



DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-4-10

Роль токсинов в патогенности *Clostridium difficile**

Белый Ю. Ф.¹, Фиалкина С. В.¹, Троицкий В. И.²

¹ ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия

Role of toxins in *Clostridium difficile* pathogenicity*

Yu. F. Belyi¹, S. V. Fialkina¹, V. I. Troitskii²

¹ Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Public Health, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia

Для цитирования: Белый Ю. Ф., Фиалкина С. В., Троицкий В. И. Роль токсинов в патогенности *Clostridium difficile*. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;160(12): 4–10. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-4-10

For citation: Belyi Yu. F., Fialkina S. V., Troitskii V. I. Role of toxins in *Clostridium difficile* pathogenicity. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2018;160(12): 4–10. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-160-12-4-10

Резюме

✉ Corresponding author:

Белый Юрий Федорович
Yuri F. Belyi
belyi@gamaleya.org

Clostridium difficile — Грамположительный микроорганизм и частый возбудитель колитов, связанных с применением у людей антибиотиков широкого спектра действия. Развивающийся дисбаланс представителей нормальной флоры толстого кишечника способствует размножению патогена и сопровождается продукцией белковых токсинов — одноцепочечных мультидоменных токсинов TcdA и TcdB и бинарного токсина CDT. После проникновения TcdA, TcdB и CDT в эукариотические клетки путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, ферментативные домены TcdA и TcdB модифицируют регуляторные ГТФазы семейства Rho путем моноглюкозилирования, тогда как A-субъединица токсина CDT АДФ-рибозилирует молекулы мономерного актина. Модификация белков-мишеней приводит к их инактивации и развитию широкого спектра клеточных нарушений с признаками воспалительного поражения слизистой оболочки толстой кишки. В силу особо важной роли токсинов в патогенезе диффициле-инфекции, данные факторы патогенности рассматриваются в качестве основных компонентов, разрабатываемых лечебно-профилактических и диагностических препаратов. С другой стороны, использование токсинов *C. difficile* в инструментарию научного поиска позволяет получать фундаментальные данные о механизмах физиологических и патологических процессов в эукариотических клетках.

Summary

Clostridium difficile — Gram-positive microorganism and the frequent causative agent of colitis associated with the use of people with broad-spectrum antibiotics. The developing imbalance of the representatives of the normal flora of the large intestine promotes reproduction of the pathogen and is accompanied by the production of protein toxins - single-chain multi-domain toxins TcdA and TcdB and binary toxin CDT. After penetration of TcdA, TcdB and CDT into eukaryotic cells by receptor-mediated endocytosis, the enzymatic domains of TcdA and TcdB modify the regulatory GTPases of the Rho family by monoglucosylation, while the A-subunit of the toxin CDT ADP-ribosylated monomeric molecules. Modification of target proteins leads to their inactivation and the development of a wide range of cellular disorders with signs of inflammatory lesions of the mucous membrane of the colon. Due to the particularly important role of toxins in the pathogenesis of differential infection, these pathogenicity factors are considered as the main components of therapeutic, preventive and diagnostic drugs. On the other hand, the use of *C. difficile* toxins in the scientific search tools allows obtaining fundamental data on the mechanisms of physiological and pathological processes in eukaryotic cells.

* Иллюстрации к статье – на цветной вклейке в журнал.

* Illustration to the article are on the colored inset of the Journal.

Введение

Clostridium difficile – грамположительный анаэробный микроорганизм и один из основных возбудителей воспалительных заболеваний толстой кишки у людей. Инфекция включает в себя широкий спектр клинических проявлений от легких кишечных расстройств и диареи до псевдомембранозного колита и мегаколон [1–3]. Заболевание широко распространено в мире. Так, например, в США на долю возбудителя приходится около 500 тысяч случаев инфекции в год, из которых почти 30 тысяч случаев заканчиваются летальным исходом [4].

C. difficile образует споры, устойчивые к аэробным условиям, повышенной температуре, высушиванию, действию дезинфектантов, применяемых в клинических условиях и в быту, в том числе этанолу [5]. Эти особенности обуславливают способность *C. difficile* к длительному сохранению в объектах окружающей среды. Устойчивость же к кислому pH желудочного содержимого, действию пищеварительных ферментов 12-перстной

и тонкой кишки позволяет спорам достигать средних и нижних отделов кишечника, содержащее которых является благоприятным для герминации споровых форм в вегетативные [6].

Во многих случаях *C. difficile* встречается в пробах кишечного содержимого у здоровых людей [7]. Нормальная кишечная флора участвует в обеспечении эффективного контроля за размножением возбудителя, а нарушение ее природного состава, например в результате применения антибиотиков, приводит к размножению *C. difficile* [8, 9]. Последнее, в свою очередь, вырабатывают различные факторы вирулентности – нетоксического характера (такие как факторы подвижности, факторы адгезии), а также токсины. Действие последних и приводит, в конечном итоге, к развитию заболевания. Ввиду основополагающей роли белковых токсинов *C. difficile* в патогенезе диффициле-инфекции, настоящий обзор посвящен анализу свойств именно этой группы факторов патогенности возбудителя.

Глюкозилирующие токсины *C. difficile*

К числу основных факторов патогенности *C. difficile* относятся два белковых токсина TcdA и TcdB (старые названия – “toxin A” и “toxin B”). Оба токсина обладают схожим строением, освобождаются микроорганизмом в окружающую среду и вызывают воспаление и повреждение слизистой оболочки толстой кишки [10].

