

ГИПОТЕЗА ТКАНЕСПЕЦИФИЧНОСТИ ДЕЙСТВИЯ ДИФТЕРИЙНОГО ТОКСИНА

А. В. Алешин ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Дифтерия — инфекция, вызываемая токсигенными штаммами бактерии *Corynebacterium diphtheriae*. Возбудитель выделяет токсин, который воздействует на сердце, почки, надпочечники, спинномозговые и черепно-мозговые нервы. Ткане- и органоспецифичность действия дифтерийного токсина принято связывать с особенностями кровоснабжения указанных органов, однако в статье предложена гипотеза, учитывающая физико-химические свойства молекулы токсина (наличие положительно заряженного R-домена в субъединице В молекулы) и представленность в клетках различного типа рецептора HB-EGF и корецептора CD9, с которыми токсин связывается для проникновения в клетку. Дано объяснение возможных механизмов осложнений при дифтерии с учетом гипотезы.

Ключевые слова: дифтерия, дифтерийный токсин, *Corynebacterium diphtheriae*, рецептор HB-EGF, корецептор CD9, тканеспецифичность, органоспецифичность

Благодарности: автор благодарит профессора Людмилу Кафарскую из Российского национального исследовательского медицинского университета имени Н. И. Пирогова за развитие интереса к научной работе и ценные советы при подготовке рукописи.

✉ **Для корреспонденции:** Алешин Антон Владимирович
Алтүфьевское шоссе, д. 62а, кв. 40, г. Москва, 127549; aleshanton@gmail.com

Статья получена: 26.06.2016 **Статья принята в печать:** 13.10.2016

THE HYPOTHESIS OF TISSUE-SPECIFIC ACTION OF DIPHTHERIA TOXIN

Aleshin AV ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Diphtheria is an infection caused by toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae*. The pathogen releases the toxin that affects heart, kidneys, adrenal gland, as well as spinal and cerebral nerves. Tissue- and organ-specific action of diphtheria toxin is considered to be associated with the blood supply to these organs. We propose the hypothesis that takes into account the physical and chemical properties of the toxin molecule (positively charged R-domain in the B subunit) and cell expression of different types of the HB-EGF receptor and CD9 co-receptor, which are responsible for the toxin penetration into the cell. The proposed hypothesis explains the possible mechanisms of diphtheria complications.

Keywords: diphtheria, diphtheria toxin, *Corynebacterium diphtheriae*, HB-EGF receptor, CD9 co-receptor, tissue specificity, organ specificity.

Acknowledgements: author thanks professor Lyudmila Kafarskaya from Pirogov Russian National Research Medical University for encouraging his interest in the scientific work and for invaluable advices in the preparation of the manuscript.

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton Aleshin
Altufevskoe shosse, d. 62a, kv. 40, Moscow, Russia, 127549; aleshanton@gmail.com

Received: 26.06.2016 **Accepted:** 13.10.2016

Дифтерия — классическая токсинемическая инфекция, вызываемая грамположительной бактерией *Corynebacterium diphtheriae*, в большей степени — действием ее токсина. Возбудитель проникает в слизистые оболочки рото- и носоглотки, гортани и трахеи, иногда — глаз и половых органов, формируется местный воспалительный очаг, который сопровождается некрозом клеток, свертыванием плазмы крови и отеком, появляется беловато-серый налет — пленка. В многослойном эпителии носоглотки, надгортанника, голосовых связок она неотделима от подлежащей ткани, в однослойном же эпителии гортани, трахеи и бронхов легко отделяется и способна закрыть собой воздухоносные пути, вызвав асфиксию.

Выделяемый токсигенными штаммами *C. diphtheriae* токсин, попадая в кровь, избирательно поражает сердце, почки, надпочечники, спинномозговые и черепные нервы [1]. В статье высказывается гипотеза о том, что ткане- и органоспецифичность действия токсина можно объяснить как физико-химическими свойствами молекулы, так и строением мембран клеток поражаемых органов.

