

Received: 2009.06.08
Accepted: 2009.08.31
Published: 2009.10.19

Efektywność bakteriobójczego działania surowicy wynikająca z obecności układu dopełniacza i lizozymu wobec bakterii, które unikają odpowiedzi immunologicznej organizmu

The efficiency of the bactericidal action of serum raised
by complement and lysozyme against bacteria which
avoid the immunological response of higher organisms

Bożena Futoma-Kołoch, Gabriela Bugla-Płoskońska

Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie

W pracy omówiono procesy składające się na bakteriobójcze działanie surowicy, wynikające głównie z działania układu dopełniacza (komplement – C) i lizozymu (muramidaza – LZ). Układem C określa się zespół białek surowicy i płynów tkankowych, aktywowanych w określonej kolejności w sposób łańcuchowy. Komplement we współdziałaniu z lizozymem stanowi główną linię obrony przed wnikającymi do organizmu mikroorganizmami. Drobnoustroje patogenne nabyły umiejętności unikania mechanizmów odporności wrodzonej m.in. przez uczestniczenie w zjawisku mimikry molekularnej, wiązanie czynników regulatorowych kontrolujących aktywację dopełniacza lub wydzielanie enzymów proteolitycznych. Skuteczność cytolitycznego działania białek C i LZ zależy również od budowy struktur powierzchniowych mikroorganizmów. Zaburzenie równowagi między aktywacją a hamowaniem reakcji zapalnych w obecności patogenów może prowadzić do różnych stanów patologicznych, takich jak np. choroby autoimmunologiczne.

Słowa kluczowe:

układ dopełniacza • lizozym • oporność bakterii na cytolityczne działanie surowicy

Summary

This paper presents some processes of the antibacterial effect of serum, which mainly results from the activities of complement (C) and lysozyme (muramidase, LZ). The C system consists of a group of serum proteins and tissue fluids which are activated in a particular order. Complement, operating together with lysozyme, constitutes the main protection from microorganisms entering the body. Pathogenic microorganisms are able to avoid natural protective mechanisms by, among others, molecular mimicry, binding complement control proteins, or secreting proteolytic enzymes. The effectiveness of the cytolytic action of C proteins and LZ also depends on the surface structures of the microorganisms. Imbalance between the activation and deactivation of inflammatory reactions in the presence of pathogens can lead to various pathological states, such as autoimmune diseases.

Key words:

complement system • lysozyme • resistance of bacteria to cytolytic activity of serum

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=896665>**Word count:** 6319**Tables:** –**Figures:** 3**References:** 116**Adres autorki:** dr Bożena Futoma-Kołoch, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, ul. S. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: bozena@microb.uni.wroc.pl

Wykaz skrótów: **AP** – droga alternatywna; **C** – komplement (dopełniacz); **CMP-NeuAc** – cytydynomonofosforan kwasu *N*-acetyloneuraminowego; **C3bBb** – konwertaza C3 drogi alternatywnej; **C3bBb3b** – konwertaza C5 drogi alternatywnej; **C4b2a** – konwertaza C3 drogi klasycznej; **C4b2a3b** – konwertaza C5 drogi klasycznej; **C8bp** – białko wiążące składową C8; **CD59** – protektyna; **CDCC** – cytotosyczość komórkowa zależna od dopełniacza; **CP** – droga klasyczna; **CR** – receptory składowych dopełniacza; **CR1** – kofaktor czynnika I, receptor białek dopełniacza; **CRD** – domena lektynowa; **DAF** – czynnik przyspieszający rozkład; **EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy; **fd** – czynnik D; **fh** – czynnik H; **fi** – czynnik I; **GlcNAc** – *N*-acetylglukozamina; **HAE** – napadowy obrzęk naczyń ruchomy; **HRF** – czynnik restrikcji homologicznej; **LOS** – lipooligosacharyd; **LP** – droga lektynowa; **LPS** – lipopolisacharyd; **LZ** – lizozym, muramidaza; **MAC** – kompleks atakujący błonę; **MBL/MBP** – lektyna wiążąca mannozę; **MCP** – błonowy kofaktor białkowy; **MMT** – bentonit, montmorylonit; **MurNAc** – kwas *N*-acetylmuraminowy; **NK** – komórka NK, naturalna komórka cytotosyczna N; **OM** – błona zewnętrzna; **OMP** – białka błony zewnętrznej; **P** – properdyna; **PG** – peptydoglikan; **RCA** – białka regulujące aktywację komplementu; **SAXS** – małokątowa dyfraktometria rentgenowska, dyfraktometria niskokątowa; **SIC** – paciorkowcowy inhibitor komplementu; **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworu; **WAXS** – szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska, szerokokątowe rozpraszanie rentgenowskie.

1. WPROWADZENIE

Wrodzone mechanizmy immunologiczne, stanowiące pierwszą linię obrony gospodarza mogą niszczyć wiele grup patogenów już w pierwszym etapie ich kontaktu z organizmem wyższym. Wiele antygenów bakteryjnych zostaje rozpoznanych przez układ immunologiczny organizmu wyższego w sposób niewymagający receptorów antygenowo swoistych na limfocytach B czy T. Istotnym elementem odporności przeciwbakteryjnej jest bakteriobójcza aktywność surowicy, charakteryzująca się szybką kinetyką reakcji immunologicznych. Mechanizmy obronne w surowicy bez udziału limfocytów B lub T swoistych antygenowo dotyczą aktywacji neutrofilów, makrofagów, komórek NK (naturalne komórki cytotosyczne), degranulacji komórek tucznych. Mechanizmy te prowadzą do wzrostu przepływu krwi w miejscowej sieci naczyń krwionośnych, a następnie aktywowany zostaje układ krzepnięcia i tworzenie włókniaka. Neutrofile syntetyzując peptydy o działaniu przeciwbakteryjnym, tj. m.in. ketapsynę G, azurocydynę oraz defenzyny zapewniają stały poziom odporności gospodarza na zakażenia mikrobiologiczne [27,31].

Istotną rolę w mechanizmie bakteriobójczego działania surowicy odgrywa grupa białek krwi zwana dopełniaczem (komplement – C). System dopełniacza jest wysoce efektywny w natychmiastowym rozpoznawaniu i niszczeniu wnikających do makroorganizmu drobnoustrojów. Układ dopełniacza jest jednym z przykładów współdziałania swoistych i nieswoistych mechanizmów odpornościowych. Komplement obejmuje grupę prawie 35 białek

(wraz z czynnikami regulującymi) surowicy i płynów tkankowych. W kaskadzie aktywacji komplementu są one przekształcane w proteiny, dla których substratem są kolejne białka tego układu. Aktywacja układu C może następować trzema odrębnymi szlakami reakcji: drogą alternatywną (alternative pathway – AP), klasyczną (classical pathway – CP) i drogą lektynową (lectin pathway – LP), które wspólnie, na końcowych etapach aktywacji działają destrukcyjnie – głównie na funkcjonowanie błon komórkowych [67,113]. W literaturze pojawiło się także doniesienie wskazujące, iż trombina i plazmina mogą wpływać stymulująco na białko C3 komplementu, co powoduje jego wzmorzoną aktywację. To odkrycie wskazywałoby, iż być może istnieje czwarta ścieżka aktywacji dopełniacza niezależna od wyżej wymienionych [19].

Działanie systemu białek dopełniacza przejawia się poprzez liczne funkcje biologiczne m.in. inicjuje reakcję zapalną w miejscu infekcji, pewne jego składniki pełnią rolę opsonin względem komórek bakteryjnych i wirusów. W pełni zaktywowany komplement, poprzez utworzenie i wbudowanie się kompleksów atakujących (MAC) w ścianę komórkową bakterii przyczynia się do rozpadu ich komórek. Niekontrolowana aktywacja białek układu dopełniacza może doprowadzić do pojawiania się różnych stanów patologicznych w organizmie, takich jak: choroby autoimmunologiczne, alergię i ogólnoustrojowe zapalenie związane z objawami towarzyszącymi sepsie. Komplement może utrudniać przyjęcie i tolerowanie przez organizm przeszczepów ksenogenicznych i alogenicznych [52,62,76,103].