Молекулы токсинов TcdA и TcdB имеют молекулярную массу около 300 кД и образуют сложную структуру, состоящую из четырех основных доменов и описываемую в литературе как «ABCD модель» (Рис. 1) [11]. На NH₂-концевом участке локализован ферментативный домен А («А» – enzymatic activity). Домен С («С» – cutting) расположен вслед за доменом А и представляет собой участок, обладающий протеазной активностью [12]. Данный домен необходим для автокаталитического процессинга молекулы токсина путем отщепления домена А. Домен D («D» – delivery) расположен между доменами С и В и необходим, вероятно, для транслокации токсина через мембрану эндосомы в цитоплазму клетки-мишени [13]. Вторая важная роль домена D может состоять, наравне с доменом В, в участии во взаимодействии токсина и поверхностных структур эукариотической клетки [14]. COOH-концевой домен В необходим для взаимодействия с эукариотическим рецептором на поверхности клеток человека («В» – binding) [15]. Он состоит из 20–40 (в зависимости от штамма-продуцента и типа токсина) повторяющихся пептидов («CROPS» – The combined repetitive oligopeptides).

В качестве предполагаемых рецепторов для токсина TcdA рассматриваются поверхностный белок сахараза-изомальтаза [16] и поверхностный гликопротеин из семейства тепловых шоковых белков gp96 [17]. Однако окончательно вопрос о природе рецептора TcdA остается нерешенным до настоящего времени [18]. Для токсина TcdB в число установленных на сегодняшний день рецепторов входят

хондроитин сульфат протеогликан 4 (CSPG4) [19], NECTIN3 [20] и белки frizzled [21]. Таким образом, TcdB использует несколько рецепторов для достижения цитоплазмы клетки мишени.

После взаимодействия с рецептором токсины проникают в клетку путем так называемого «клатрин-зависимого эндоцитоза» [22]. Под действием кислого содержимого эндосомы происходит структурная реорганизация молекул токсинов и встраивание гидрофобных участков TcdA и TcdB в мембрану эндосомы и транслокация доменов А и С в цитоплазму [23]. Следом происходит автокаталитическое отщепление домена А от молекулы целого токсина и перемещение данного домена в цитоплазму [12], где происходит ферментативная инактивация эукариотических белков-мишеней.

В основе молекулярной природы вызываемых повреждений лежит способность TcdA и TcdB ковалентно модифицировать так называемые «Rho белки» клеток человеческого организма [24]. Модификация данных белков осуществляется путем присоединения глюкозы (моноголюкозильрование) к консервативному остатку серин-37 (у некоторых форм Rho – серин-35) и приводит к их полной инактивации [25].

Rho белки входят в суперсемейство Ras и представляют собой группу низкомолекулярных ГТФ-связывающих белков, функционирующих в роли молекулярных переключателей внутриклеточной передачи сигналов. Rho белки являются регуляторами огромного числа фундаментальных биологических процессов, связанных, в первую очередь, с функционированием актинового цитоскелета. Тем самым они контролируют механизмы подвижности, участвуют в пролиферации, прохождении клеточного цикла и делении эукариотических клеток, участвуют в их формообразовании и поляризации [26]. Применительно к инфекционному процессу особую важность имеет

их способность регулировать барьерные функции эпителия, фагоцитоз, продукцию супероксид-анионов, миграцию клеток и др. [27]. Неудивительно, в связи с этим, широкая панорама нарушений, наступающих в эукариотической клетке под действием токсинов TcdA/B.

В настоящее время в литературе рассматриваются два механизма участия глюкозилирующих токсинов в патогенезе диффициле-инфекции. Первый механизм связан с ингибированием многочисленных актин-регулирующих функций Rho белков в результате ферментативной инактивации последних. В этой связи следует упомянуть повреждение межклеточных контактов («tight and adherence junctions»), приводящее к повышенной эпителиальной проницаемости и клинически проявляющееся диареей. Более того, снижение адгезивных свойств может приводить к гибели клеток путем апоптоза. Следует учесть, что процессы восстановления клеток и клеточная пролиферация также подавляются действием токсинов, поскольку глюкозилированные Rho белки блокируют клеточный цикл и актин-зависимые этапы цитокинеза [28]. Второй важнейший механизм участия глюкозилирующих токсинов *C. difficile* в патогенезе диффициле-инфекции связан с прямой активацией инфламмосомы глюкозилированными Rho белками, приводящей к повышенному синтезу цитокинов IL-8 и INF- γ и воспалительному поражению слизистой оболочки толстой кишки [29–31].

С ферментативной точки зрения действие TcdA практически не отличается от TcdB. Различия в токсическом действии молекул на моделях культур клеток или экспериментальных животных определяются, по-видимому, особенностями клеточных рецепторов, взаимодействующих с токсическими молекулами. Так, например, введение TcdA в просвет кишечника кролика или хомяка приводило к развитию поражений, напоминающих диффициле-колит – морфологические признаки воспаления и секреция жидкости в просвет кишки [32]. Между тем, действие TcdB не приводило к видимому эффекту в аналогичных условиях. Однако в опытах на культурах клеток TcdB был токсичнее TcdA в 100–1000 раз (Рис. 2). В связи с этим TcdA

