моторных нейронов периферической нервной системы и вызывают протеолиз белков в нейронах, приводящий к ингибированию высвобождения ацетилхолина и к предотвращению мышечных сокращений – возникает вялый паралич [69]. Столбнячный токсин сначала связывается с рецепторами на пресинаптической мембране моторных нейронов, но затем, путем ретроградного везикулярного транспорта, он перемещается в нейроны спинного мозга. Спастический паралич возникает из-за того, что рассеяние везикуло-ассоциированных белков и синаптобrevина в нейронах, нарушает высвобождение глицина и гамма-амино-битуриковой кислоты, прекращающих мышечное сокращение [67].

Анализ доступной литературы показал, что токсичность TeNT и BoNT зависят от вида животных, на которых ее определяют; от серотипа и изоформы токсина. Значения LD₅₀ для BoNT/A1 у мышей при внутрибрюшинном введении составляют от 0,02 до 5 нг/кг.

Фактически, лишь немногие из десятков изоформ BoNT были изучены с точки зрения токсичности у различных животных, в том числе потому, что многие из них были идентифицированы только с помощью компьютерной геномики [20, 70].

Ботулотоксины уже несколько десятилетий считаются эффективными терапевтическими средствами для лечения состояний, обусловленных гиперактивностью холинергических нервных окончаний [71, 72]. Поэтому они хорошо изучены и будут изучаться дальше. Высокая токсичность ботулотоксинов для человека стала основанием для их включения в категорию А американского списка потенциальных агентов биотерроризма¹⁹. Столбнячный токсин пока не рассматривался для такого использования из-за повсеместной профилактики столбняка с помощью эффективных противостолбнячной вакцины и антисывороток [60].

Активаторы иммунного ответа (суперантигены). Термин «суперантиген» (superantigen, SA_g) был введен в 1999 г. J. White с соавт. [73] для описания группы бактериальных белков, нацеленных в качестве не-процессированных молекул на переменную часть β-цепи рецептора Т-клеток (T cell receptor, TCR) и молекулы главного комплекса гистосовместимости типа II (major histocompatibility complex type II molecules, MHC-II), экспрессируемые на антигенпрезентирующих клетках. В результате их одновременного взаимодействия происходит массовая активация иммунной системы наряду с интенсивной пролиферацией Т-клеток, либо CD4⁺, либо CD8⁺. Следствие Т-клеточной экспансии – массивное высвобождение интерлейкинов (1, 2 и 6 типов), гамма-интерферона, факторов некроза опухолей (альфа и бета) [21, 74].

Хотя термин «суперантиген» введен в 1989 г., эти токсины были описаны в начале 1980-х гг., как причина высоколетального синдрома токсического шока (toxic shock syndrome, TSS) у женщин в возрасте 17–30 лет, длительно использовавших суперадсорбирующие гигиенические тампоны во время месячных. Позже синдром был объяснен дисрегуляцией иммунной системы, вызванной суперантигенами, продуцируемыми золотистым стафилококком (*S. aureus*) и пиогенным

β-гемолитическим стрептококком группы А (*Streptococcus pyogenes*) [75].

Суперантигены могут подавлять иммунитет и его стимулировать одновременно. Парадокс иммунного ответа – интенсивная иммунная стимуляция, вызванная SA_g, как и его подавление, могут способствовать распространению и дальнейшей колонизации патогеном инфицированного хозяина [4].

Суперантигены продуцируются грамположительными бактериями, такими как *S. aureus*, *S. pyogenes*, β-гемолитическими стрептококками, коагулазонегативными стафилококками; и грамтрицательными бактериями – *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas fluorescens*, микоплазмами (*Mycoplasma arthritidis*). Кроме того, описаны суперантигены, кодируемые экзогенными ретровирусами мыши и человека [4] и, даже, эндогенными ретровирусами человека семейства HERV-K18 [76].

Среди вызываемых ими патологических состояний следующие: синдром токсического шока; инфекционный эндокардит; пневмония; стафилококковое пищевое отравление; различные аутоиммунные патологии (сахарный диабет, болезнь Кавасаки, ревматоидный артрит); атопический дерматит; генерализованная полиорганная недостаточность, вызванная провоспалительным цитокиновым штормом [4].

Самое большое семейство секретируемых токсинов данного типа называют *пирогенными токсинами-суперантигенами* (PTSA_g)²⁰. Это стабильные и устойчивые к протеазам суперантигены, способные выдерживать температуру 60 °С и выше, а также экстремальные значения pH. Их ММ в пределах от 22 до 30 кДа. К ним относятся стафилококковые энтеротоксины серотипов А–Е, G и H; пирогенные экзотоксины стрептококков группы А серотипов А–С и F; стафилококковый TSST-1 [21]. С 1950-х гг. стафилококковый экзотоксин В рассматривается зарубежными военными в качестве нелетального агента БО, в начале 1960-х гг. он стоял на вооружении американской армии²¹.

Гибридные и модифицированные токсины. К ним относятся токсины, состоящие из субъединиц разных токсинов или включающие модифицированные субъединицы²². На сегодняшний день такие токсины конструи-

¹⁹ *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Sidell FR, Tafuqi ET, Franz DR, Eds. Washington; 1997.

²⁰ Более подробно о них см. работу А.Ф. Шамсутдинова и Ю.А. Тюрина [79].

²¹ *Medical aspects of chemical and biological warfare*. Sidell FR, Tafuqi ET, Franz DR, Eds. Washington; 1997.

²² Их общее название – «рекомбинантные токсины».

ируют из различных биологических источников и используют для создания препаратов с противоопухолевой активностью; лечения нейродегенеративных заболеваний; разработки вакцин и других целей [77]. В данной работе мы рассматриваем подходы к получению токсинов с *повышенным поражающим действием*. Эксперименты по конструированию таких токсинов стали возможными еще в 1990-е гг. Сначала они распространялись на инсектицидные токсины, в начале нулевых годов появились публикации по токсинам бактерий, вызывающих инфекционные процессы у людей. При описании экспериментов по созданию гибридных и модифицированных бактериальных токсинов, исследователи единодушно проявляли скромность в отношении публикации данных по их поражающему действию, когда оно количественно оценивается на лабораторных животных. В тоже время этими данными они обстоятельно делились в тех случаях, когда такие токсины создавались для более эффективного истребления насекомых, поэтому мы остановимся и на них.