Organizm ludzki dysponuje różnorodnymi mechanizmami regulującymi aktywność dopełniacza. Skutecznie broni się przed niekontrolowaną jego aktywnością poprzez liczne czynniki regulatorowe osoczowe i znajdujące się na powierzchniach komórek. Aby układ C mógł działać efektywnie, komórki organizmu wyposażone są w receptory, dzięki którym możliwa jest kontrola i synchronizacja reakcji immunologicznych. Niedobory niektórych składników komplementu uczestniczących w ścieżce klasycznej (np. C1, C4) są najczęstszą przyczyną chorób autoimmunologicznych, np. tocznia rumieniowatego układowego. Niedobory lektyny MBL (lektyna wiążąca mannozę), składowych C3, C5, C6, C7, C8, C9, czynników fH, fI oraz properdyny (P) predysponują do zwiększonej zapadalności na infekcje bakteryjne. Z kolei brak inhibitora C1-INH ma ścisły związek z objawami towarzyszącymi napadowemu obrzękowi naczynioruchowemu (HAE) [8,17,38].

Lizozym (LZ, muramidaza), będący podobnie jak układ dopełniacza elementem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, występuje w wielu wydzielinach i płynach ciała oraz ekstraktach z tkanek. Lizozym obecny jest we łzach, w ślinie, w mleku wytwarzanym w okresie laktacji, a także w surowicy kręgowców, gdzie współdziała z komponentami układu C oraz z przeciwciałami, chroniąc ustrój przed miejscowym i ogólnym zakażeniem [59,68]. Lizozym, będąc jednym z najważniejszych komponentów nieswoistych mechanizmów obronnych występuje w ziarnach azurofilnych, ziarnach swoistych, ziarnach żelatynowych neutrofilów, a także w ziarnach monocytów i makrofażów [38].

Drobnoustroje stale rozwijają i udoskonalają mechanizmy, dzięki którym zwiększają swoje szanse na przeżycie w makroorganizmie. Zazwyczaj wpływają na przebieg procesów związanych z działaniem układu dopełniacza i wspomagającej roli przeciwciał i lizozymu.

2. MECHANIZMY AKTYWACJI UKŁADU DOPEŁNIACZA

2.1. Droga alternatywna (AP)

W alternatywnej drodze aktywacji dopełniacza uczestniczą czynniki: B, D, H, I, P i składnik C3 (ryc. 1). Aktywacja ścieżki AP nie wymaga udziału przeciwciał. Aktywatorami (stymulatorami) drogi alternatywnej mogą być komórki bakterii Gram-dodatnich, Gram-ujemnych, komórki grzybów, komórki chorobotwórczych *Protista*, niektóre robaki pasożytnicze, komórki nowotworowe, wirusy i zakażone przez nie komórki, a także, co ciekawe, kompleksy immunologiczne zawierające przeciwciała IgG, IgA i IgE. Droga AP ma znaczenie w szybkiej odpowiedzi na pojawiające się patogeny, zanim rozwinię się swoista odpowiedź immunologiczna. Inicjującym enzymem tego szlaku jest konwertaza C3 (C3bBb) drogi alternatywnej. Aktywuje się ona spontanicznie w wolnym tempie w osoczu. Podczas aktywacji AP czynnik B wiąże się w obecności jonów magnezu z pobudzoną postacią białka C3 (C3(H₂O)). Umożliwia to czynnikowi D (factor D – fD), który w surowicy występuje głównie w postaci aktywowanej, rozszczepienie czynnika B na dwa fragmenty Bb i Ba. Skutkiem zachodzących reakcji jest powstanie kompleksu C3(H₂O)Bb, który jest początkową i pozostającą jeszcze w stanie rozpuszczalnym postacią konwertazy C3. Wkrótce powstaje

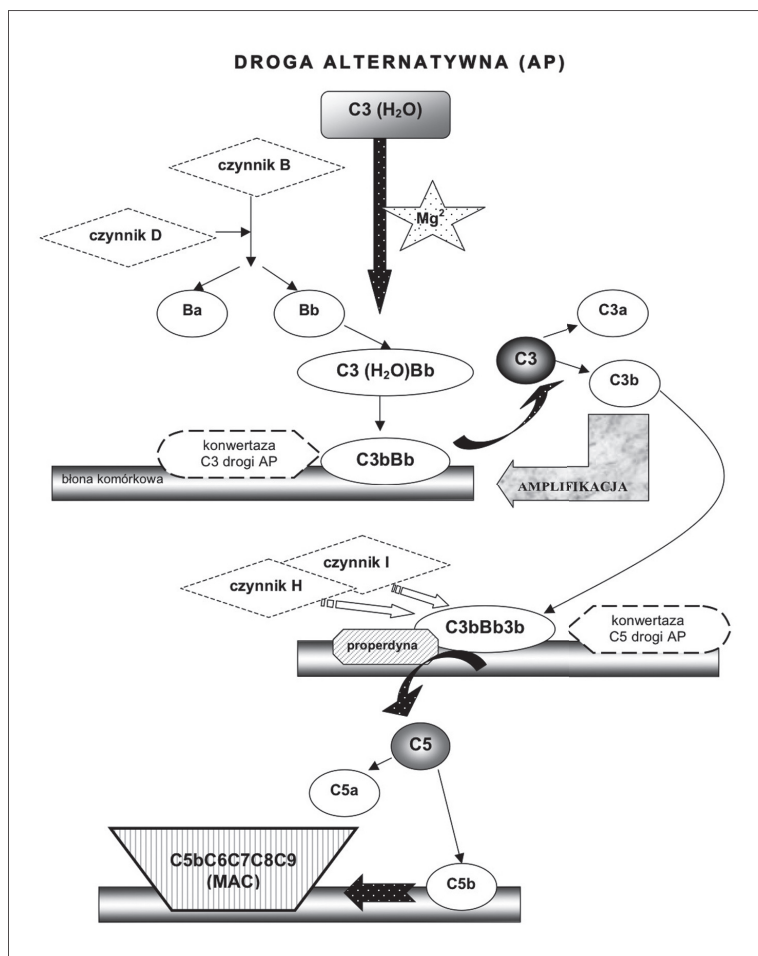
w pełni aktywny kompleks C3bBb, czyli ostateczna i przymocowana już do błony komórkowej konwertaza C3 drogi alternatywnej, która rozkłada czynnik C3 na C3a i C3b. Kompleks C3bBb może przyłączać dodatkowe fragmenty C3b i wtedy staje się konwertazą C5 drogi alternatywnej (C3bBb3b). Zdeponowany na powierzchni błony docelowej enzym stabilizowany jest przez proprietynę P, która chroni konwertazę C5 przed czynnikami regulatorowymi H (factor H – fH) i I (factor I – fI). W obrębie ścieżki alternatywnej zachodzi charakterystyczna reakcja amplifikacji (wzmocnienia), gdyż produkt uwalniany w wyniku działania konwertazy C3 drogi alternatywnej – C3b – jest zarazem podjednostką tej konwertazy [5,62,64,82,94,95]. Działanie ścieżki alternatywnej może skutkować niekorzystnym wpływem na organizm wyższy, kiedy konwertazy tej ścieżki zaczynają autoagresywnie oddziaływać na własne tkanki. Aby temu zapobiec organizm wyższy wytwarza wiele białek regulatorowych określanych nazwą RCA (regulators of complement activation) [83].

Lutz i wsp. [64] uważają, że stosowane powszechnie w literaturze sformułowanie „aktywacja ścieżki alternatywnej” jest nieprawidłowe i mylące. Autorzy sądzą, że AP nie może być aktywowana, jak to jest w przypadku dróg CP (gdzie cząsteczkami uruchamiającymi kaskadę reakcji są pewne klasy przeciwciał i białko C1q) i LP (aktywacja zapoczątkowana przez lektynę MBL). W rzeczywistości ścieżka alternatywna stale, spontanicznie aktywowana jest we krwi, a zatem w obecności obcych antygenów może być jedynie stymulowana, bądź wzmacniana.