иногда называют «энтеротоксин», тогда как TcdB – «цитотоксин» [33]. В то же время, в специальных экспериментах было показано, что TcdB обладал летальным эффектом в опытах на хомяках после введения животным сублетальных доз TcdA [34]. Эти опыты позволили предположить синергическое действие обоих токсинов. Причем, на этот период исследований, основным фактором вирулентности признавался TcdA, который, вероятно, нарушал целостность кишечного эпителия, способствуя последующему эффекту TcdB [35]. В подтверждении гипотезе о принципиальной важности TcdA в патогенезе инфекции послужили опыты, продемонстрировавшие пассивный и активный протективный эффекты после иммунизации хомяков с использованием токсина TcdA или введения животным специфических антител к нему [36]. Более того, данные эпидемиологического анализа указывали на то, что титр антител к TcdA обратно пропорционально коррелировал с тяжестью заболевания у людей [37]. Однако многочисленные случаи выделения из клинического материала штаммов *C. difficile* с токсинотипом TcdA-/TcdB+ (то есть не продуцировавших TcdA, но продуцировавших TcdB) [38] привлекли внимание исследователей и привели к пересмотру парадигмы об основной роли TcdA.

Принципиально значимые результаты были получены в последние годы с использованием изогенных штаммов *C. difficile*, содержащих инактивированные гены, кодирующие TcdA или TcdB [39, 40]. В обоих исследованиях было показано, что как штамм дикого типа (продуцирующий оба токсина), так и штамм, продуцирующий только TcdB, вызывали заболевание у экспериментальных животных. Тем самым подтверждалась основная роль TcdB. Однако изогенный мутант, синтезирующий только TcdA, тоже сохранял способность вызывать экспериментальный колит, хотя и проявляя менее выраженный летальный эффект. Таким образом, основываясь на современных данных, можно утверждать, что оба токсина, как TcdA, так и TcdB, являются важными факторами вирулентности *C. difficile*, однако TcdB, по-видимому, связан с более тяжелым течением диффициле-инфекции.

АДФ-рибозилирующий токсин *C. difficile*

Другим токсином, вырабатываемым штаммами *C. difficile*, является токсин CDT (*C. difficile* токсин) [41, 42]. По разным данным 5–30% клинических штаммов микроорганизма вырабатывают данный белок [43], причем наличие токсина часто указывало на высокую вирулентность штамма-продуцента [44]. Особенность данного вещества заключается в том, что он продуцируется не в виде одной белковой цепи, как TcdA или TcdB, а в виде двух индивидуальных полипептидов – компонентов А (CDT-A) и В (CDT-B) и относится, таким образом, к группе бинарных токсинов (Рис. 3) [45].

CDT-B имеет молекулярную массу около 100 кД и обладает способностью взаимодействовать с рецептором на поверхности эукариотических клеток – липолиз-стимулируемым липопротеиновым

рецептором (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, LSR) [46], – и опосредовать проникновение CDT-A в цитоплазму клетки-мишени путем рецептор-зависимого эндоцитоза. В свою очередь, CDT-A является ферментом, имеющим молекулярную массу около 50 кД. По своей химической активности данный фрагмент является АДФ-рибозилтрансферазой, то есть способен расщеплять молекулы внутриклеточного НАД на никотинамид и аденозин дифосфорибозу (АДФ-рибозу) и переносить радикал АДФ-рибозы на специфический субстрат в эукариотической клетке. В качестве подобного субстрата для CDT-A выступают молекулы актина. Причем, в результате АДФ-рибозилирования аргинина-177 молекул мономерного актина, наступает полная деградация актинового скелета эукариотических клеток, завер-

шающаяся их гибелью [47]. Принимая во внимание исключительную важность адекватного состояния актинового цитоскелета для поддержания нормального уровня подвижности фагоцитов, продукция CDT *C. difficile*, приводящая к деградации актиновых волокон эукариотических клеток, может иметь явную антифагоцитарную направленность.

Другой механизм участия CDT в патогенезе диффициле-инфекции связан с его прямым воздействием на процессы иммунного ответа эукариотических клеток. Как было установлено, действие CDT приводит к стимуляции воспалительной реакции по пути, опосредованном Toll-like receptor 2 и наступающей из-за снижения эозинофил-опосредованного контроля за процессами воспаления [48]. Новые исследования в данном направлении должны показать, насколько

патофизиологически-важным является данный аспект активности токсина.

Однако экспериментальные данные, полученные в последние годы, указывают на то, что уничтожение эукариотических клеток и активация воспалительных процессов может не являться основным патофизиологическим эффектом CDT. Было установлено, в частности, что обработка эукариотических клеток токсином в низких концентрациях приводила к образованию на поверхности клеток-мишеней длинных микротубулярных образований [49]. Подобные структуры-протрузии образовывали фибриллярную сеть, осуществляющую фиксацию бактерий в околоклеточном пространстве (Рис. 4) [50]. Таким образом, CDT может рассматриваться в качестве фактора адгезии бактерий принципиально нового типа.

Использование токсинов *C. difficile* в клинической, лабораторной и научно-экспериментальной практике

Ввиду того, что инфекция, вызываемая *C. difficile*, является заболеванием, в патогенезе различных форм которого важнейшую роль играют продуцируемые микроорганизмом белковые токсины, значительные усилия исследователей были направлены на разработку иммунопрофилактических и иммунотерапевтических препаратов для специфической нейтрализации их активности. Так, например, в качестве средств для иммунопрофилактики диффициле-инфекции в настоящее время разработаны и подвергаются клиническим исследованиям на 2х-3х фазах испытаний следующие препараты: (а) вакцинная смесь инаktivированных формалином TcdA и TcdB, разработанная Sanofi Pasteur (Франция); (б) генетически-модифицированные и инаktivированные формалином токсиды, сконструированные Pfizer (США) и (в) рекомбинантный белок, содержащий антигенные детерминанты COOH-концевых участков TcdA и TcdB, продвигаемые на клинический рынок компанией Valneva (Австрия).