Повышение поражающего действия токсинов. Методические подходы, использованные для вмешательства в структуру молекул токсинов, включают [78]:

- делеции отдельных регионов токсина;
- сайт-направленный мутагенез отдельных доменов токсина;
- конструирование гибридных токсинов из разных доменов токсинов и лигандов;
- внедрение в молекулу токсина сайтов для расщепления протеазами.

В их рамках разработчики новых токсинов решают три технические задачи:

- увеличивают их токсичность в отношении конкретных видов животных;
- расширяют спектр поражающего действия токсинов;
- повышают избирательность действия токсинов на отдельные органы и ткани;

Повышение токсичности ботулинического токсина серотипа В. Как это не покажется странным, у исследователей, занимающихся разработкой медицинских препаратов, существует неудовлетворенность токсичностью самых токсичных бактериальных токсинов – ботулинических. В связи с низким сродством к человеческому синаптотатагмину II приме-

нение ботулинического токсина серотипа В (BoNT/B) для лечения ряда патологий, требует более высоких доз, что, в свою очередь, может усиливать побочные эффекты²³. Поскольку проведенные клинические исследования BoNT/B позволяют предположить, что он может иметь определенные преимущества перед BoNT/A, в настоящее время проводятся работы по его модификации в сторону увеличения нейротоксичности [72].

Способ, точечного мутагенеза, который использовался М. Pirazzini с соавт. [60] для повышения нейротоксичности BoNT/B, сходен с тем, который ранее пользовались S.J. Wu с соавт. [80] и X.S. Liu с соавт. [81] для повышения токсичности в отношении насекомых Cry2-токсина *B. thuringiensis*. В основе повышения токсичности BoNT/B – усиление связывания ферментативного домена токсина с мембраной эндосомы пораженной клетки.

Ботулинические нейротоксины транслоцируют в цитоплазму нейрона ферментативный домен через мембраны эндосом. Молекулярные триггеры этого процесса неизвестны. Было установлено, что среди консервативных отрицательно заряженных остатков легкой (ферментативной) цепи BoNT/B, основные препятствия для транслокации через отрицательно заряженную мембрану эндосомы, создают отрицательные заряды аминокислот Glu-48, Glu-653 и Asp-877. Их нейтрализация облегчает контакт легкой цепи BoNT/B с кальциевым сенсором эндосомы – синаптотатагмином II. Эндосома распадается и BoNT/B проникает в цитозоль нейрона, блокируя выброс нейромедиатора в синаптическую щель. В физиологических условиях клетки это достигается закислением внутренней среды эндосомы. Исследователями идентифицирована серия из трех точечных мутаций в легкой цепи BoNT/B, улучшающих связывание с синаптотатагмином II человека за счет удаления с поверхности молекулы отрицательного заряда. Полученный тройной мутант продемонстрировал повышенную нейротоксичность. Новый вариант ботулинического токсина, названный BoNT/B-TM, в экспериментальных моделях (*in vitro*) показал более быструю транслокацию легкой цепи BoNT/B в нейроны-зерна мозжечка. Время наступления паралича было сокращено по сравнению с исходным вари-

²³ Клинические преимущества BoNT/B перед BoNT/A установлены при лечении таких расстройств, как слюнотечение, гипергидроз и некоторые спазматические нарушения, связанные с гладкими мышцами. Кроме того, BoNT/B, в отличие от BoNT/A, не распространяется за пределы участка введения, и он необходим в качестве альтернативы для лечения пациентов, у которых появились нейтрализующие антитела к BoNT/A. Клинические наблюдения показывают, что для достижения у пациента того же эффекта, BoNT/B необходимо использовать в дозах примерно в 60-100 раз более высоких, чем BoNT/A [82, 83].

антом токсина – с 99 до 88 мин при концентрации токсина 0,1 нМ. Это соответствует увеличению нейротоксичности примерно в 1,6 раза [60].

Аналогичный подход в повышении токсичности BoNT/B, но с большим успехом, использовали L. Тао с соавт. [84]. Полученный ими мутантный BoNT/B, демонстрирует в условиях *in vitro* примерно в 11 раз более высокую эффективность в блокировании нейротрансмиссии в нейронах, экспрессирующих человеческий синаптотаксин II, чем BoNT/B дикого типа. Обе исследовательские группы не сочли возможным оценить либо опубликовать самое интересное – LD₅₀ полученных рекомбинантных нейротоксинов в опытах на экспериментальных животных.

Таргетные токсины. Их идея состоит в том, что клеточно-связывающий домен токсина (B-субъединица) заменяется лигандом или антителом (одноцепочечной Fv-частью антитела), определяющими каталитическому домену токсина (A-субъединица) новую клеточную мишень. Современные исследования ведутся в направлении поверхностных рецепторов раковых клеток, но ими потенциал технологии не исчерпывается [37]. Разрабатываются различные типы таргетных токсинов, причем нередко с изощренным изобретательским замыслом и многовариантным исполнением [85]:

- лиганд-токсинные конструкции (ligand toxin constructs) – вместо B-субъединицы токсина используются лиганды, имеющие рецепторы на клетках-мишенях, например, цитокины, S1-субъединицы белков слияния вирусов (например, S1-субъединица спайкового белка SARS-CoV-2), биологически активные вещества (инсулины, интерфероны и др.);

- подменные конструкции – их суть состоит в подмене ферментативной субъединицы, способной проникать в цитоплазму клетки по специфическому для нее пути, но не вызывающей гибели клетки, на смертельную субъединицу другого токсина.

- иммунотоксины (immunotoxins) – химерные токсины, включающие два домена, один из которых обладает свойствами антитела, а другой свойствами ферментативной субъединицы токсина. Первый домен обеспечивает связывание химерного белка со специфической молекулой или клеткой, второй инактивирует молекулу-мишень или убивает клетку.

Направление создания таргетных гибридных токсинов опасно обнаружением рецепторов, характерных для определенных рас и этносов и, соответственно, подбора лигандов, взаимодействующих с этими рецепторами и доставляющих в клетку ферментативные субъединицы токсинов. Их дальнейшая эволюция уже идет в направлении суицидной генной терапии, когда в клетку доставляются не ферментативные субъединицы токсинов, а гены, кодирующие их синтез²⁴.

Лиганд-токсинные конструкции. Рассмотрим, как выглядит их получение на примере денилейкин дифтитокса – первого препарата для лечения кожной Т-клеточной лимфомы, одобренного Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA)²⁵. Препарат представляет собой слитый белок цитокина с токсином, позволяющий направлять ферментативную субъединицу дифтерийного токсина через цитокиновый модуль на иммунные клетки, экспрессирующие рецептор интерлейкина IL-2 [86] (рисунки 7).