2.2. Droga klasyczna (CP)

Aktywację dopełniacza drogą klasyczną (CP) zapoczątkowuje przyłączenie się białka C1q do regionu Fc związanej z antygenem immunoglobuliny (Ig). Przeciwciałami, które zapoczątkowują reakcje aktywacji CP są najczęściej IgM, IgG1, IgG2 lub IgG3 [98] (ryc. 2). Związana z kompleksami immunologicznymi cząsteczka C1q następnie łączy się ze składowymi komplementu C1r i C1s w obecności jonów wapnia. Zmiana konformacyjna w obrębie C1q indukuje zmianę przestrzenną w obrębie białka C1r, które eksponuje miejsce enzymatyczne o właściwościach proteiny serynowej. Aktywny C1r uaktywnia nieczynny fragment C1s, który również nabywa właściwości enzymatycznych. Proteinaza C1s wykazuje powinowactwo do białka C4 i rozszczepia je na dwa fragmenty C4a i C4b. Komponenty C4b łączą się kowalencyjnie z docelową błoną komórkową i wiążą cząsteczkę C2. Związane ze składową C4b białko C2 jest rozkładane przez aktywne białko C1s do postaci C2a i C2b. W wyniku tych reakcji powstaje połączony z błoną komórkową aktywny kompleks C4b2a, który jest konwertazą C3 drogi klasycznej. Konwertaza ta działa proteolitycznie względem białek C3, które rozszczepia na mniejsze białka C3a i C3b. Jedną cząsteczką konwertazy C3 jest w stanie rozłożyć setki cząsteczek C3. Nowo powstałe białka C3b łączą się z atakowaną błoną, gdzie rozpoznawane są i wiązane przez kompleksy białkowe C4b2a, a to prowadzi do utworzenia kolejnej konwertazy – konwertazy C5 drogi klasycznej (C4b2a3b) wpływającej hydrolytycznie na składowe C5 [64,94].

Proteina C1 może być niekiedy aktywowana bezpośrednio (bez udziału przeciwciał) przez niektóre wirusy, biał-



Ryc. 1. Schemat aktywacji układu dopełniacza drogą alternatywną (AP)

ko C-reaktywne, MBL lub lipopolisacharydy (LPS). Zachodząca w ten sposób aktywacja może odgrywać szczególną rolę w początkowej fazie infekcji, przed pojawieniem się swoistych przeciwciał. Najnowsze badania wskazują [5,62], że lektyny SIGN-R1 znajdujące się na makrofagach bytujących w śledzionie rozpoznają polisacharydy otoczkowe *Streptococcus pneumoniae*. Okazuje się, że białka SIGN-R1 bezpośrednio wiążą się do składowych C1q, a tym samym uruchamiają ciąg reakcji prowadzących do utworzenia konwertazy C3 drogi CP. Jest to kolejny przykład nietypowej aktywacji ścieżki klasycznej, gdyż odbywa się bez udziału przeciwciał.

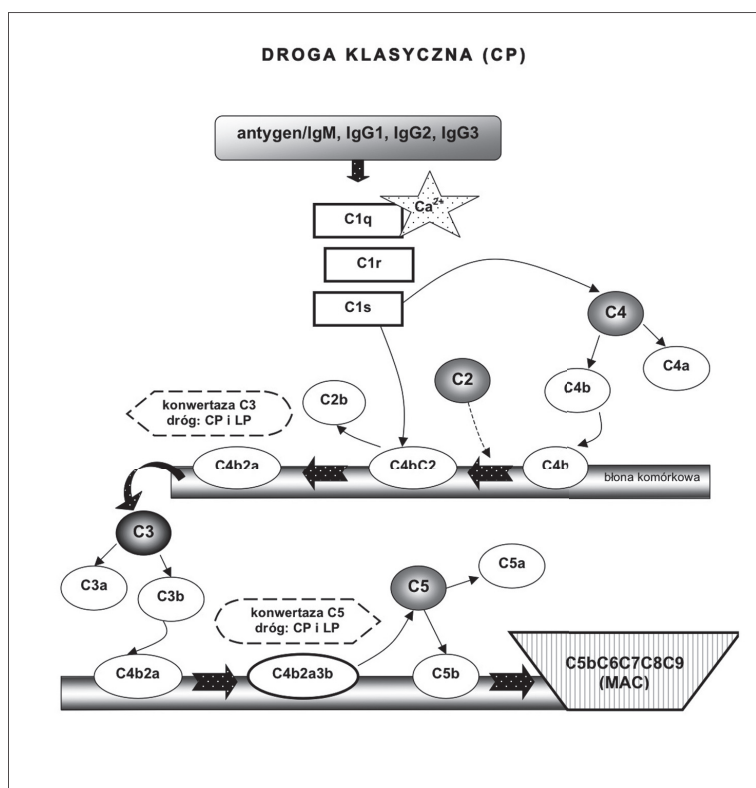
2.3. Droga lektynowa (LP)

Droga lektynowa (LP) inicjowana jest przez białko wiążące mannozę (mannose binding protein – MBP), zwane również lektyną wiążącą mannozę (mannose binding lectin – MBL) (ryc. 3). Oligometryczne struktury MBL przypominają budowę składnik C1q i wykazują dwie zasadnicze funkcje: aktywują dopełniacz, a dzięki odpowiednim receptorom dla tego białka na makrofagach ułatwiają fagocytozę opłaszczonych przez opsoniny mikroorganizmów [18,94]. Domena lektynowa MBP, tzw. domena CRD (carbohydrate recognizing domain) wiąże reszty cukrowe obecne na powierzchni komórek drobnoustrojów, takie jak: *N*-acetylglukozamina, D-mannoza, *N*-acetylmannozamina, L-fukoza, maltoza, D-glukoza,

galaktoza i *N*-acetylo-galaktozoamina [55,82]. Takahashi i wsp. [100] sądzą, że białko MBL odgrywa główną rolę w pierwszej linii obrony przed bakteriami Gram-dodatnimi. MBP aktywuje dopełniacz we współdziałaniu z proteinazami (proenzymami) serynowymi, m.in. MASP1 i MASP2, które przypominają pod względem czynnościowym składniki C1r i C1s ścieżki klasycznej [39]. Białko MBP wraz z proenzymami MASP1, MASP2, MASP3 i nieproteazową pochodną MASP2 – Map19 w obecności jonów Ca²⁺ tworzą stabilny kompleks krążący we krwi. Badania Tana i wsp. [101] wykazały, iż kompleks MBP-MASP może również tworzyć stabilne połączenie w nieobecności Ca²⁺. Połączenie tego kompleksu z określonymi węglowodanami znajdującymi się na powierzchni drobnoustrojów wywala hydrolizę łańcuchów peptydowych w obrębie proenzymów typu MASP. Aktywowane białko MASP2 rozkłada składniki C2, C4 i prawdopodobnie protrombinę, a MASP1 – C2, C3, czynnik XIII układu krzepności krwi i fibrynogen. Proteinaza MASP2 jest bardzo skuteczna względem składowej C4, gdyż około 20 razy efektywniej rozszczepia C4 na fragmenty C4a i C4b niż proteinaza C1s uczestnicząca w szlaku CP [25,62,71,109].

Aktywność MASP1 i MASP2 jest regulowana przez α2-makroglobulinę (alfa2M) oraz inhibitor C1 (C1-INA), który także w drodze klasycznej blokuje działanie składnika C1. Zarówno C1INA, jak i alfa2M wiążąc się kowalencyjnie z MASP1 uniemożliwiają powstawanie kompleksu





Ryc. 2. Schemat aktywacji układu dopełniacza drogą klasyczną (CP)

MBP-MASP1. Inhibitory te łączą się również z MASP2 lub z kompleksem MBP-MASP1-MASP2 blokując hydrolizę składnika C4 [3,37,70].

Najnowsze doniesienia literaturowe [3,37,70,95] wskazują, że MBL może aktywować składową C3 bez udziału proteinaz C2 lub C4, a białko biorące udział w krzepnięciu krwi – trombina może bezpośrednio aktywować C5 niezależnie od udziału C3. Selander i wsp. [95] dostarczyli także dowodów, że w procesie aktywacji białka C3 bezpośrednio przez MBL nie jest wymagana obecność proteinaz serynowych MASP.