Наряду с белковыми вакцинами большой интерес могут представлять и ДНК-вакцины. Имеются убедительные экспериментальные данные, говорящие о том, что введение нуклеиновых последовательностей, кодирующих COOH-концевые участки гликозилирующих токсинов, вызывает иммунный ответ и обладает протективным эффектом в отношении диффициле-инфекции на модели мышей и хомяков [51–54].

Помимо иммунопрофилактики хорошей перспективой обладают подходы по созданию средств на основе токсинов для иммунотерапии диффициле-колитов. В качестве подобных препаратов рассматриваются, в первую очередь, специфические антитела. Препарат, содержащий моноклональные антитела к TcdB недавно появился на рынке под торговым названием Bezlotoxumab (Zinplava). Имеются данные об успешных испытаниях препарата против TcdA под название Astoxumab. Наряду с этими фармацевтическими продуктами получены и интенсивно исследуются и иные гуманизированные моноклональные антитела, а также однодоменные антитела, демонстрирующие высокий терапевтический эффект в опытах на экспериментальных животных [55–57].

Другим подходом для терапии диффициле-инфекции может являться использование низкомолекулярных соединений или природных ингибиторов, блокирующих ферментативную активность гликозилирующих токсинов или их провоспалительную активность на уровне тканей толстой кишки [58–62].

Как указывалось ранее, патогенез диффициле-инфекции напрямую связан с нарушением микрофлоры толстой кишки. Поэтому использование биологических препаратов, нормализующих состав кишечного микробного сообщества, весьма перспективно для терапии заболевания [63, 64]. В этой связи, новым направлением для разработки терапевтических препаратов против диффициле-инфекции может являться конструирование рекомбинантных пробиотических штаммов *Bacillus subtilis* и *Lactobacillus reuteri*, вырабатывающих протективные антигены гликозилирующих токсинов или специфические антитоксические антитела [65–68]. Наряду с *C. difficile*, в подобных штаммах можно использовать генетические конструкции, кодирующие токсины и других патогенов кишечника человека [69]. Таким образом может быть создан некий универсальный препарат для терапии колитов различной этиологии.

Следующим большим ареалом использования знаний о токсинах *C. difficile*, помимо разработки лечебно-профилактических препаратов, является создание диагностических систем для идентификации и типирования данных микроорганизмов. Определение типа продуцируемого токсина (патогенные штаммы токсинотипов TcdA⁺/TcdB⁺, TcdA⁻/TcdB⁺ или TcdA⁺/TcdB⁻ против непатогенных TcdA⁻/TcdB⁻) в образцах кала с помощью культур клеток или иммуносерологических методов является стандартной процедурой для диагностики заболевания в настоящее время [70]. Разработка новых, более чувствительных и менее трудоемких технологий выявления токсинов, а также детекции соответствующих кодирующих нуклеотидных последовательностей может являться существенным подспорьем в правильной диагностике диффициле-инфекции [71–74].

К статье

Роль токсинов в патогенности *Clostridium difficile* (стр. 4–10)

To article

Role of toxins in *Clostridium difficile* pathogenicity (p. 4–10)

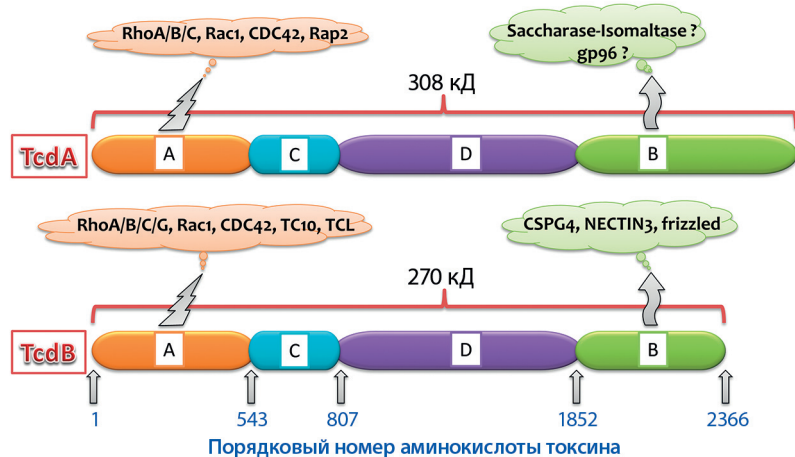


Рисунок 1.

Схема строения гликозилирующих токсинов *C. difficile*. Токсины TcdA (308 кД) и TcdB (270 кД) состоят из доменов A, B, C, и D, выполняющих специализированные функции в процессе интоксикации. В частности, домен A является ферментом, осуществляющим моногликозилирование низкомолекулярных ГТФаз, тогда как домен B необходим для взаимодействия со специфическими рецепторами на поверхности эукариотических клеток.

Figure 1.

Domain organization of *C. difficile* glucosylating toxins. Toxins TcdA (308 kD) and TcdB (270 kD) consist of domains A, B, C, and D, playing specific roles during target cell intoxication. In particular, Domain A is an enzyme, mono-glucosylating small GTPases, whereas domain B is necessary for interaction of the toxin with specific receptors on the surface of a target cell.