Строение токсина и его проникновение в клетку

Дифтерийный токсин (ДТ) — это белок молекулярной массой 58 кДа (535 аминокислотных остатков, изоэлектрическая точка pI — 5,9), состоящий из двух субъединиц — А и В. Субъединица А обладает нуклеазной активностью [2] и АДФ-рибозилтрансферазной активностью — по отношению к фактору элонгации EF-2. Ее действие заключается в блокировании белоксинтезирующей системы клетки, что вызывает ее апоптоз. Субъединица В состоит из рецепторного R-домена, отвечающего за связь с рецептором HB-EGF, и трансмембранного T-домена [3].

Доставка субъединицы А токсина в клетку осуществляется в несколько стадий (рис. 1). На первой стадии (pH среды — около 7,4, заряд ДТ: $-9,44$) белок связывается R-доменом субъединицы В с рецептором HB-EGF и корецептором CD9 [3]. На второй стадии происходит клатрин-зависимый эндоцитоз токсина, пузырьки с ДТ вскоре превращаются в ранние эндосомальные везикулы. В то время как первичный клатриновый скелет отделяется

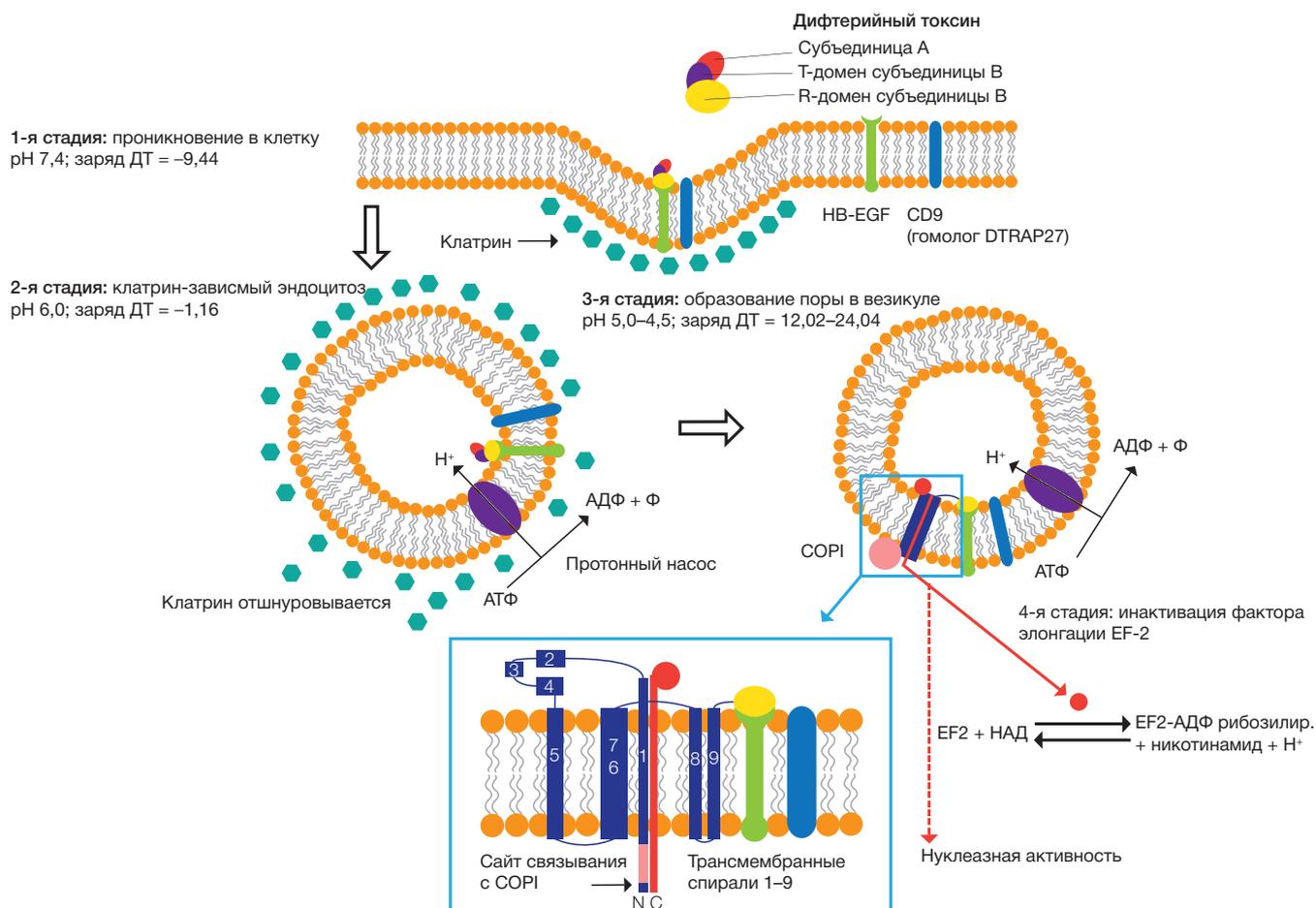


Рис. 1. Механизм проникновения дифтерийного токсина в клетку

от везикулы PIP-фосфатазой и белком теплового шока Hsp70 [4], а новые компоненты (белки COPI, Arf, Rab и др.) начинают присоединяться к ней [3, 4], протонный насос закисляет среду внутри пузырька: pH снижается до 6,0 [4], заряд ДТ изменяется до -1,16. На третьей стадии pH внутри везикулы падает до 5,0-4,5 [4], заряд белка становится положительным — от 12,02 до 24,04. Такие условия необходимы для изменения конформации Т-домена субъединицы В токсина и формирования поры в везикуле. Т-домен состоит из 9 трансмембранных спиралей (transmembrane helix, TH), которые, в свою очередь, упакованы в 3 слоя: в первом — амфифильные TH1-TH3, во втором — гидрофобные TH5-TH7, в третьем — TH8 и TH9, формирующие центральный кор [3]. TH1 тесно взаимодействует с каталитической субъединицей, а также имеет сайты связывания с комплексом COPI, играя ключевую роль в транслокации субъединицы А (наравне с TH2-TH4). На четвертой стадии свободная субъединица А инактивирует фактор элонгации EF-2.