Благодаря высокой биологической активности компонентов, подход, использованный для получения денилейкин дифтитокса, оказался перспективным для разработки других химерных токсинов, способных оказывать токсическое воздействие на клетку. IL-2 активирует свой рецептор при пиколярных концентрациях. Но он только один из 130 цитокинов, управляющих иммунной системой человека, поэтому возможности такого подхода по специфическому нацеливанию токсинов далеко не исчерпаны [88]. LD₅₀ дифтерийного токсина для человека 100 нг/кг (таблица 1). Подобные исследования ведутся уже не менее 30 лет. Подробный разбор таких препаратов см. в работах А. Antignani с соавт. [85], А. Contet с соавт. [88] и R.J. Kreitman с соавт. [89].

Подменные конструкции. На рисунке 8 показана упрощенная схема конструирования токсина по данной технологии с измененным механизмом поражающего действия.

В интоксигированной клетке субъединица СТА1 холерного токсина достигает цитоплазмы для взаимодействия со своими субстратами, однако ее «недостаток» в том, что она не убивает клетку [90]. Группа С.Р. Guimaraes с соавт. [91] использовала метод мечения сортазой, позволяющий прикре-

²⁴ Для понимания технологий суицидной генной терапии можно ознакомиться с работой М. Ardini с соавт. [87].

²⁵ DRUGS A-Z LIST. URL: https://www.rxlist.com/drugs/alpha_a.htm (дата обращения: 23.12.2023).
Инструкция по применению. URL: <https://medum.ru/denilejkin-diftitoks> (дата обращения: 23.12.2023).

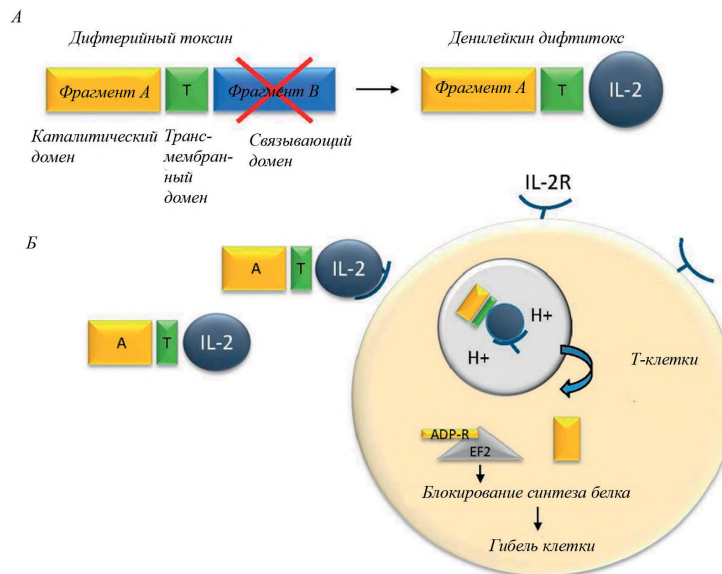


Рисунок 7 – Структура и действие денилейкин дифтеритокса. А – дифтерийный токсин состоит из трех доменов: каталитического домена (А), трансмембранного домена и рецепторсвязывающего домена. В денилейкин дифтеритоксе рецептор-связывающий домен заменен на человеческий интерлейкин 2 (IL-2) для специфического взаимодействия с рецептором IL-2. Б – денилейкин дифтеритокс распознает рецептор IL-2 на трансформированных Т-клетках и интернализуется в эндосомах. После закисления эндосомы каталитическая часть высвобождается в цитозоль и АДФ-рибозилирует фактор элонгации 2 (EF-2), тем самым ингибируя синтез белка и вызывая гибель клеток [37]

пить к СТА1 каталитическую субъединицу дифтерийного токсина в качестве токсичного инструмента (у авторов «warhead» – боеголовка), превращая таким образом холерный токсин, только повышавший уровни цАМФ, в цитолетальный токсин, останавливающий белковый синтез в клетке.

Сортаза А – бактериальный фермент из *S. aureus*, распознает и расщепляет специфический короткий пептидный мотив LPXTG (Leu-Pro-any-Thr-Gly) (где X представляет собой любую аминокислоту), присоединенный к интересующему белку. Расщепление происходит между остатками треонина и глицина с одновременным образованием промежуточного звена между ферментом и его субстратом. Этот промежуточный продукт может быть разделен путем нуклеофильной атаки добавленным пептидом олигоглицина, что приводит к образованию ковалентной связи с LPXTG-содержащим белком в месте расщепления. Поскольку олигоглициновый пептид допускает декорирование любым заместителем по выбору, конечный продукт можно пометить флуорофором, фотоаффинным зондом, липидами, фотосшивающими агентами или даже другими полипептидами. В описываемом эксперименте С.Р. Guimaraes с соавт. [91] использовали ферментативную субъединицу дифтерийного токсина. Однако

только ей «ассортимент» подмен в известных токсинах не исчерпывается.

Иммунотоксины. Появление иммунотоксинов вызвано трудностями прицельного терапевтического воздействия на злокачественно переродившиеся клетки крови. Первым таким средством были немеченые mAb, индуцировавшие апоптоз клеток-мишеней после взаимодействия с их рецепторами или вызывавших их гибель по другим механизмам (rituximab и alemtuzumab). Однако выяснилось, что более чем у половины пациентов раковые клетки устойчивы к действию mAb. Тогда их стали конъюгировать с радионуклидами. Эти агенты оказались эффективными для лечения пациентов со злокачественными новообразованиями, резистентными к mAb, но не могли использоваться широко из-за их дозозависимой токсичности для клеток костного мозга. Третий тип препаратов для прицельного терапевтического воздействия на злокачественные клетки представлял собой mAb, конъюгированными с химиопрепаратами. Они оказались более эффективными и вызывали меньшее количество неспецифических осложнений при лечении острой миелоидной лейкемии (acute myelogenous leukemia, AML), чем mAb, конъюгированные с радионуклеотидами. Но и к ним были обнаружены резистентности.