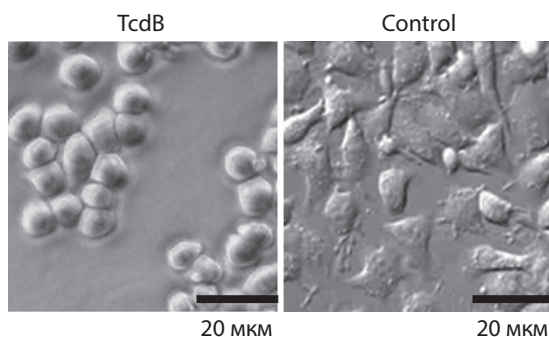


Рисунок 2.

Цитотоксический эффект после обработки эпителиальных клеток HeLa токсином TcdB (100 нг/мл) в течение 1 часа.

Figure 2.

Cytotoxic effect after treatment of HeLa cells with toxin TcdB (100 ng/ml) for 1 h.

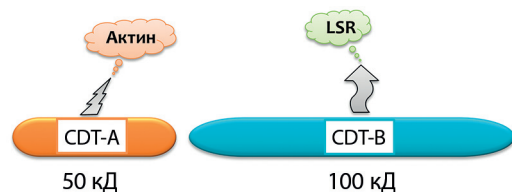


Рисунок 3.

Схема строения бинарного токсина CDT. CDT *C. difficile* образован из индивидуальных доменов A (50 кД) и B (100 кД). Домен A является АДФ-рибозилтрансферазой, осуществляющей ковалентную модификацию мономерного актина, тогда как домен B необходим для взаимодействия токсина с рецептором LSR на поверхности эукариотических клеток.

Figure 3.

Domain organization of binary toxin CDT. CDT of *C. difficile* consists of individual domain A (50 kD) and B (100 kD). Domain A is an ADP-ribosyltransferase, covalently modifying G-actin, whereas Domain B is necessary for interaction with receptor LSR on the surface of a target cell.

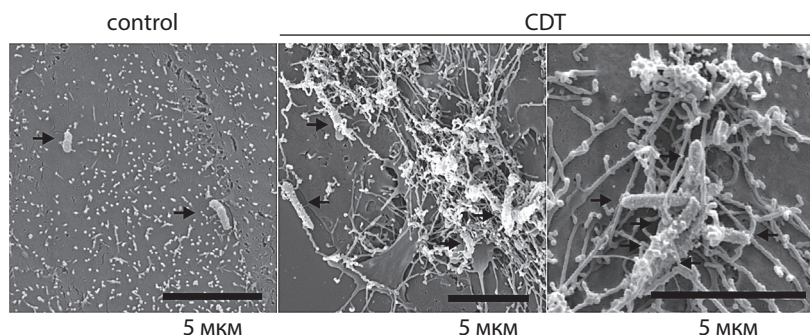


Рисунок 4.

Обработка клеток кишечника CaCo2 токсином CDT в суб-цитотоксических концентрациях приводит к образованию микротубулярных протрузий, задерживающих бактериальные клетки *C. difficile* (отмечены стрелками). Рисунок взят из [83].

Figure 4.

Treatment of a colon cell line CaCo2 with toxin CDT at sub-cytotoxic concentrations results in development of microtubular protrusions, holding up bacterial cells *C. difficile* (indicated by arrows). The picture was adapted from [83].

Кроме диагностики, весьма эффективно использование знаний о глюкозилирующих токсинах для типирования выделенных штаммов *C. difficile*. Данная процедура называется токсинотипированием и использует принципы PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) [75]. В настоящее время известно 34 токсинотипа *C. difficile*, определяемых в полимеразной цепной реакции с использованием стандартных ПЦР-праймеров. Принадлежность того или иного штамма к определенному токсинотипу может существенно облегчить эпидемиологический анализ случаев диффициле-инфекции в клинической практике.

Помимо возможности прикладного использования знаний о токсинах, высокую значимость имеют фундаментальные научные данные,

получаемые с использованием токсических молекул, в молекулярной биологии, молекулярной онкологии, клеточной биологии и других областях биологии и медицины. В частности, токсины *C. difficile* широко используются в исследованиях, посвященных изучению процессов онкотрансформации и метастазирования раковых клеток [76, 77]. Важная область использования знаний о токсических молекулах – это разработка способов внутриклеточной доставки биологически-активных веществ [43, 45, 78]. Последнее направление может привести к разработке новых лекарственных средств, направленных на терапевтическую модуляцию разнообразных внутриклеточных процессов, в том числе, развитие злокачественных опухолей человека.

Заключение

Инфекция, вызываемая *C. difficile*, является серьезной научной проблемой современного здравоохранения. Основную роль в патогенезе данного заболевания играют токсины возбудителя – TcdA, TcdB и CDT. Благодаря этому факту профилактические и терапевтические средства, сконструированные на основе токсинов или направленные на их инактивацию, имеют большой клинический и коммерческий потенциал. Наряду с этим не следует недооценивать важность исследования и других факторов патогенности *C. difficile*, таких как адгезины, ферменты, компоненты клеточной стенки и др. [79–82], по-видимому, также играющих важную роль в патогенезе заболевания. К другим научным проблемам, хотя и имеющим пока преимуществен-

но фундаментальное значение, но обладающих в перспективе большой клинической значимостью в связи с диффициле-инфекции, следует отнести изучение общего метаболизма, процессов споруляции, генетической регуляции синтеза токсинов, механизмов трансдукции и конъюгации у *C. difficile* и многое другое. Таким образом, патогенный микроорганизм *C. difficile* является ярким примером того, что решение важной проблемы практического здравоохранения, связанной с высокой заболеваемостью и смертностью людей, может быть осуществлено лишь комплексными усилиями специалистов различных отраслей медицинской и биологической науки и немыслимо без использования знаний фундаментального характера.