Ткане- и органоспецифичность токсина

Тканеспецифичность токсина можно объяснить его физико-химическими свойствами, а именно: наличием R-домена (аминокислотные остатки 432-535 [3]), который обеспечивает взаимодействие токсина с рецептором HB-EGF. Положительный заряд этого домена (8,2 при pH 7,4, pI — 10,43,) определяет способность токсина связываться с рецептором отрицательно заряженной мембраны. Если

представить мембрану клетки как эквивалентную электрическую схему, то у нее обнаруживаются как емкостные (C), так и резистивные свойства (R), определяемые компонентами самой мембраны — фосфолипидами и белками, при этом одна сторона мембраны заряжена положительно, а другая — отрицательно [5]. Дефицит катионов на внутренней поверхности мембраны формирует отрицательный заряд внутри клетки, а их избыток на внешней поверхности мембраны — положительный заряд снаружи. Na $^+$ /K $^+$ АТФаза выполняет роль своеобразной батареи (E), создавая разность потенциалов за счет откачки 3 Na $^+$ и закачки 2 K $^+$. Это и есть пассивные электрические свойства мембран [5]. Но возбудимые клетки, в свою очередь, способны к перераспределению ионов во время деполяризации. На основе этого явления и построена предлагаемая гипотеза о тканеспецифичности токсина. Избыток катионов снаружи мембраны, свойственный потенциалу покоя, отталкивает ДТ, а временная инверсия ионов во время потенциала действия — привлекает. Также существуют специфические липиды — ганглиозиды, которые придают особые свойства высокоспециализированным клеткам, таким как нейроны и кардиомиоциты, где их концентрация от общего числа липидов может достигать 5-10 % [4]: сиаловые кислоты в их составе образуют сильный отрицательный заряд, что определяет тропность к ним положительно заряженных молекул.