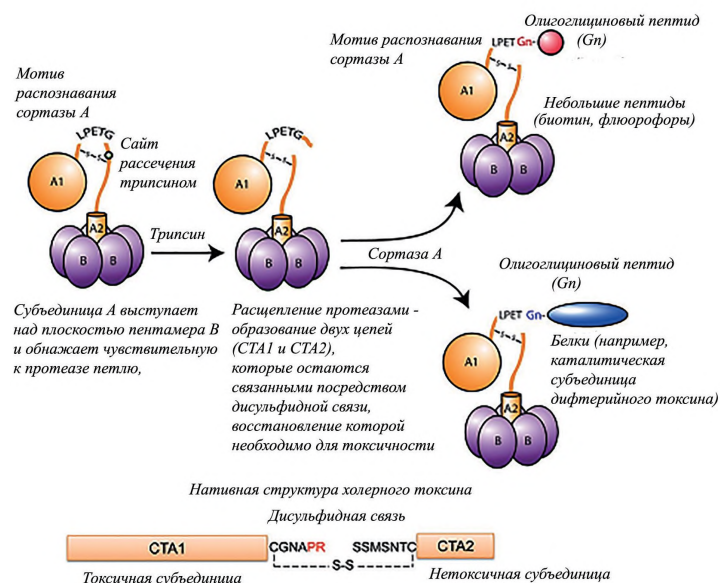


Рисунок 8 – Схема конструирования холерного токсина со свойствами дифтерийного. Показано присоединение каталитической субъединицы дифтерийного токсина (G5DTA) к цепи СТА1 предварительно собранного холерного токсина СТХ. Ферментативная субъединица дифтерийного токсина, обладающего АДФ-рибозилтрансферазной активностью, достигла цитоплазмы клетки, «двигаясь» через ЭР по «маршруту» СТА1 холерного токсина. Результат – остановка белкового синтеза и гибель клетки. Подробно см. в работе С.Р. Guimaraes с соавт. [91]

стентные опухолевые клетки, что потребовало дальнейшего совершенствование препаратов, действующих через специфическое узнавание рецепторов на поверхности опухолевых клеток [39].

Способность иммунотоксинов к прицельному уничтожению раковых клеток начинается с одной молекулы ферментативной субъединицы токсина, доставленной к поверхности клетки-мишени специфическим антителом (см., например, работу М. Yamaizumi с соавт. [33]). Поэтому иммунотоксины представляют собой некий предел развития таких средств терапии злокачественных опухолей крови. В качестве ферментативной молекулы при конструировании иммунотоксинов используют ферментативные субъединицы (домены) токсинов, блокирующие белковый синтез в клетках. Среди растительных токсинов наиболее часто используются рицин и абрин; среди бактериальных – одноцепочечные токсины: дифтерийный и экзотоксин псевдомонад.

Разработчики иммунотоксинов учитывают то обстоятельство, что обе субъединицы токсина содержат большое количество углеводных групп, связывающих их с неизменными тканями, и, в частности, с тканями печени и почек. Поэтому прежде чем конъюгировать субъединицы с антителом,

их дегликозируют различными способами (получая рекомбинантные формы токсина в кишечной палочке, химическим путем и др.). Оптимальным объектом для лечения иммунотоксинами являются опухолевые клетки расположены внутри сосудов и доступны для препарата при внутривенном введении. К тому же иммунная система таких пациентов часто утрачивает способность к эффективному антительному ответу на сам иммунотоксин. Конструирование иммунотоксинов, используемых в медицинских целях, предполагает повышение их специфичности именно к опухолевым клеткам и как можно большую их безопасность для клеток нормальных тканей. В клинике токсичность таких препаратов оценивают по так называемой максимальной переносимой дозе (maximum tolerated dose, MTD). Признаки ее превышения неспецифические: астения, подъем уровня печеночных трансаминаз в крови, гипотензия. При появлении таких симптомов дозу препарата снижают. При более высокой дозе иммунотоксина у пациента может развиваться синдром пропускания сосудов (vascular leak syndrome, VLS; Clarkson syndrome), вызванный высвобождением цитокинов после гибели в коже периваскулярных Т-клеток. Обычно VLS встречается без отека

легких. Количества иммунотоксинов, вызывающих осложнения, находятся в пределах десятков микрограммов на килограмм массы тела пациента [39]. Наиболее распространенными побочными эффектами, связанными с лечением Денилейкином дифтитоксом, стали нечеткость зрения или нарушение цветового зрения, тошнота, диарея, кожная сыпь и мышечная боль, гриппоподобные симптомы и, что наиболее важно, VLS [92].

Прогнозирование токсичности белков и выявление искусственных токсинов. Для прогнозирования токсичности белков *in silico* разработаны специальные программы (инструменты), основанные на машинном обучении (machine-learning) распознавания белковых последовательностей. Их же можно использовать для выявления искусственных токсинов [77] (рисунок 9):

веб-сервис *ThreatSEQ*, разработанный Battelle Memorial Institute, идентифицирует вызывающие озабоченность последовательности при сравнении с базой данных известных токсичных белков²⁶;

веб-сервис *ToxinPred2* позволяет обнаруживать токсичных бактериальных белков и пептидов с помощью методов машинного обучения, основанных на информации об аминокислотной последовательности²⁷;

веб-сервис *ClanTox* – машина для классификации токсинов и веб-сервер, основанный на извлечении признаков из первичной последовательности белка с последующим применением системы классификации, обученной на известных токсинах животных. Для заданного входного списка последовательностей, ядовитых или неядовитых, система прогнозирует, является ли каждая последовательность токсиноподобной используется выявления пептидных ингибиторов ионных каналов, среди которых много хорошо охарактеризованных токсинов²⁸;

веб-сервис *ToxClassifier* доступен для использования в виде веб-приложения или отдельного загружаемого инструмента для классификации токсинов из последовательностей нетоксичных белков. Позволяет просто и последовательно отличать токсины от нетоксичных последовательностей с точностью >99 % и сравнивать его с широко используемыми методами аннотации токсинов. Также сообщает о наиболее подходящей аннотации, позволяющей поместить токсин в наиболее подходящее семейство белков-токсинов, или связывает его с нетоксичным белком, имеющим наиболее близкую гомологию, что обеспечивает улучшенное управление существующими биологиче-