Литература | References

- George RH, Symonds JM, Dimock F, Brown JD, Arabi Y et al. Identification of *Clostridium difficile* as a cause of pseudomembranous colitis. *British medical journal* 1978;1(6114):695.
- Шептулин АА. Рефрактерные и рецидивирующие формы колита, ассоциированного с *Clostridium difficile*. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 2011;21(2):50–53.
Sheptulin A. A. Refractory and relapsing forms of *Clostridium difficile*-associated colitis. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2011;21(2):50–53.
- Ярушина ЯН, Колотова ГБ, Руднов ВА, Багин ВА. *Clostridium difficile*-ассоциированная болезнь у пациентов многопрофильного стационара и факторы риска ее развития. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии 2017;27(5):20–28.
Yarushina Y. N., Kolotova G. B., Rudnov V. A., Bagin V. A. *Clostridium difficile*-associated disease in versatile hospital patient population and risk factors for its development. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2017;27(5):20–28. (In Russ.) <https://doi.org/10.22416/1382-4376-2017-27-5-20-28>
- Lessa FC, Winston LG, McDonald LC. Burden of *Clostridium difficile* infection in the United States. *N Engl J Med* 2015;372(24):2369–2370.
- Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual review of microbiology* 2011;65:501–521.
- Abt MC, McKenney PT, Pamer EG. *Clostridium difficile* colitis: pathogenesis and host defence. *Nat Rev Microbiol* 2016;14(10):609–620.
- Kuiper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2006;12 Suppl 6:2–18.
- Ananthakrishnan AN. *Clostridium difficile* infection: epidemiology, risk factors and management. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology* 2011;8:17–26.
- Захаренко СМ. Эпидемиологические аспекты *Clostridium-difficile* инфекции. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017(3):67–70.
Zakharenko S. M. Epidemiological aspects of *C. Difficile* infection. *Experimental and Clinical Gastroenterology Journal*. 2017;139(03):67–70.
- Belyi Y, Aktories K. Bacterial toxin and effector glycosyltransferases. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800(2):134–143.
- Jank T, Aktories K. Structure and mode of action of clostridial glucosylating toxins: the ABCD model. *Trends Microbiol* 2008;16(5):222–229.
- Egerer M, Giesemann T, Jank T, Satchell KJ, Aktories K. Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity. *J Biol Chem* 2007;282(35):25314–25321.
- Genisyurek S, Papatheodorou P, Guttenberg G, Schubert R, Benz R et al. Structural determinants for membrane insertion,