Niedawne badania prowadzone przez Matsushita i Fujita [70] wykazały, że również inne białka surowicze – fikoliny podobnie jak MBL mogą aktywować ścieżkę LP. W procesie tym także biorą udział proteinazy serynowe typu MASP. Fikoliny poprzez swoje działanie przyspieszają fagocytozę i rozwój stanu zapalnego w miejscu, w którym pojawiły się mikroorganizmy. Wśród tej grupy białek można wyróżnić fikoliny typu H, L i M. Obecnie badania skupiają się głównie na roli fikolin L z powodu ich wielu możliwości rozpoznawania cukrowych ligandów na komórkach bakterii. Fikoliny typu H rozpoznają D-fukozę lub galaktozę obecną u *Aerococcus viridans* [65,103].

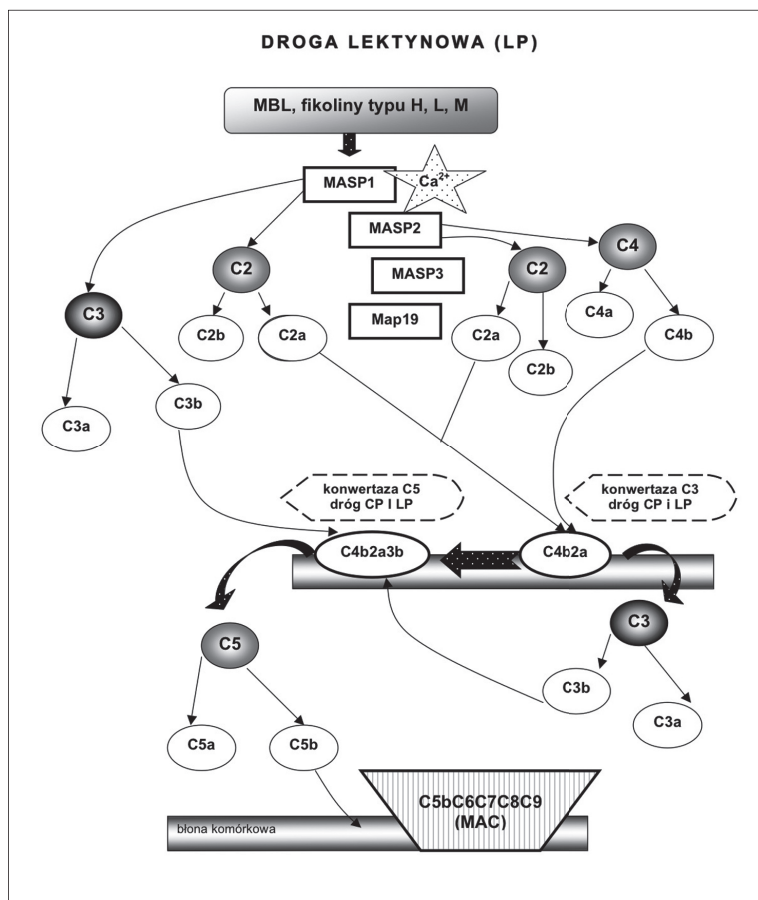
Roos i wsp. [90] zaobserwowali synergistyczne działanie między białkiem wiążącym mannozę a przeciwciałem IgA. Domena CRD białka MBL wiąże się do polimerycznej postaci IgA (IgA jest molekułą silnie glikozylowaną), w sposób zależny od jonów wapnia, co inicjuje szlak LP. Łączenie się MBL do immunoglobuliny IgA może stanowić nowy mechanizm cytolitycznego działania komplementu. Dowiedziono również, że obecność przeciwciał

IgA wzmacnia przebieg reakcji w obrębie szlaku alternatywnego C w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Następstwem niedoboru lub dysfunkcji MBP w surowicy krwi jest zmniejszona odporność przeciwwzakaźna organizmu i nawracające infekcje powodowane przez bakterie, grzyby, chorobotwórcze *Protista* i wirusy. Wrodzony niedobór kolektyny MBL u dzieci, często przejawia się zwiększoną podatnością na zakażenia układu oddechowego. Bąk-Romaniszyn i wsp. [8] postanowili sprawdzić, czy tego rodzaju defekt także ma decydujące znaczenie w chronicznym zapaleniu błony śluzowej żołądka. W badaniach wykazano, że brak we krwi składowych MBL nie wpływa znacząco na częstość występowania tej jednostki chorobowej, niezależnie, czy zapaleniu towarzyszy infekcja *Helicobacter pylori*. HAE spowodowany jest niedoborem inhibitora C1 (C1-INH). Niedostateczna ilość tego składnika we krwi prowadzi do niekontrolowanej aktywacji ścieżek CP i LP oraz wzrostu stężenia bradykinin. Obecność w ustroju czynników zakaźnych, np. bakterii lub wirusów może nadmiernie aktywować wymienione drogi dopełniacza, przez co pogarsza się stan chorobowy pacjentów ze stwierdzonym syndromem HAE. Wkład w tego typu badania wnieśli Cedzyński i wsp. [17], otóż dowiedli, że infekcje wywołane przez *H. pylori* oraz wirusy HBV tylko w nieznacznym stopniu nasilały objawy towarzyszące HAE.

2.4. Powstawanie kompleksu atakującego błonę (MAC)

W wyniku aktywności konwertazy C5 powstają cząsteczki C5b, do których przyłączają się kolejno składniki C6, C7, C8 i C9. Pod wpływem wzajemnych oddziaływań mię-



Ryc. 3. Schemat aktywacji układu dopełniacza drogą lektynową (LP)

dzy tymi białkami generowane są liczne zmiany konformacyjne, które umożliwiają wbudowywanie się C5b-9 w błonę komórkową. Dopiero przyłączenie się składników C8 i C9 nadaje kompleksowi zdolność uszkodzenia dwuwarstwy lipidowej [47,77].

Aby możliwe było utworzenie kompleksu atakującego błonę, konieczne jest wcześniejsze rozczepienie białka C5 przez konwertazy C5 na dwa mniejsze polipeptydy. Fragment C5a (10 kDa) zostaje odłączony i od tej chwili wywiera silny wpływ chemotaktyczny na komórki odpornościowe. Większy fragment C5b (180 kDa) pozostaje w pobliżu części C3b konwertazy C5 na powierzchni błony docelowej. Tak aktywowana cząsteczka C5b wiąże następnie białko C6 (120 kDa). Przyłączenie komponenty C6 do C5b stabilizuje oddziaływanie powstałego kompleksu z błoną i eksponuje miejsca wiążące dla składników C7 (110 kDa). Związanie C7 wywołuje zmiany konformacyjne w obrębie utworzonego do tej pory kompleksu, w wyniku czego składniki konwertazy C5 razem odłączają się od błony docelowej. Jest to krytyczny moment w tworzeniu MAC. Jeśli kompleks białek C5b-7 po odłączeniu konwertazy C5 nie zetknie się z błoną komórkową w przeciągu kilka sekund i nie stworzy z nią ścisłego kontaktu – ulegnie rozpadowi. Na tym etapie montowania MAC skupione białka nie wnikają głęboko w dwuwarstwę lipidową, nie zaburzając tym samym jej integralności. C8 – przedostatni komponent MAC jest molekułą zbudowaną z trzech łańcuchów polipeptydowych: α , β , γ . Między łańcuchami α i γ występują wiązania kowalencyjne, podczas gdy łańcuch

β jest związany niekowalencyjnie. Łańcuch β cząsteczki C8 wiąże się do białka C7 znajdującego się w kompleksie C5b67. Ostatnia komponenta wchodząca w skład MAC – białko C9 oddziałuje z fragmentem α białka C8. Na końcowych etapach tworzenia kompleksu atakującego błonę dołączane są kolejne cząsteczki C9 (do 18), które powiększają średnicę poru i formują razem ostateczny kompleks. Cząsteczki dopełniacza współtworzą pory zwracając się fragmentami hydrofilowymi do światła kanału. Przez utworzone kanały wypływają z komórki jony, np. potasowe i makromolekuły, np. ATP. Woda, a także lizozym pokonują osłabione osłony komórkowe i wnikają do wnętrza atakowanych komórek. Do zabicia jednej komórki bakteryjnej *Escherichia coli* potrzeba od kilkudziesięciu do kilkuset cząsteczek C5b-9 [46,48,77,110,116].