В современной литературе органоспецифичность ДТ связывают с особенностями кровоснабжения поражаемых органов [1]. Однако ни печень, ни желудочно-кишечный тракт не подвержены воздействию токсина, хотя

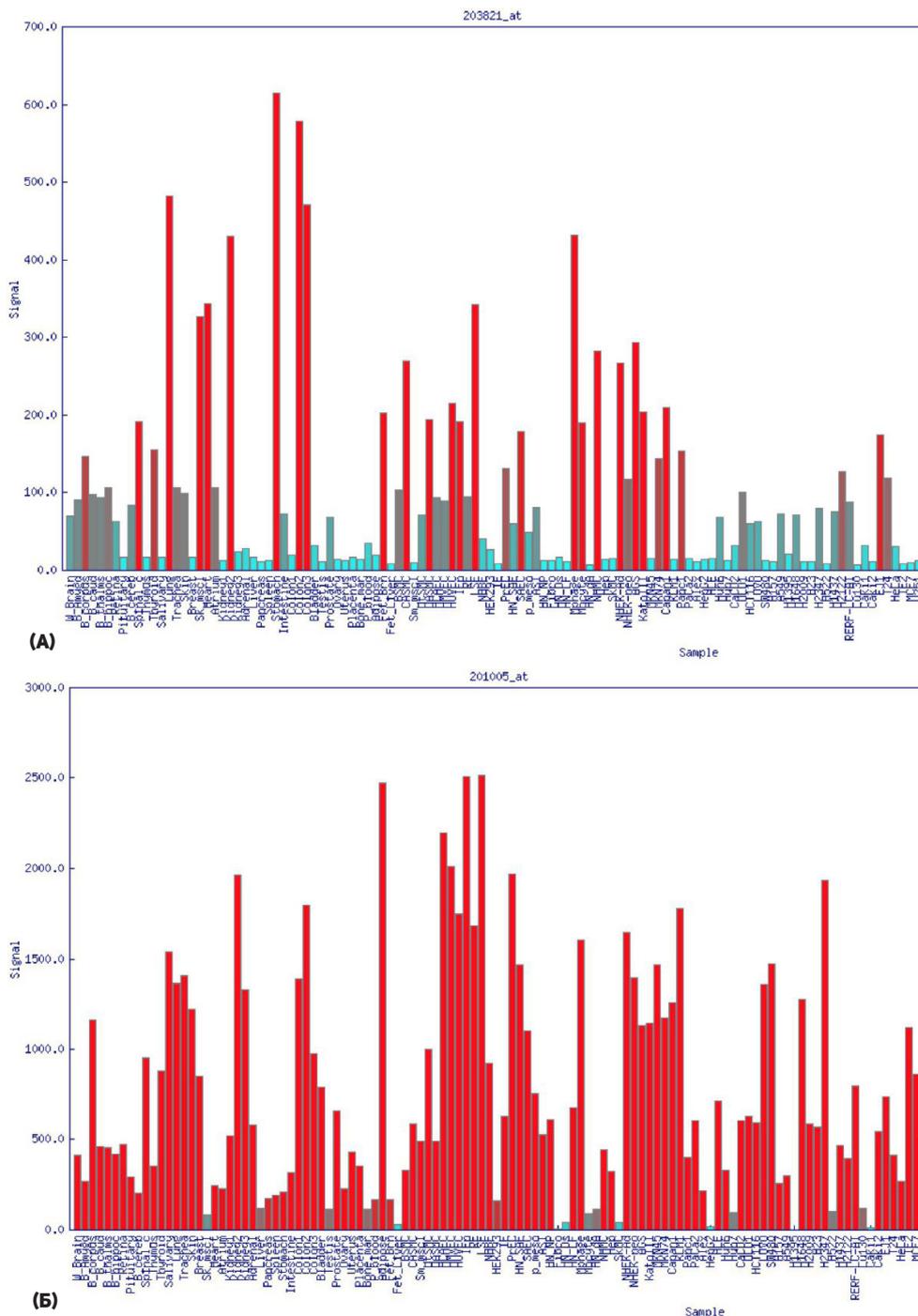


Рис. 2. Уровни экспрессии рецептора HB-EGF (А) и корецептора CD9 (Б) в тканях человека (по данным базы RefExA [6])