- pore formation and translocation of *Clostridium difficile* toxin B. *Mol Microbiol* 2011;79(6):1643–1654.
14. Olling A, Goy S, Hoffmann F, Tatge H, Just I et al. The repetitive oligopeptide sequences modulate cytopathic potency but are not crucial for cellular uptake of *Clostridium difficile* toxin A. *PLoS One* 2011;6(3): e17623.
 15. von Eichel-Streiber C, Sauerborn M, Kuramitsu HK. Evidence for a modular structure of the homologous repetitive C-terminal carbohydrate-binding sites of *Clostridium difficile* toxins and *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *J Bacteriol* 1992;174(20):6707–6710.
 16. Pothoulakis C, Gilbert RJ, Cladaras C, Castagliuolo I, Semenza G et al. Rabbit sucrase-isomaltase contains a functional intestinal receptor for *Clostridium difficile* toxin A. *The Journal of clinical investigation* 1996;98(3):641–649.
 17. Na X, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C, LaMont JT. gp96 is a human colonocyte plasma membrane binding protein for *Clostridium difficile* toxin A. *Infect Immun* 2008;76(7):2862–2871.
 18. Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* Toxin Biology. *Annual review of microbiology* 2017;71:281–307.
 19. Yuan P, Zhang H, Cai C, Zhu S, Zhou Y et al. Chondroitin sulfate proteoglycan 4 functions as the cellular receptor for *Clostridium difficile* toxin B. *Cell research* 2015;25(2):157–168.
 20. LaFrance ME, Farrow MA, Chandrasekaran R, Sheng J, Rubin DH et al. Identification of an epithelial cell receptor responsible for *Clostridium difficile* TcdB-induced cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112(22):7073–7078.
 21. Tao L, Zhang J, Meraner P, Tovaglieri A, Wu X et al. Frizzled proteins are colonic epithelial receptors for *C. difficile* toxin B. *Nature* 2016;538(7625):350–355.
 22. Papatheodorou P, Zamboglou C, Genisyuerk S, Guttenberg G, Aktories K. Clostridial glucosylating toxins enter cells via clathrin-mediated endocytosis. *PLoS One* 2010;5(5): e10673.
 23. Barth H, Pfeifer G, Hofmann F, Maier E, Benz R et al. Low pH-induced formation of ion channels by *Clostridium difficile* toxin B in target cells. *J Biol Chem* 2001;276(14):10670–10676.
 24. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005;18(2):247–263.
 25. Just I, Gerhard R. Large clostridial cytotoxins. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* 2004;152:23–47.
 26. Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279(5350):509–514.
 27. Lemichez E, Aktories K. Hijacking of Rho GTPases during bacterial infection. *Experimental cell research* 2013;319(15):2329–2336.
 28. Jank T, Belyi Y, Aktories K. Bacterial glycosyltransferase toxins. *Cell Microbiol* 2015;17(12):1752–1765.
 29. Ng J, Hirota SA, Gross O, Li Y, Ulke-Lemee A et al. *Clostridium difficile* toxin-induced inflammation and intestinal injury are mediated by the inflammasome. *Gastroenterology* 2010;139(2):542–552. e541–543.
 30. Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature* 2014;513(7517):237–241.
 31. Jafari NV, Kuehne SA, Bryant CE, Elawad M, Wren BW et al. *Clostridium difficile* modulates host innate immunity via toxin-independent and dependent mechanism(s). *PLoS One* 2013;8(7): e69846.
 32. Lysterly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD. Biological activities of toxins A and B of *Clostridium difficile*. *Infect Immun* 1982;35(3):1147–1150.
 33. Lysterly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile*: its disease and toxins. *Clin Microbiol Rev* 1988;1(1):1–18.
 34. Lysterly DM, Saum KE, MacDonald DK, Wilkins TD. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals. *Infect Immun* 1985;47(2):349–352.
 35. Chandrasekaran R, Lacy DB. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41(6):723–750.
 36. Kim PH, Iaconis JP, Rolfe RD. Immunization of adult hamsters against *Clostridium difficile*-associated ileocolitis and transfer of protection to infant hamsters. *Infect Immun* 1987;55(12):2984–2992.
 37. Kyne L, Warny M, Qamar A, Kelly CP. Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea. *Lancet* 2001;357(9251):189–193.
 38. King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations. *Future Microbiol* 2015;10(1):1–4.
 39. Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, Sambol SP, Carter GP et al. Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 2009;458(7242):1176–1179.
 40. Kuehne SA, Cartman ST, Heap JT, Kelly ML, Cockayne A et al. The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature* 2010;467(7316):711–713.
 41. Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG. Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68(3):373–402.
 42. Aktories K, Papatheodorou P, Schwan C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT) – A virulence factor disturbing the cytoskeleton. *Anaerobe* 2018.
 43. Gerding DN, Johnson S, Rupnik M, Aktories K. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 2014;5(1):15–27.
 44. Kuehne SA, Collery MM, Kelly ML, Cartman ST, Cockayne A et al. Importance of toxin A, toxin B, and CDT in virulence of an epidemic *Clostridium difficile* strain. *J Infect Dis* 2014;209(1):83–86.
 45. Papatheodorou P, Aktories K. Receptor-binding and uptake of binary actin-ADP-ribosylating toxins. *Current topics in microbiology and immunology* 2017;406:119–133.
 46. Papatheodorou P, Carette JE, Bell GW, Schwan C, Guttenberg G et al. Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor (LSR) is the host receptor for the binary toxin *Clostridium difficile* transferase (CDT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(39):16422–16427.
 47. Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, Brazier J, Duerden B et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186(2):307–312.
 48. Cowardin CA, Buonomo EL, Saleh MM, Wilson MG, Burgess SL et al. The binary toxin CDT enhances *Clostridium difficile* virulence by suppressing protective colonic eosinophilia. *Nature microbiology* 2016;1(8):16108.
 49. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog* 2009;5(10): e1000626.
 50. Schwan C, Kruppke AS, Nolke T, Schumacher L, Koch-Nolte F et al. *Clostridium difficile* toxin CDT hijacks microtubule organization and reroutes vesicle traffic to increase pathogen adherence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(6):2313–2318.
 51. Zhang BZ, Cai J, Yu B, Hua Y, Lau CC et al. A DNA vaccine targeting TcdA and TcdB induces protective immunity against *Clostridium difficile*. *BMC infectious diseases* 2016;16(1):596.