Wbudowywanie się kompleksu C5b-9 w dwuwarstwę lipidową błony zewnętrznej u bakterii Gram-ujemnych może być utrudnione z powodu obecności licznych cząsteczek LPS. Już w 1983 r. Taylor [102] wskazywał, że odpowiednia ilość kompleksów MAC ma kluczowe znaczenie w zachowaniu bakterioobójczych właściwości surowicy. Ponadto, zwracał uwagę na dopełniające działanie lizozymu w tym procesie. Muramidaza, zdaniem autora, wykazuje enzymatyczną aktywność względem mureiny u bakterii Gram-ujemnych po tym, jak błona zewnętrzna staje się nieszczelna, choćby wskutek działania MAC. Joiner i wsp. [51] uważają, że miejscami, w których dochodzi do uszkodzenia błony cytoplazmatycznej przez kompleksy C5b-9 są tzw. strefy bioadhezji (dziś określane jako złącza Bayera) utworzone

przez błony wewnętrzną i zewnętrzną. Przemawia za tym to, iż złącza Bayera dość licznie występują w ścianie komórkowej w trakcie wzrostu bakterii. Schiller i wsp. [93] sądzą, że bakteriobójcze działanie surowicy słabo rozcieńczonej wynika głównie z dużego stężenia białek tworzących kompleksy atakujące błonę.

3. ROLA BIAŁKA C3 W AKTYWACJI KOMPLEMENTU

Główną rolę w reakcjach, w których uczestniczą białka dopełniacza odgrywa składowa C3. Przemawiają za tym następujące fakty: komponenta C3 umożliwia powstawanie MAC, jako końcowy efekt prawidłowego przebiegu proteolitycznej kaskady aktywacji; jest źródłem powstania fragmentów C3b i iC3b, pełniących funkcje opsonin oraz cząsteczek C3a i C5a o charakterze anafilatoksyn [42,116]. Czynniki C3 ma istotne znaczenie w odporności makroorganizmu na zakażenia wywołane bakteriami, wirusami, grzybami i pierwotniakami. Ludzka komponenta C3 jest dość dużą glikoproteiną składającą się z dwóch podjednostek (115 kDa – podjednostka α i 75 kDa – podjednostka β), 1641 reszt aminokwasowych i 13 domen [49]. Charakterystyczną cechą białka C3 jest wiązanie się do aktywujących komplement antygenów za pośrednictwem reaktywnego wiązania tioestrowego. Konwertaza C3 rozszczepia podjednostkę α C3 przy wiązaniu peptydowym 77 doprowadzając do powstania fragmentów C3a (9kDa) i C3b (180 kDa). Z tego powodu wiązanie tioestrowe staje się niestabilne i podatne na atak nukleofilowy elektronów pochodzących z ugrupowań chemicznych $-OH$ i $-NH_2$, znajdujących się na powierzchni aktywującej układ dopełniacza. Czynniki I (fI) w obecności czynnika H (fH) i receptora CR1 (CD35) utrudnia formowanie się aktywnych konwertaz C3 i C5, przez przekształcenie składowych C3b w ich nieaktywne postaci iC3b. Dalszy rozpad iC3b z udziałem fI i CR1 prowadzi do powstania fragmentów C3c [9,38].

Eksponowanie na powierzchni komórki bakterii grup hydroksylowych lub aminowych dostępnych dla tworzenia mostków estrowych lub amidowych ze składowymi C3 lub C4, stanowi ważny czynnik w rozpoznawaniu powierzchni komórki bakteryjnej przez system dopełniacza [54,79].

Pacjenci, u których stwierdzono wrodzone niedobory C3 są nieporównywalnie bardziej podatni na infekcje *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae* niż osoby z prawidłowym poziomem C3 w surowicy. Obniżony poziom białka C3 w surowicy noworodków zwiększa podatność na zakażenia bakteryjne, wirusowe, grzybicze i pierwotniacze [21,33]. Deficyt białka C3 w surowicy krwi prowadzi do złożonych zaburzeń wpływających na prawidłową odpowiedź immunologiczną, chemotaksję i obniżenie zdolności opsofagocytujących przez komórki układu immunologicznego [75].

4. CZYNNIKI KONTROLUJĄCE AKTYWACJĘ DOPEŁNIACZA

Aktywacja układu dopełniacza i powstawanie MAC znajduje się pod kontrolą swoistych białek RCA, do których zaliczamy białka komórkowe i surowicze.

Komplement jest stale aktywowany *in vivo* i potencjalnie mógłby uszkadzać własne komórki. Uszkodzeniom tym zapobiegają białka błonowe, do których zaliczamy: DAF –

czynnik przyspieszający rozkład (decay accelerating factor – CD55), MCP – błonowy kofaktor białkowy (membrane cofactor protein – CD46), CR1 – receptor białek dopełniacza, inaktywuje działanie konwertaz (complement receptor type I – CD35), HRF – czynnik restrykcji homologicznej (homologous restriction factor), C8bp (C8 – binding protein lub MAC inhibiting protein – MIP) oraz CD59 – protektyna (membrane inhibitor of reactive lysis). Czynniki DAF, MCP i CR1 kontrolują powstawanie gotowych konwertaz C3 i C5 oraz decydują o ich trwałości, gdyż przyczyniają się do proteolitycznej degradacji C3b i C4b przez czynnik I (fI). Zapobiegają również nadmiernemu rozwojowi stanu zapalnego i ograniczają amplifikację w szlaku AP na powierzchniach komórek i w macierzy pozakomórkowej. Białka HRF i protektyna (CD59) hamują tworzenie kompleksu atakującego błonę [77,103,110].

Aktywacja dopełniacza znajduje się pod kontrolą białek surowiczych. Inhibitor składowej C1 opisywany jako C1-INH oddziałuje na aktywne C1r i C1s oraz obniża aktywność proteinaz serynowych MASP1 i MASP2. Czynniki C4bp, wiążąc się ze składową C4b, kontroluje powstawanie konwertazy C4b2a. Czynniki I, czyli inaktywator C3b/C4b, rozkłada C3b i C4b zarówno wolne, jak i związane w konwertazach. Inne białko osocze – czynnik H wspólnie z fI przekształca białko C3b w postać nieaktywną. Tworzenie MAC znajduje się pod kontrolą białka S (witronektyny), które uniemożliwia polimeryzację C9 oraz łączenie się kompleksu C5b-7 z błoną komórkową. Anafilatoksyny C4a, C3a i C5a są inaktywowane przez karboksypeptydazy N i R. Inny inhibitor – ATIII (anti-thrombin III) w obecności heparyny hamuje aktywność kompleksu MBL/MASP, a także działa hamująco względem MASP1 i MASP2 [57,88,108].