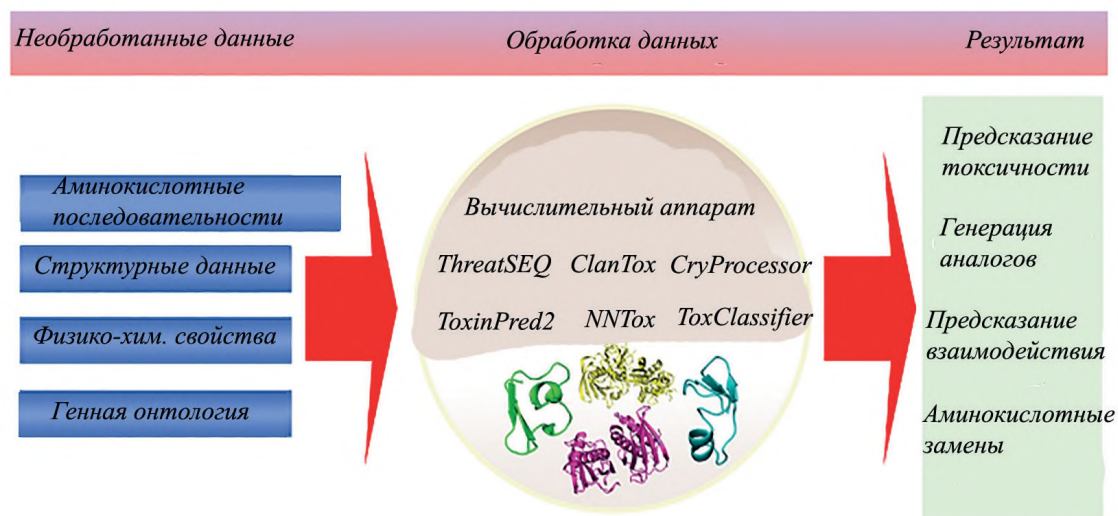


Рисунок 9 – Инструменты для создания и выявления новых токсических белков на основе методов машинного обучения распознавания белковой последовательности [77]

²⁶ Twist Bioscience Adopts Battelle’s ThreatSEQ™ DNA Screening Web Service for Advanced Biosecurity. URL: <https://www.businesswire.com/news/home/20190409005349/en/Twist-Bioscience-Adopts-Battelle%E2%80%99s-ThreatSEQ%E2%84%A2-DNA-Screening-Web-Service-for-Advanced-Biosecurity> (дата обращения: 05.12.2023).

²⁷ Welcome to ToxinPred2. URL: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred2/> (дата обращения: 05.12.2023).

²⁸ ClanTox Classifier of short ANimal TOXins. URL: <https://www.hsls.pitt.edu/obrc/index.php?page=URL1250871319> (дата обращения: 05.12.2023)

скими базами данных и новыми проектами по веномике²⁹;

веб-сервис *NNTox* – предсказание токсичности белка на основе нейронной сети. Основан на извлечении признаков из первичной последовательности белка с последующим применением системы классификации, обученной на известных токсинах животных. Для заданного входного списка последовательностей, ядовитых или неядовитых, система *ClanTox* прогнозирует, является ли каждая последовательность токсиноподобной. *ClanTox* предоставляет ранжированный список кандидатов с положительным прогнозом в соответствии со статистической достоверностью. Для каждого белка представлена дополнительная информация, включая наличие сигнального пептида, количество остатков цистеина и соответствующие функциональные аннотации, оценивающей потенциальную токсичность последовательности запрашиваемого белка на основе аннотации ресурса *gene ontology (GO)*³⁰;

веб-сервис *HybGPSO* – алгоритм гибридного роя генетической оптимизации. Позволяет точно прогнозировать функции слитых белков;

веб-сервис *CryProcessor* – написанный на Python инструмент для поиска и извлечения токсинов *Cry* из данных последовательностей Illumina или из файлов *Fasta* белков. Он включает в себя несколько частей: сканирование на основе *hmm* потенциальных токсинов *Cry*, получение информации о доменах, извлечение токсинов *Cry* только с 3 доменами

и сравнение обнаруженных токсинов с номенклатурой *Vt*³¹.

Доступ в эти сервисы свободен.

Среди бактериальных токсинов наибольшую опасность представляют бинарные токсины. Токсичность ботулинического токсина серотипов А и В превосходит аналогичный показатель боевых ОВ. Хорошо охарактеризованные бактериальные токсины – это только часть рисков, связанных с поражениями такими токсинами. У многих из них имеются малоизученные аналоги у других видов бактерий, гены которых либо экспрессированы, либо могут быть экспрессированы при вставке промоторной области. Методами компьютерной геномики установлены изоформы бактериальных токсинов, изучение биологических свойств которых еще не началось. Хорошая изученность структуры и функции, составляющих бинарные токсины субъединиц (функциональных доменов), позволяют их модификацию в направлении изменения спектра целей, повышения токсичности, изменения механизма поражающего действия и др. Такие токсины способны вызывать труднообъяснимые поражения людей и животных. Для прогнозирования токсичности белков в условиях *in silico* и для выявления искусственных токсинов и малоизвестных токсинов-аналогов, могут быть использованы специальные программы распознавания белковых последовательностей, основанные на машинном обучении (*machine learning*).

²⁹ *ToxClassifier*. URL: <https://github.com/rgacesa/ToxClassifier> (дата обращения: 05.12.2023).

³⁰ Ресурс «Генная онтология» (*The Gene Ontology Resource, GO*) – это общественный ресурс по биоинформатике. URL: <https://geneontology.org/> (дата обращения: 05.12.2023).

³¹ *CryProcessor*. URL: https://github.com/anton-shikov/cry_processor (дата обращения: 05.12.2023).

Список источников/References

1. Вертиев ЮВ. Бактериальные токсины: биологическая сущность и происхождение. *Журн микробиол эпидемиол иммунобил.* 1996;(3):43–6.
Vertiev JuV. Bacterial toxins: their biological essence and origin. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 1996;(3):43–6 (in Russian).
2. Бухарин ОВ, Литвин ВЮ. *Патогенные бактерии в природных экосистемах.* Екатеринбург; 1997.
Buharin OV, Litvin VJu. *Pathogenic bacteria in natural ecosystems.* Ekaterinburg; 1997 (in Russian).
3. Bezrukov SM, Nestorovich EM. Inhibiting bacterial toxins by channel blockage. *Pathog Dis.* 2016;74(2):ftv113. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv113>
4. Rudkin JK, McLoughlin RM, Preston A, Massey RC. Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? *PLoS Pathog.* 2017;13(9):e1006452. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006452>
5. Biernbaum EN, Kudva IT. AB5 Enterotoxin-Mediated Pathogenesis: Perspectives Gleaned from Shiga Toxins. *Toxins (Basel).* 2022;14(1):62. <https://doi.org/10.3390/toxins14010062>