25 и 10 % сердечного выброса крови соответственно приходится именно на них. Здесь рассматривается предположение о том, что органоспецифичность токсина можно объяснить наличием и соотношением рецепторов HB-EGF и корецепторов CD9 в клетках различных типов. По данным базы RefExA [6], HB-EGF присутствует в большом количестве в спинномозговых нервах (Spinal_c), клетках щитовидной железы (Thyroid), легочном эпителии (Lung), гладкой мышечной ткани (Sm_mscl), кардиомиоцитах (Heart), почечном эпителии (Kidney_2), эпителии желудка (Stomach), кишечном эпителии (Colon2, Colon3) (рис. 2А). Что касается корецептора CD9, то его достаточно много почти во всех клетках, исключение составляют скелетные

миосимпласты (Sk_mscl), клетки печени (Liver), сперматогенный эпителий (Testis), гемопоэтические клетки костного мозга (Bone_mar) (рис. 2Б). Для действия дифтерийного токсина необходим и HB-EGF, и CD9, и этому условию отвечают клетки сердца, легких, ЖКТ, почек, щитовидной железы, спинномозговых и черепно-мозговых нервов.

Осложнения при дифтерии сквозь призму гипотезы

Первое осложнение гипертоксической формы дифтерии — миокардит [1], что можно объяснить наличием фазы плато при возбуждении кардиомиоцитов, у которых

при этом деполяризация протекает дольше, чем у клеток других возбудимых тканей. Далее наступает канальцевый нефроз [7], геморрагия надпочечников [8], а через недели, иногда уже после выздоровления, — невриты и полиневриты [9]. Такая последовательность связана с субстратной специфичностью токсина к EF-2, который в норме присутствует вблизи рибосом и шероховатого ретикула. В нейронах эти органеллы расположены только в соме; токсин проникает в клетку чаще всего через аксоны и дендриты и затем, чтобы достичь своего субстрата, субъединица А использует внутриклеточные механизмы переноса белка от отростков к телу — ретроградный транспорт. Факт использования таких механизмов переноса был установлен для многих токсинов [10], но скорость такого переноса очень медленная — около 1 мм/сут., из-за чего поражения со стороны нервной системы наступают позднее [9].

Нефроз может быть связан с особенностями устройства почечного фильтра: поры в наиболее узком его сегменте, гломерулярной базальной мембране, способны пропускать неотрицательно заряженные молекулы массой до 69 кДа, что связано с наличием отрицательно заряженного гликокаликса на поверхности мембран клеток [5]. ДТ, очевидно, фильтруется в капсулу Боумена–Шумлянского, где попадает в проксимальные каналы и захватывается за счет взаимодействия с комплексом мегалин–кублин [5], т. е. происходит его эндоцитоз. ДТ — кислый бе-

лок, поэтому описанное проникновение возможно только при наличии у молекулы сильного положительного полюса, который будет притянут гликокаликсом. Далее, вместо расщепления лизосомальными ферментами, субъединица А токсина проникает в цитозоль канальцевого эпителия и наступает нефроз [7].

Сказанное подтверждает, что особенностями кровоснабжения можно объяснить только вызываемую ДТ геморрагию надпочечников [8]. Интенсивность кровообращения в этом органе крайне высока: 3 крупных и около 25–30 мелких артерий. Это делает надпочечники уязвимыми к перепадам давления, определяет их склонность к тромбообразованию при обширной кровопотере, токсинемии и шоке, когда кровоснабжение одних органов (жизненно важных) усиливается в ущерб другим (менее важным) [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный комплексный подход позволяет судить как о механизме действия дифтерийного токсина, так и о его влиянии на инфекционный процесс в целом, что позволяет лучше понять патогенез дифтерии. На основе выдвинутой гипотезы могут быть предложены более совершенные методы терапии гипертоксических форм заболевания, а также может быть изучен механизм действия других токсинов.