5. RECEPTORY SKŁADOWYCH DOPEŁNIACZA (CR)

Dotychczas opisano osiem rodzajów receptorów (CR) składowych dopełniacza, występujących na różnych komórkach ustroju i są to: cC1qR, C1qRp, CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), CR4 (CD11c/CD18), C3aR oraz C5aR (CD88). Do najważniejszych funkcji pełnionych przez te molekuly zalicza się: regulację aktywności komplementu, ułatwianie fagocytozy przez komórki żerne, usuwanie kompleksów immunologicznych. Receptory CR wiążą składowe powstające w wyniku aktywacji białek dopełniacza, przez co mają modulujący wpływ na reakcje immunologiczne. Występują licznie na komórkach układu immunologicznego, na erytrocytach, trombocytach, fibroblastach, plemnikach i in. Niektóre komórki mają jeden typ receptora (np. krwinki czerwone – CR1), u innych zaś w błonach komórkowych znajduje się kilka rodzajów cząsteczek należących do grupy CR (np. neutrofile – m.in. CR1, CR3, CR4, C5aR). Najlepiej scharakteryzowana jest grupa receptorów wiążących fragmenty powstałe w wyniku rozpadu białek C3. Molekuly CR1 są obecne głównie na erytrocytach i leukocytach i oddziałują ze składowymi C3b, C4b, iC3b, a także C3c. Receptory typu CR2 wiążą fragmenty pochodzące z proteolizy C3b z udziałem czynnika I, a zatem – iC3b oraz C3d. Znajdują się głównie w błonach limfocytów B i grudkowych komórek limfatycznych. CR3 i CR4 są ekspresjonowane na większości leukocytów, wiążąc fragmenty iC3b. Receptory C3aR i C5aR są swoiste względem anafilatoksyn, odpowiednio

C3a i C5a. Występują najliczniej na komórkach tłuszczowych, neutrofilach i monocytach. Receptory C1q obecne są najczęściej na komórkach żernych, komórkach tłuszczowych i płytkach krwi. cC1qR przyłącza się do kolagenowego „ogonka” polimerycznej formy C1q, natomiast C1qRp swoiście rozpoznaje globularne „główki” tej kolektyny [61,67].

6. ANTYBAKTERYJNE DZIAŁANIE LIZOZYMU

Lizozym jest jednym z najważniejszych białek należących do układu nieswoistej, humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Enzym ten, o masie cząsteczkowej 14,4 kDa występuje u zwierząt, roślin i wirusów. Ogólny ładunek dodatni tego białka wynika z obecności w łańcuchu polipeptydowym wielu reszt argininy. Duże ilości muramidazy znajdują się w ziarnach neutrofilów i makrofagów, jak również w większości płynów tkankowych (w osoczu krwi, łzach, ślinie, wydzielinach śluzowych dróg oddechowych). Muramidaza występuje obficie w mleku, miodzie, w białku jaja kurzego. Stężenie lizozymu we krwi zdrowego człowieka wynosi 0,5–2,0 µg/ml, a w ślinie 2,0–5,0 µg/ml. Nie stwierdzono jego obecności w pocie, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym. Tokarz-Deptuła i wsp. [104] wykazali, że stężenie LZ w surowicy królików znacznie wzrosło po kontakcie zwierząt z wirusami RHD należącymi do rodziny *Calciviridae*.

Nazwa „muramidaza” wywodzi się z litycznej aktywności enzymu w stosunku do ściany komórkowej bakterii. Lizozym działa hydrolitycznie w stosunku do wiązań β-1,4-glikozydowych znajdujących się między atomem węgla pierwszego (C-1) w MurNAc (kwas N-acetylmuraminowy) a atomem C-4 w GlcNAc (N-acetylglukozamina) peptydoglikanu (PG) zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Mechanizm katalizy enzymatycznej działania tego enzymu niewątpliwie jest ściśle związany z tym, iż enzym ten składa się z dwóch odrębnych domen (tzw. płatów), które rozdzielone są bruzdą (tzw. szczeliną). To właśnie w tej bruzdzie następuje związanie substratu. Szczelina może pomieścić sześć jednostek monosacharydowych [6,24].

LZ ma zdolność hamowania chemotaksji aktywowanych leukocytów oraz wykazuje silne powinowactwo do jonów wapnia, przez co przypuszczalnie może hamować aktywację układu C drogami: klasyczną i lektynową, przy czym warto zaznaczyć, że lizozym w stężeniu na poziomie fizjologicznym wykazuje niewielkie działanie hamujące w stosunku do białek komplementu [15,84]. Ciekawą właściwością LZ jest również to, że ma zdolność wiązania LPS uwolnionego z powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych. Kompleksy lizozym/LPS hamują wytwarzanie TNF-α, a zatem zmniejszają ryzyko rozwoju silnej reakcji zapalnej spowodowanej obecnością dużej ilości endotoksyny w ustroju. Wykazano, że muramidaza wiąże się chętnie do białka surowiczego – laktoferyny, jednak rola tego typu oddziaływań nie jest do końca wyjaśniona. Liczne prace oryginalne [60,99,107] potwierdzają, że lizozym wykazuje aktywność bakteriobójczą głównie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Cytolityczne działanie lizozymu na komórki bakterii Gram-ujemnych nie jest w pełni poznane. W tej grupie bakterii działanie ochronne przeciwko enzymatycznej aktywności LZ pełni błona zewnętrzna (OM). Okazuje się, że wcześniejsze potrak-

towanie komórek związkami EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy) destabilizuje OM (EDTA chelatuje m.in. jony Mg²⁺) i ułatwia rozpoczęcie hydrolizy peptydoglikanu przez muramidazę [30,97]. Masschalck i wsp. [69] uważają, że lizozym nie działa na większość komórek bakterii Gram-ujemnych, ponieważ nie może przedostać się przez barierę jaką stanowi OM, żeby dotrzeć do celu, którym jest mureina. Jednak pojawiły się prace, w których wskazuje się na możliwość przemieszczania się muramidazy przez błonę z powodu częściowych właściwości lipofilowych tej struktury [78,114]. Najnowsze badania prowadzone przez Yuana i wsp. [114] oraz Mudgila i wsp. [78] dowodzą, że cząsteczki LZ w warunkach *in vitro* mają zdolność przenikania przez błony biologiczne utworzone przez związki fosfatydyloglicerolu, fosfatydyloseryny i fosfatydyloetanolaminy. Niektórzy autorzy wskazują [26], że LZ wiąże się do kwasów nukleinowych DNA i RNA wykazując działanie histonopodobne. W kwestii antybakteryjnego działania lizozymu podkreślają, że mechanizm działania tej cząsteczki, w pierwszej kolejności, polega na niszczeniu błony zewnętrznej u bakterii Gram-ujemnych, a dopiero w kolejnych etapach na degradacji mureiny.

Lizozym może być usuwany z surowicy w wyniku adsorpcji na bentonicie (montmorylonit, MMT) [32]. Bentonit jest skałą ilastą pochodzenia wulkanicznego, zbudowaną z warstw krzemotlenowych (Si₂O₃) złączonych warstwą glinotlenową Al₂O₃(OH)₂. Pakietowa struktura tej substancji i obecność słabych oddziaływań van der Waalsa istotnie wpływa na zdolności adsorpcyjne MMT. Charakterystyczną właściwością montmorylonitu jest zdolność pochłaniania dużych ilości wody, a wraz z nią pierwiastków biogenych oraz substancji chemicznych, w tym muramidazy [80]. Bugła-Płoskońska i wsp. [12,13,14] przedstawili wstępne badania nad zmianą przestrzennej struktury MMT po kontakcie z surowicą ludzką i bydłą, stosując metody WAXS (szerokokątowa dyfraktometria rentgenowska, szerokokątowe rozpraszanie rentgenowskie) i SAXS (małokątowa dyfraktometria rentgenowska, dyfraktometria niskokątowa). Autorzy zaproponowali model przestrzenny struktury bentonitu przed i po zaadsorbowaniu składników surowicy. Zmiany struktury w lamelarnej budowie MMT po eksfoliacji surowicą mogą świadczyć o zaadsorbowaniu nie tylko lizozymu, ale również innych składników surowicy, w tym jonów Ca²⁺. Ponieważ niedobór jonów wapnia utrudnia zachodzenie reakcji na początkowych etapach aktywacji ścieżek CP i LP układu dopełniacza, szczepy bakteryjne, których wrażliwość wynikała z aktywacji tych dróg w surowicy krwi, stawały się odporne.

Wolska i wsp. [111] podjęli badania nad bakteriobójczym działaniem surowic po adsorpcji na bentonicie i okazało się, że usunięcie lizozymu z 50% surowicy świńskiej spowodowało spadek jej aktywności o 69%. Schiller i wsp. [93] zwrócili uwagę, że udział lizozymu w procesach bakteriobójczych uwidoczni się dopiero w niskich stężeniach surowicy (1% NSL). 10% surowica ludzka pozbawiona lizozymu była w takim samym stopniu bakteriobójcza jak przed jego usunięciem. Mokracka-Latajka i wsp. [74] wykazali, że 60% testowanych szczepów *Salmonella* namnażało się w surowicy, z której usunięto lizozym. Okazało się, że szczepy typu gładkiego (S) były podatne tylko na kompletną surowicę, podczas gdy szczepy typu szorstkiego (R), albo wymagały do zabicia poszczególnych ścieżek

aktywacji C albo lizozymu. Autorzy doszli do wniosku, że eliminacja *Salmonella* możliwa jest jedynie, gdy aktywacja C zachodzi poprzez szlak CP, wspomagany przez muramidazę.