6. Márquez-López A, Fanarraga ML. AB Toxins as High-Affinity Ligands for Cell Targeting in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(13):11227. <https://doi.org/10.3390/ijms241311227>
7. Bonifacino JS, Rojas R. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:568–79. <https://doi.org/10.1038/nrm1985>
8. Sandvig K, Skotland T, van Deurs B, Klok TI. Retrograde transport of protein toxins through the Golgi apparatus. *Histochem Cell Biol.* 2013;140:317–326.
9. Lukassen S, Chua R, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley Th, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 2020;39(10):e105114. <https://doi.org/10.15252/embj.20105114>
10. Finlay B, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1997. 53(2);210–30. <https://doi.org/10.1128/mr.53.2.210-230.1989>
11. Sanyaolu A, Okorie Ch, Marinkovic A, Haider H. The emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Ther Adv Infect Dis.* 2021. <https://doi.org/10.1177/204993612111024372>
12. Littler DR, Ang SY, Moriel DG, Kocan M, Kleifeld O, Johnson MD, et al. Structure-function analyses of a pertussis-like toxin from pathogenic *Escherichia coli* reveal a distinct mechanism of inhibition of trimeric G-proteins. *J Biol Chem.* 2017;292(36):15143–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796094>
13. Lemichez E, Flatau G, Bruzzzone M, Boquet P, Gauthier M. Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. *Mol Microbiol.* 1997;24(7):1061–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4151781.x>
14. Petosa C, Collier P, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 1997;385(6619):833–38. <https://doi.org/10.1038/385833a0>
15. Trescos Y, Tournier J-N. Cytoskeleton as an emerging target of anthrax toxins. *Toxins.* 2012;4:83–97. <https://doi.org/10.3390/toxins4020083>
16. Zuverink M, Barbieri JT. Protein Toxins That Utilize Gangliosides as Host Receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;156:325–54. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.010>
17. Uchida I, Ishihara R, Tanaka K, Hata E, Makino SI, Kanno T, et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [32P] NAD. *Microbiology (Reading).* 2009;155(Pt 11):3710–18. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028399-0>
18. Pavlik BJ, Hruska EJ, Van Cott KE, Blum PH. Retargeting the *Clostridium botulinum* C2 toxin to the neuronal cytosol. *Sci Rep.* 2016;6:23707. <https://doi.org/10.1038/srep23707>
19. Friebe S, van der Goot F, Bürgi J. The Ins and Outs of Anthrax Toxin. *Toxins.* 2016;8:69. <https://doi.org/10.3390/toxins8030069>
20. Rossetto O, Montecucco C. Tables of Toxicity of Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Toxins (Basel).* 2019;11(12):686. <https://doi.org/10.3390/toxins11120686>
21. Schmitt CK, Meysick KC, Brien AD. Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis.* 1999;5(2):224–34. <https://doi.org/10.3201/eid0502.990206>
22. Dal Peraro M, van der Goot FG. Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(2):77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
23. Berube BJ, Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* α -toxin: nearly a century of intrigue. *Toxins (Basel).* 2013;5(6):1140–66. <https://doi.org/10.3390/toxins5061140>
24. Li Y, Li Y, Mengist HM, Zhang C, Wang B, Li T, et al. Structural Basis of the Pore-Forming Toxin/Membrane. *Interaction Toxins (Basel).* 2021;13(2):128. <https://doi.org/10.3390/toxins13020128>
25. Bischofberger M, Iacovache I, van der Goot FG. Pathogenic pore-forming proteins: function and host response. *Cell Host Microbe.* 2012;12(3):266–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.005>

26. Xiang Y, Yan C, Guo X, Zhou K, Li S, Gao Q, et al. Host-derived, pore-forming toxin-like protein and trefoil factor complex protects the host against microbial infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(18):6702–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321317111>
27. Galinier R, Portela J, Moné Y, Allienne JF, Henri H, Delbecq S, et al. Biophalysin, a new β pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*. 2013;9(3):e1003216. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003216>
28. Ulhuq FR, Mariano G. Bacterial pore-forming toxins. *Microbiology (Reading)*. 2022;168(3):001154. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001154>
29. Dudev T, Lim C. Ion selectivity in the selectivity filters of acidsensing ion channels. *Sci Rep*. 2015;5:7864. <https://doi.org/10.1038/srep07864>
30. Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Kehoe M, et al. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol*. 1996;165(1):73–9. <https://doi.org/10.1007/s002030050300>
31. Bhakdi S, Tranum-Jensen J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev*. 1991;55(4):733–51. <https://doi.org/10.1128/mr.55.4.733-751.1991>
32. Ющук НД, Кулагина МТ. Дифтерия: клиническое течение, диагностика и лечение. *Русский медицинский журнал*. 1997;(4):208–17.
- Jushchuk ND, Kulagina MT. Diphtheria: clinical course, diagnosis and treatment. *Russkij Medicinskij Zhurnal*. 1997;(4):208–17 (in Russian).
33. Yamaizumi M, Mekada E, Uchida T, Okada Y. One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*. 1978;15(1):245–50. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90099-5)
34. Liu PV. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. 3. Identity of the lethal toxins produced *in vitro* and *in vivo*. *J Infect Dis*. 1966;116(4):481–89. <https://doi.org/10.1093/infdis/116.4.481>
35. Liu PV. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas aeruginosa (clinical manifestation and current therapy)*. Doggett RG, Ed. N.Y.; 1979. P. 90–135.
36. Мороз АФ, Анциферова НГ, Баскакова НИ. Синегнойная инфекция. Мороз АФ, ред. М.; 1988. Moroz AF, Anciferova NG, Baskakova NI. *Pseudomonas infection*. Moroz AF, Ed. Moscow; 1988 (in Russian).
37. McCluskey AJ, Collier RJ. Receptor-directed chimeric toxins created by sortase-mediated protein fusion. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(10):2273–81. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0358>
38. Лазарева АВ, Чеботарь ИВ, Крыжановская ОА, Чеботарь ВИ, Маянский НА. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клин микробиол антимикроб химиотер*. 2015;17(3):170–86. Lazareva AV, Chebotar' IV, Kryzhanovskaja OA, Chebotar' VI, Majanskij NA. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases. *Klin mikrobiol antimikrob himioter*. 2015;17(3):170–86 (in Russian).
39. Kreitman RJ, Siegall CB, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Properties of chimeric toxins with two recognition domains: interleukin 6 and transforming growth factor alpha at different locations in *Pseudomonas* exotoxin. *Bioconjug Chem*. 1992;3(1):63–8. <https://doi.org/10.1021/bc00013a010>
40. Tian S, Zhou N. Gaining New Insights into Fundamental Biological Pathways by Bacterial Toxin-Based Genetic Screens. *Bioengineering (Basel)*. 2023;10(8):884. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10080884>
41. Chan YS, Ng TB. Shiga toxins: From structure and mechanism to applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:1597–610. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7236-3>
42. De SN. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholera*. *Nature*. 1959;183(4674):1533–4. <https://doi.org/10.1038/1831533a0>
43. Bharati K, Ganguly NK. Cholera toxin: a paradigm of a multifunctional protein. *Indian J Med Res*. 2011;133(2):179–87. PMID: 21415492.
44. He X, Yang J, Ji M, Chen Y, Chen Y, Li H, et al. Potential delivery system based on cholera toxin: A macromolecule carrier with multiple activities. *J Control Release*. 2022;343:551–63. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.050>
45. Weiss AA, Hewlett EL, Myers GA, Falkow S. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. *J Infect Dis*. 1984;150:219–22. <https://doi.org/10.1093/infdis/150.2.2194>
46. Gregg KA, Merkel TJ. Pertussis Toxin: A Key Component in Pertussis Vaccines? *Toxins (Basel)*. 2019;11(10):557. <https://doi.org/10.3390/toxins11100557>