52. Baliban SM, Michael A, Shammassian B, Mudakha S, Khan AS et al. An optimized, synthetic DNA vaccine encoding the toxin A and toxin B receptor binding domains of *Clostridium difficile* induces protective antibody responses in vivo. *Infect Immun* 2014;82(10):4080–4091.
53. Gardiner DF, Rosenberg T, Zaharatos J, Franco D, Ho DD. A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A. *Vaccine* 2009;27(27): 3598–3604.
54. Quemener L, Petiot N, Arnaud-Barbe N, Hessler C, Freda Pietrobbon PJ et al. *Clostridium difficile* toxoid vaccine candidate confers broad protection against a range of prevalent circulating strains in a non-clinical setting. *Infect Immun* 2018.
55. Hussack G, Tanha J. An update on antibody-based immunotherapies for *Clostridium difficile* infection. *Clinical and experimental gastroenterology* 2016;9:209–224.
56. Feher C, Soriano A, Mensa J. A review of experimental and off-Label therapies for *Clostridium difficile* Infection. *Infectious diseases and therapy* 2017;6(1):1–35.
57. Kroh HK, Chandrasekaran R, Zhang Z, Rosenthal K, Woods R et al. A neutralizing antibody that blocks delivery of the enzymatic cargo of *Clostridium difficile* toxin TcdB into host cells. *J Biol Chem* 2017.
58. Bender KO, Garland M, Ferreyra JA, Hryckowian AJ, Child MA et al. A small-molecule antivirulence agent for treating *Clostridium difficile* infection. *Science translational medicine* 2015;7(306):306ra148.
59. Tam J, Beilhartz GL, Auger A, Gupta P, Therien AG et al. Small molecule inhibitors of *Clostridium difficile* toxin B-induced cellular damage. *Chem Biol* 2015;22(2):175–185.
60. Giesemann T, Guttenberg G, Aktories K. Human alpha-defensins inhibit *Clostridium difficile* toxin B. *Gastroenterology* 2008;134:2049–2058.
61. Letourneau JJ, Stroke IL, Hilbert DW, Sturzenbecker LJ, Marinelli BA et al. Identification and initial optimization of inhibitors of *Clostridium difficile* (*C. difficile*) toxin B (TcdB). *Bioorg Med Chem Lett* 2018;28(4):756–761.
62. Stroke IL, Letourneau JJ, Miller TE, Xu Y, Pechik I et al. Treatment of *Clostridium difficile* Infection with a Small-Molecule Inhibitor of Toxin UDP-Glucose Hydrolysis Activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(5).
63. Mills JP, Rao K, Young VB. Probiotics for prevention of *Clostridium difficile* infection. *Curr Opin Gastroenterol* 2018;34(1):3–10.
64. Сухина МА, Михалеvская ВИ, Ачкасов СИ, Сафин АЛ. Антагонизм лактобактерий против токсигенной *Clostridium difficile*. Колопроктология 2017(S3):82a–83. Sukhina M.A., Mikhalevskaya V.I., Achkasov S.I., Safin A.L. Antagonism of Lactobacteria against Toxigenic *Clostridium difficile*. Coloproctology. 2017, no. S3, pp. 82–83.
65. Martin MC, Pant N, Ladero V, Gunaydin G, Andersen KK et al. Integrative expression system for delivery of antibody fragments by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(6):2174–2179.
66. Andersen KK, Strokappe NM, Hultberg A, Truusalu K, Smidt I et al. Neutralization of *Clostridium difficile* toxin B mediated by engineered lactobacilli producing single domain antibodies. *Infect Immun* 2015.
67. Peterbauer C, Maischberger T, Haltrich D. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnology journal* 2011;6(9):1147–1161.
68. Song BF, Ju LZ, Li YJ, Tang LJ. Chromosomal insertions in the *Lactobacillus casei* upp gene that are useful for vaccine expression. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(11):3321–3326.
69. Belyi IF, Varfolomeeva NA. Construction of a fusion protein carrying antigenic determinants of enteric clostridial toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2003;225(2):325–329.
70. Chen S, Gu H, Sun C, Wang H, Wang J. Rapid detection of *Clostridium difficile* toxins and laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infections. *Infection* 2017;45(3):255–262.
71. Lai H, Huang C, Cai J, Ye J, She J et al. Simultaneous detection and characterization of toxigenic *Clostridium difficile* directly from clinical stool specimens. *Frontiers of medicine* 2017.
72. Сухина МА, Сафин АЛ. Современное состояние лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированных диарей; методы детекции токсигенных штаммов *Clostridium difficile* (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2017;62(10):635–640. Sukhina M. A., Safin A. L. The actual condition of laboratory diagnostic of clostridium difficile-associated diarrhea; the methods of detection of toxigenic strains (review of publications). Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2017;62(10):635–640.
73. Гулазян НМ, Белая ОФ, Белый ЮФ, Пак СГ. Выявление маркеров токсинов клостридий при различных вариантах течения острой кишечной инфекции. Клиническая лабораторная диагностика 2008(3):46–49. Gulazyan NM, Belaya OF, Belyi YuF, Pak SG. Identification of markers of clostridial toxins in different variants of the course of acute intestinal infection. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2008(3):46–49.
74. Варфоломеева НА, Шмарова ЛА, Белый ЮФ. Генно-инженерный подход к получению фрагментов токсина А и В для диагностики и иммунопрофилактики инфекции *Clostridium difficile*. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология 2003(2):13–16. Varfolomeeva N. A., Shmarova L. A., Belyi Yu. F. A gene-engineering approach towards the production of fragments of toxins a and b for the usage in the diagnostics and immunotherapy of clostridium difficile infections. Mol. Genet. Microbiol. Virol. 2003(2):13–16.
75. Rupnik M, Janezic S. An Update on *Clostridium difficile* Toxinotyping. *J Clin Microbiol* 2016;54(1):13–18.
76. Ostevold K, Melendez AV, Lehmann F, Schmidt G, Aktories K et al. Septin remodeling is essential for the formation of cell membrane protrusions (microtentacles) in detached tumor cells. *Oncotarget* 2017;8(44):76686–76698.
77. Czulkies BA, Mastroianni J, Lutz L, Lang S, Schwan C et al. Loss of LSR affects epithelial barrier integrity and tumor xenograft growth of CaCo-2 cells. *Oncotarget* 2017;8(23):37009–37022.
78. Kern SM, Feig AL. Adaptation of *Clostridium difficile* toxin A for use as a protein translocation system. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(4):570–574.
79. Chu M, Mallozzi MJ, Roxas BP, Bertolo L, Monteiro MA et al. A *Clostridium difficile* cell wall glycopolymer locus influences bacterial shape, polysaccharide production and virulence. *PLoS Pathog* 2016;12(10): e1005946.
80. Pechine S, Deneve-Larrazet C, Collignon A. *Clostridium difficile* adhesins. *Methods in molecular biology* 2016; 1476:91–101.
81. Dedic E, Alsarraf H, Welner DH, Ostergaard O, Klychnikov OI et al. A novel Fic (Filamentation Induced by cAMP) protein from *Clostridium difficile* reveals an Inhibitory motif-independent adenylylation/AMPylation mechanism. *J Biol Chem* 2016;291(25):13286–13300.
82. McKee RW, Aleksanyan N, Garrett EM, Tamayo R. Type IV pili promote *Clostridium difficile* adherence and persistence in a mouse model of infection. *Infect Immun* 2018.
83. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, van Ham M, Rohde M et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS pathogens* 2009;5: e1000626.