7. MECHANIZMY OBRONNE BAKTERII CHRONIĄCE JE PRZED BAKTERIOBÓJCZYM DZIAŁANIEM SUROWICY

Niektóre mikroorganizmy rozwinęły mechanizmy obrony przed bójczym działaniem surowicy krwi. Skuteczność unikania odpowiedzi immunologicznej przez bakterie zależy bardzo m.in. od dużej zmienności antygenowej w obrębie struktur powierzchniowych, wchodzących w skład ściany komórkowej, np. LPS, lipooligosacharydów (LOS), otoczek, czy białek błony zewnętrznej (OMP). Na atak ze strony układu odpornościowego narażone są zwłaszcza patogeny, których cykl życiowy w całości lub tylko częściowo jest związany z układem krwionośnym lub limfatycznym [73,88]. Różnorodność mechanizmów zwiększających szanse drobnoustrojów na przeżycie w makroorganizmie przejawia się w:

- opuszczaniu obszarów o wzmożonej aktywności immunologicznej,
- „maskowaniu“ miejsc na powierzchniach komórek bakteryjnych, które wzbudzają odpowiedź immunologiczną, np. przez włączanie kwasu sjałowego w cząsteczki LPS, LOS, a także otoczki,
- wykształceniu LPS typu gładkiego (chemotyp S), który aktywuje komplement „z dala“ od błony zewnętrznej,
- usuwaniu zdeponowanych na ścianie komórkowej składników dopełniacza przez ich enzymatyczny rozkład (najczęściej białek C3a i C3b),
- zmianie aktywności białek C poprzez fosforylację,
- hamowaniu aktywacji poszczególnych ścieżek komplementu,
- mimikrze między strukturami powierzchniowymi mikroorganizmów a białkami kontrolującymi prawidłowe działanie C,
- wbudowywaniu w struktury powierzchniowe bakterii antygenów gospodarza o charakterze inhibitorów białek komplementu, mających za zadanie ograniczać nadmierną odpowiedź immunologiczną,
- syntezie OMP, które mogą chronić bakterie Gram-ujemne przed wbudowywaniem się kompleksu MAC do błony zewnętrznej,
- wiązaniu do osłon zewnętrznych bakterii protektyny (CD59), która zapobiega tworzeniu się MAC,
- syntezie powierzchniowego białka M u niektórych paciorkowców, które przyłącza m.in. fH, C4bp, sIgA, jednocześnie chroniąc bakterie przed skutkami działania C,
- wytwarzaniu inhibitorów lizozymu, np. Ivy, SIC,
- przejawianiu aktywności proteolitycznej względem składników C i immunoglobulin [40,41,88,89,113,115].

Niewrażliwość bakterii Gram-ujemnych na surowicę wynika m.in. z syntezy otoczek (np. otoczka K1 u *E. coli*), LPS oraz białek powierzchniowych np. TraT, BrkA, które utrudniają włączanie MAC w błonę komórkową [88]. Warto zaznaczyć, iż obecność otoczek u bakterii Gram-ujemnych nie jest jednoznaczna z wystąpieniem fenotypu opornego na działanie komplementu [10]. Mechanizm ochronnego działania O-swoistych łańcuchów lipopolisacharydów jest dobrze poznany [11,46,48]. Zarówno szczepy szorstkie (R) jak i gładkie (S) aktywują dopełniacz. Jednak

w przypadku chemotypów S, białka budujące MAC depozycją się „z dala“ od powierzchni komórek, w wyniku czego nie dochodzi do bezpośredniego oddziaływania kompleksu C5b-9 z błoną zewnętrzną [20]. Nelson i Roantree [82] udowodnili, że szczepy podatne na działanie surowicy nie mają w strukturach O-swoistych LPS reszt ramnozy, mannozy i abekwozy. Wyniki badań własnych [11,36,73] wykazały, że niektóre szczepy pałeczek Gram-ujemnych zawierające kwas sjałowy w regionie O-swoistym LPS wykazują zróżnicowaną wrażliwość na bakteriobójcze działanie surowicy ludzkiej i zwierzęcej. Wyniki te wskazują, że obecność kwasu sjałowego w LPS nie jest wystarczającym czynnikiem do uzyskania przez te bakterie oporności na surowicę. Devyatyarova-Johnson i wsp. [23] zbadali, że w przypadku serowaru *Salmonella* Montevideo, wytwarzanie przez te bakterie LPS z dużą ilością reszt mannozy sprzyja wiązaniu składowej MBL. Autorzy uważają, że także trójwymiarowa struktura LPS ma duże znaczenie w wiązaniu lektyny MBL. Hume i wsp. [43] sądzą, że w badaniach nad mechanizmami oporności bakterii na bakteriobójcze działanie surowicy należy uwzględnić: liczbę cząsteczek LPS na powierzchni komórki, zdolność bakterii do wiązania laktoferyny oraz preferencyjne wiązanie składników C (w tym C3). W kontekście omawianych zagadnień, nie można pominąć faktu, że lipopolisacharyd jest uwalniany z OM pod wpływem działania składników surowicy [85]. Mechanizm ten może powodować, że aktywacja składowych C zachodzi z dala od powierzchni komórek, co stanowi kolejny przykład na uniknięcie przez bakterie Gram-ujemne destrukcyjnego działania komplementu.

Interesujące zjawisko zaobserwowano w przypadku szczepu *N. gonorrhoeae*. Bakterie te podczas infekcji mogą zmieniać antygenowość struktur powierzchniowych na skutek usjałowania laktonetetraozydowej części LOS z udziałem CMP-NeuAc (cytydynomonofosforan kwasu N-acetyloneuraminowego) gospodarza. Sjałilacja LOS przejawia się w tym przypadku zwiększeniem wirulencji bakterii [4,28]. Lipooligosacharydy *N. meningitidis* [45] i *H. somnus* [44] z kwasem sjałowym w niewielkim stopniu rozpoznawane były przez kolektynę MBL [45] oraz przez przeciwciała [44], co przyczyniało się do zwiększonej oporności tych szczepów na cytotoxiczne działanie surowicy. Udowodniono, że obecność kwasu mlekowego i glukozy w środowisku, w którym przebywają bakterie może pośrednio wpływać na wzrost ich oporności na surowicę. Okazało się, że związki te uczestniczą w reakcjach prowadzących do syntezy kwasu sjałowego przez bakterie, co zostało potwierdzone w hodowlach *N. meningitidis* [29].

Sjałowane otoczki, występujące u *S. agalactiae* utrudniają prawidłowe zajście procesu fagocytozy [96]. Wyniki dostarczone przez Bugla-Płoskońską i wsp. [10] wskazują, że otoczka zbudowana z polimerów kwasu sjałowego, występująca u szczepu *E. coli* K1 nie determinuje oporności na surowicę bydłą i ludzką. Devine i Roberts [22] sugerują, że poziom wrażliwości szczepów otoczkowych może wynikać z grubości tej struktury. Merino i wsp. [72] prowadząc badania na bakteriach *Klebsiella pneumoniae* wykazali, że w przypadku szczepów otoczkowych uruchamiane są reakcje w surowicy związane ze szlakiem AP układu dopełniacza, natomiast do eliminacji szczepów bezotoczkowych wymagane były drogi: AP, CP i LP.