47. Ernst K. Novel Strategies to Inhibit Pertussis Toxin. *Toxins (Basel)*. 2022;14(3):187.
<https://doi.org/10.3390/toxins14030187>
48. Carbonetti NH. Contribution of Pertussis Toxin to the Pathogenesis of Pertussis Disease. *Pathog Dis*. 2015;73:ftv073.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftv073>
49. Kilgore PE, Salim AM, Zervos MJ, Schmitt H.-J. Pertussis: Microbiology, Disease, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2016;29:449–86.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00083-15>
50. Scanlon K, Skerry C, Carbonetti N. Association of Pertussis Toxin with Severe Pertussis Disease. *Toxins (Basel)*. 2019;11(7):373.
<https://doi.org/10.3390/toxins11070373>
51. Saitoh M, Tanaka K, Nishimori K, Makino SI, Kanno T, Ishihara R, et al. The *artAB* genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Microbiology*. 2005;151:3089–96.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27933-0>
52. Johnson TJ, DebRoy C, Belton S, Williams ML, Lawrence M, Nolan LK, et al. Pyrosequencing of the Vir Plasmid of Necrotogenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol*. 2010;144(1–2):100–9.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.022>
53. Scuron MD, Boesze-Battaglia K, Dlakić M, Shenker BJ. The Cytolethal Distending Toxin Contributes to Microbial Virulence and Disease Pathogenesis by Acting As a Tri-Perditious Toxin. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:168.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00168>
54. Lai YR, Chang YF, Ma J, Chiu CH, Kuo ML, Lai CH. From DNA Damage to Cancer Progression: Potential Effects of Cytolethal Distending Toxin. *Front Immunol*. 2021;12:760451.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760451>
55. Pickett CL, Cottle DL, Pesci EC, Bikah G. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* cytolethal distending toxin genes. *Infect Immun*. 1994;62:1046–51.
<https://doi.org/10.1128/iai.62.3.1046-1051.1994>
56. Grasso F, Frisan T. Bacterial Genotoxins: Merging the DNA Damage Response into Infection Biology. *Biomolecules*. 2015;5(3):1762–82.
<https://doi.org/10.3390/biom5031762>
57. Ceelen LM, Decostere A, Ducatelle R, Haesebrouck F. Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. *Microbiol Res*. 2006;161(2):109–20.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.04.002>
58. Guerra L, Cortes-Bratti X, Guidi R, Frisan T. The biology of the cytolethal distending toxins. *Toxins (Basel)*. 2011;3(3):172–90.
<https://doi.org/10.3390/toxins3030172>
59. Nougayrede JP, Taieb F, De Rycke J, Oswald E. Cyclomodulins: Bacterial Effectors That Modulate the Eukaryotic Cell Cycle. *Trends Microbiol*. 2005;13(3):103–10.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.01.002>
60. Pirazzini M, Henke T, Rossetto O, Mahrhold S, Krez N, Rummel A, et al. Neutralisation of specific surface carboxylates speeds up translocation of botulinum neurotoxin type B enzymatic domain. *FEBS Lett*. 2013;587(23):3831–86.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.010>
61. Contreras E, Masuyer G, Qureshi N, Chawla S, Dhillon HS, Lee HL, Chen J, et al. A neurotoxin that specifically targets *Anopheles mosquitoes*. *Nat Commun*. 2019;10(1):2869.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-10732-w>
62. Peck MW, Smith TJ, Anniballi F, Austin JW, Bano L, Bradshaw M, et al. Historical perspectives and guidelines for botulinum neurotoxin subtype nomenclature. *Toxins*. 2017;9:38.
<https://doi.org/10.3390/toxins9010038>
63. Rosales RL, Bigalke H, Dressler D. Pharmacology of botulinum toxin: differences between type A preparations. *Eur J Neurol*. 2006;Suppl 1:2–10.
<https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2006.01438.x>
64. Megighian A, Pirazzini M, Fabris F, Rossetto O, Montecucco C. Tetanus and tetanus neurotoxin: from peripheral uptake to central nervous tissue targets. *J Neurochem*. 2021;158:1244–1253.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15330>
65. Rao AK, Sobel J, Chatham-Stephens K, Luquez C. Clinical guidelines for diagnosis and treatment of botulism. *MMWR Recommendations Rep*. 2021;70:1–30.
<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/rr/rr7002a1.htm>