Литература

1. Воробьев А. А., редактор. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: Медицинское информационное агентство; 2004. С. 440–50.
2. Chang MP, Baldwin RL, Bruce C, Wisniewski BJ. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science*. 1989 Dec 1;246 (4934): 1165–8.
3. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. *Toxins (Basel)*. 2011 Mar; 3 (3): 294–308. DOI: 10.3390/toxins3030294.
4. Internal Organization of the Cell. В книге: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2007.
5. Камкин А. Г., Каменский А. А., редакторы. *Фундаментальная и клиническая физиология*. М.: Академия; 2004. 1072 с.
6. Reference database for gene Expression Analysis [Интернет]. Tokyo, Japan: The University of Tokyo. c2002–2016 [дата об-

- ращения: октябрь 2016 г.]. Доступно по ссылке: http://www.lsbm.org/site_e/database/index.html.
7. Туровец Е. В., Зрячкин Н. И. Поражение почек в катамнезе дифтерии. *Лікар. Справа*. 2010; (7–8): 44–53.
8. Guarner J, Paddock CD, Bartlett J, Zaki SR. Adrenal gland hemorrhage in patients with fatal bacterial infections. *Mod Pathol*. 2008; 21 (9): 1113–20. DOI: 10.1038/modpathol.2008.98.
9. Скрипченко Н. В., Сорокина М. Н., Иванова В. В., Железникова Г. Ф. Новое в патогенезе поражения нервной системы при дифтерии. *Медицинская иммунология*. 1999; 1 (3–4): 86–7.
10. Pullen AH. Presynaptic terminal loss from alpha-motoneurons following the retrograde axonal transport of diphtheria toxin. *Acta Neuropathol*. 1992; 83 (5): 488–98.
11. Литвицкий П. Ф. Экстремальные состояния: шок. *Вопросы современной педиатрии*. 2010; 9 (4): 85–93.

References

1. Vorob'ev AA, editor. *Meditsinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya*. Moscow: Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo; 2004. P. 440–50. Russian.
2. Chang MP, Baldwin RL, Bruce C, Wisniewski BJ. Second cytotoxic pathway of diphtheria toxin suggested by nuclease activity. *Science*. 1989 Dec 1;246 (4934): 1165–8.
3. Murphy JR. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process. *Toxins (Basel)*. 2011 Mar; 3 (3): 294–308. DOI: 10.3390/toxins3030294.
4. Internal Organization of the Cell. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science; 2007.
5. Kamkin A. G., Kamenskiy A. A., editors. *Fundamental'naya i klinicheskaya fiziologiya*. M.: Akademiya; 2004. 1072 p. Russian.
6. Reference database for gene Expression Analysis [Internet].

- Tokyo, Japan: The University of Tokyo. c2002–2016 [cited: 2016 Oct]. Available from: http://www.lsbm.org/site_e/database/index.html.
7. Turovets EV, Zriachkin NI. [Kidney lesions in a diphtheria catamnesis]. *Lik Sprava*. 2010 Oct–Dec; (7–8): 44–53. Russian.
8. Guarner J, Paddock CD, Bartlett J, Zaki SR. Adrenal gland hemorrhage in patients with fatal bacterial infections. *Mod Pathol*. 2008; 21 (9): 1113–20. DOI: 10.1038/modpathol.2008.98.
9. Skripchenko NV, Sorokina MN, Ivanova VV, Zheleznikova GF. Novoe v patogeneze porazheniya nervnoy sistemy pri difterii. *Meditsinskaya immunologiya*. 1999; 1 (3–4): 86–7. Russian
10. Pullen AH. Presynaptic terminal loss from alpha-motoneurons following the retrograde axonal transport of diphtheria toxin. *Acta Neuropathol*. 1992; 83 (5): 488–98.
11. Litvitskiy PF. [Extreme states: a shock]. *Current Pediatrics*. 2010; 9 (4): 85–93. Russian