66. Плечитный ДФ. *Экспериментальное изучение патогенеза столбнячной интоксикации*. М.; 1958.
Plechitnyj DF. *Experimental study of the pathogenesis of tetanus intoxication*. Moscow; 1958 (in Russian).
67. Arnon S. Human tetanus and human botulism. In: *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. Rood JI, McClane BA, Songer JG, Titball RW, Eds. San Diego: Academic Press; 1997. P. 95–115.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111654>
68. Dong M, Masuyer G, Stenmark P. Botulinum and tetanus neurotoxins. *Annu Rev Biochem*. 2019;88:811–37.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111654>
69. Halpern J, Neale E. Neurospecific binding, internalization and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1995;195(1):221–41.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-85173-5_10
70. Doxey AC, Mansfeld MJ, Montecucco C. Discovery of novel bacterial toxins by genomics and computational biology. *Toxicon*. 2018;147:2–12.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.002>
71. Montecucco C, Molgó J. Botulinum neurotoxins: revival of an old killer. *Curr Opin Pharmacol*. 2005;5(3):274–279.
<https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.12.006>
72. Шихкеримов РК, Истомина ЕВ. Рекомбинантные ботулотоксины как новый этап развития ботулинотерапии. Возможности и перспективы применения в неврологической практике. *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. 2022;14(6): 103–9.
- Shikhkerimov RK, Istomina EV. Recombinant botulinum toxin as a new stage in the development of botulinum toxin therapy. Possibilities and perspectives of use in neurological practice. *Neurology, Neuropsychiatry, Psychosomatics*. 2022;14(6): 103–9 (in Russian).
<https://doi.org/10.14412/2074-2711-2022-6-103-109>
73. White J, Herman A, Pullen AM, Hashimoto K, Sugaya K, Kubo M, et al. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: Stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell*. 1989;56:27–35.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90980-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90980-x)
74. Schlievert P. Searching for superantigens. *Immunol Infect*. 1997;26(2):283–90.
<https://doi.org/10.3109/08820139709048934>
75. Blank C, Luz A, Bendigs S, Erdmann A, Wagner H, Heeg K. Superantigen and endotoxin synergize in the induction of lethal shock. *Eur J Immunol*. 1997;27(4):825–33.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830270405>
76. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson D.A, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*. 2001;15(4):579–89.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00210-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00210-2)
77. Efremenko E, Aslanli A, Lyagin I. Advanced Situation with Recombinant Toxins: Diversity, Production and Application Purposes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(5):4630.
<https://doi.org/10.3390/ijms24054630>
78. Deist BR, Rausch MA, Fernandez-Luna MT, Adang MJ, Bonning BC. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins (Basel)*. 2014;6(10):3005–27.
<https://doi.org/10.3390/toxins6103005>
79. Шамсутдинов АФ, Тюрин ЮА. Белковые токсины *Staphylococcus aureus*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014;91(2):113–20.
Shamsutdinov AF, Tjurin JuA. Protein toxins of *Staphylococcus aureus*. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2014;91(2):113–20 (in Russian).
80. Wu SJ, Koller CN, Miller DL, Bauer LS, Dean DH. Enhanced toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin in coleopterans by mutagenesis in a receptor binding loop. *FEBS Lett*. 2000;473:227–32.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01505-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01505-2)
81. Liu XS, Dean DH. Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Prot Eng Design Selec*. 2006;19:107–11.
<https://doi.org/10.1093/protein/gzj009>
82. Brin MF, Lew MF, Adler CH, Comella CL, Factor SA, Jankovic J, et al. Safety and efficacy of NeuroBloc (botulinum toxin type B) in type A-resistant cervical dystonia. *Neurology*. 1999; 53(7):1431–38.
<https://doi.org/10.1212/wnl.53.7.1431>
83. Pappert EJ, Germanson T. Myobloc/Neurobloc European Cervical Dystonia Study Group. Botulinum toxin type B vs. type A in toxin-naïve patients with cervical dystonia: Randomized, double-blind, noninferiority trial. *Mov Disord*. 2008;23(4):510–17.
<https://doi.org/10.1002/mds.21724>

84. Tao L, Peng L, Berntsson RP, Liu SM, Park S, Yu F, et al. Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors. *Nat Commun.* 2017;8(1):53.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00064-y>

85. Antignani A, Ho E, Bilotta MT, Qiu R, Sarnvosky R, FitzGerald DJ. Targeting Receptors on Cancer Cells with Protein Toxins. *Biomolecules.* 2020;10(9):1331.
<https://doi.org/10.3390/biom10091331>

86. Kiyokawa T, Shirono K, Hattori T, Nishimura H, Yamaguchi K, Nichols JC, et al. Cytotoxicity of interleukin 2-toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Cancer Res.* 1989;49(14):4042–46. PMID: 2786749.

87. Ardini M, Vago R, Fabbrini MS, Ippoliti R. From Immunotoxins to Suicide Toxin Delivery Approaches: Is There a Clinical Opportunity? *Toxins (Basel).* 2022;14(9):579.
<https://doi.org/doi:10.3390/toxins14090579>

88. Contet A, Caussanel V, Beck A, Lowe P. Immunotoxines et immunocytokines [Immunotoxins and immunocytokines]. *Med Sci (Paris).* 2019;35(12):1054–61 (in French).
<https://doi.org/10.1051/medsci/2019205>

89. Kreitman RJ, Siegall CB, Chaudhary VK, FitzGerald DJ, Pastan I. Properties of chimeric toxins with two recognition domains: interleukin 6 and transforming growth factor alpha at different locations in *Pseudomonas exotoxin*. *Bioconjug Chem.* 1992;3(1):63–8.
<https://doi.org/10.1021/bc00013a010>

90. Fujinaga Y, Wolf AA, Rodighiero C. Gangliosides that associate with lipid rafts mediate transport of cholera and related toxins from the plasma membrane to endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell.* 2003;14:4783–93.
<http://dx.doi.org/10.1091/mbc>

91. Guimaraes CP, Carette JE, Varadarajan M, Antos J, Popp MW, Spooner E, et al. Identification of host cell factors required for intoxication through use of modified cholera toxin. *J Cell Biol.* 2011;195(5):751–64.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201108103>

92. Avarbock AB, Loren AW, Park JY, Junkins-Hopkins JM, Choi J, Litzky LA, et al. Lethal vascular leak syndrome after denileukin diftitox administration to a patient with cutaneous gamma/delta T-cell lymphoma and occult cirrhosis. *Am J Hematol.* 2008;83(7):593–5.
<https://doi.org/10.1002/ajh.21180>

Вклад автора / Author contribution

Разработка концепции статьи; сбор, анализ и систематизация научной литературы; написание статьи / Elaboration of the concept of the paper; collection, analysis, and systematization of scientific literature; writing and edition of paper.

Сведения о рецензировании / Peer review information

Статья прошла двустороннее анонимное «слепое» рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала и в РИНЦе / The article has been doubleblind peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board and from Russian Science Citation Index database.

Об авторе/ Author

Федеральное государственное бюджетное учреждение «27 Научный центр имени академика Н.Д. Зелинского» Министерства обороны Российской Федерации, 111024, Российская Федерация, г. Москва, проезд Энтузиастов, д. 19.

Супотницкий Михаил Васильевич. Главный специалист, канд. биол. наук, ст. науч. сотр.

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Контактная информация автора: 27nc_l@mil.ru

Federal State Budgetary Establishment “27 Scientific Centre Named after Academician N.D. Zelinsky” of the Ministry of Defence of the Russian Federation. Entuziastov Passage, 19, Moscow 111024, Russian Federation.

Mikhail V. Supotnitskiy. Senior Researcher. Chief Specialist. Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-3193-1032>

Contact information for author: Mikhail V. Supotnitskiy; 27nc_l@mil.ru