Białko C3 odgrywa główną rolę w reakcji układu dopełniacza i ma istotne znaczenie w odporności makroorganizmu wobec zakażeń spowodowanych bakteriami, pierwotniakami, grzybami i wirusami [47]. Dlatego w badaniach nad cytotoxicznym działaniem surowicy szczególnie uwzględnia się aktywację składowej C3 przez antygeny bakteryjne. Wkład w tego typu badania wnieśli Fudała i wsp. [35] oraz Kaca i wsp. [53] pracując na LPS *Shigella flexneri* [35] i *Proteus mirabilis* [53]. Stosując m.in. metodę ELISA wykazali, że szczepy wrażliwe *S. flexneri* na cytotoxiczne działanie surowicy ludzkiej wiązały więcej składowych C3 niż szczepy odporne. W obecności LPS-ów uzyskanych z komórek różnych serotypów *P. mirabilis* (także wrażliwych) również zachodził rozpad C3 z wytworzeniem fragmentów C3c, lecz intensywność zachodzących reakcji zależała od rodzaju użytego LPS, charakterystycznego dla danego serotypu bakterii.

S. pyogenes jest bakterią chorobotwórczą dla ludzi, u których wywołuje zakażenia skóry i tkanek miękkich. Szczep ten wytwarza białko M, które rozpoznaje i wiąże się do białek surowiczych, takich jak fH, C4bp, sekrecyjne IgA (sIgA), przeciwciała IgG, plazminogen, fibronektyna, trombina, fibrynogen, kininogen. Białka powierzchniowe Fba, Scp unieruchamiają niektóre składniki układu dopełniacza na zewnętrznych warstwach ściany komórkowej bakterii, inne np. PspC wiążą czynniki regulatorowe np. fH [20,115]. U paciorkowców grupy A wykryto białko SIC (streptococcal inhibitor of complement), które hamuje działanie komplementu, ale również jest inhibitorem dla lizozymu [15].

Bakterie gatunku *Borrelia burgdorferi* bronią się przed działaniem komplementu syntetyzując białka regulujące aktywność dopełniacza [40,41]. *B. burgdorferi* może unikać ataku ze strony komplementu za pośrednictwem białka powierzchniowego BpCRASP-2 (complement regulator acquiring surface proteins), które zawiera domeny wiążące czynniki H i FHL-1 (factor H-like protein 1). Unieruchomione w ten sposób białka regulatorowe nadal wykazują zdolność inaktywacji czynnika C3b. Ekspresja BpCRASP-2 jest zależna od temperatury otoczenia i jego pH [58]. Patarakul i wsp. [86] sugerują, że na powierzchniach komórek *B. burgdorferi* mogą się znajdować receptory białka C3b, co utrudnia tworzenie kanałów w błonie przez kompleks atakujący błonę.

Hamowanie aktywacji drogi alternatywnej dopełniacza przez *N. meningitidis* grupy B i *N. gonorrhoeae* wykazano w badaniach prowadzonych przez Vogela i wsp. [106]. Inhibicja ścieżki AP możliwa była dzięki wiązaniu regulatorowego czynnika H przez sjałowane struktury powierzchniowe. Inni badacze dowiedli, że wymienione wyżej bakterie unieczynnają również czynnik regulacyjny C4bp, który wiązany jest przez białka błony zewnętrznej PorA, a to prowadzi do zahamowania aktywacji układu dopełniacza drogą klasyczną [50,87]. W przypadku dwoinek *N. meningitidis* serogrupy B lipoproteina GNA1870 również pełni funkcję liganda dla fH. Madico i wsp. [66] sądzą, że zwiększona ilość GNA1870 w OM wpływa istotnie na odporność szczepów na bakteriobójcze działanie surowicy. Mutanty, które nie wytwarzały tej lipoproteiny skuteczniej wiązały składową C3, a tym samym stawały się bardziej wrażliwe na cytotoxiczne działanie surowicy, a duży udział w tych procesach odgrywała ścieżka klasyczna.

Alberti i wsp. [1] wyjaśniają, że kluczowym zjawiskiem w determinowaniu odporności bakterii Gram-ujemnych na surowicę, jest ograniczony dostęp białka C1q i immunoglobulin do białek porynowych. Inni autorzy [34] dowiedli, że na komórkach szczepu opornego *H. ducreyi* były obecne składowe C6 i C9, co jednak nie zapewniało litycznego działania C wobec tych komórek. Prawdopodobnie MAC deponuje się zarówno na szczepach wrażliwych, jak i opornych, jednak końcowy efekt cytotoxiczny jest modulowany jeszcze przez inne składniki ściany komórkowej, takie jak chociażby białka powierzchniowe.

Staphylococcus aureus wydziela wiele białek modulujących działanie układu dopełniacza. Inhibitory charakterystyczne dla gronkowca złocistego to SCIN-B (staphylococcal complement inhibitor B), SCIN-C, Efb (fibrinogen binding protein) i Ecb, które interferują z konwertazami C3 (C4b2a i C3bBb), a tym samym silnie ograniczają prawidłowy przebieg reakcji prowadzących do utworzenia MAC. Białka Efb i Ecb swoiście inaktywują konwertazy, w których skład wchodzi fragment C3b, czyli konwertazy C3 drogi AP (C3bBb), a także konwertazy C5 szlaków CP i LP (C4b2a3b) i ścieżki AP (C3bBb). Inhibitor Efb rozpoznaje fibrynogen, a zatem domenę C3d, będącą składową fragmentu C3b. Innym mechanizmem obronnym *S. aureus* jest wykształcenie receptorów fragmentów Fc przeciwciał IgG (ludzkich, króliczych, psich i kocich). Ten sposób wiązania Ig przez komórki określane jest jako nieimmunologiczny i potwierdzony został u innych grup bakterii, takich jak β -hemolizujące paciorkowce, *Moraxella* (*Branhamella*), *Clostridium*, *Brucella* i *Haemophilus*. Biologiczne znaczenie tego zjawiska przejawia się w zahamowanej fagocytozie, agregacji płytek krwi oraz zaburzonych reakcjach typu CDCC (cytotoksyczność komórkowa zależna od dopełniacza). Gatunek *S. aureus* rozwinął mechanizm polegający na ograniczeniu za pomocą białka CHIPS aktywacji komórek żernych po kontakcie z anafilatoksyną C5a [52,112].

Nawrot i wsp. [81] sądzą, że podatność pałeczek Gram-ujemnych na komplement jest determinowana przez „zestaw” antygenów powierzchniowych, ale i stopień usieciowania mukopeptydu.

Niedawno odkrytym mechanizmem odporności bakterii na cytotoxiczne działanie surowicy jest wytwarzanie inhibitorów lizozymu. Zjawisko to potwierdzono u szczepów *E. coli*, u których w przestrzeni peryplazmatycznej wykryto inhibitor Ivy. Zbadano, że białko Ivy działa swoiście względem lizozymów typu c i g występujących u kręgowców. Klasyfikacja muramidazy opiera się na różnicach w ich aktywności katabolicznej oraz strukturze chemicznej. Na podstawie tych cech wyodrębniono różne rodziny i typy tych związków. Najczęściej reprezentowanym typem muramidazy jest typ c o właściwościach fizykochemicznych i biologicznych zbliżonych do lizozymu białka jaja kurzego. Lizozym typu g wykazuje podobne właściwości do muramidazy występującej w białku jaja gęsiego [15,16]. U *S. enteritidis* również wykryto związek o podobnym działaniu inhibującym: białko PliC, lecz jedynie w stosunku do muramidazy typu c. W przypadku bakterii z rodzaju *Salmonella* ten mechanizm odporności może mieć duże znaczenie w kolonizacji makroorganizmów podczas infekcji. Sądzi się, że bakterie Gram-ujemne przebywające

w surowicy stają się wrażliwe na działanie lizozymu dopiero po zadziałaniu laktoferryry na błonę zewnętrzną [16].

Obecność proteinaz działających na składniki komplementu lub immunoglobuliny potwierdzono m.in. w przypadku *Pseudomonas aeruginosa* [111]. Elastaza *P. aeruginosa* degraduje składowe C1, C2, C5, C6, C8 i C9. Uważa się, że szczepy wykazujące aktywność proteolityczną są niewrażliwe na bakteriobójcze działanie surowicy [111]. Pałeczki *H. influenzae* i *Proteus* sp. oraz dwoinki *N. meningitidis* i *N. gonorrhoeae*, rozkładają przeciwciała typu IgA. *P. mirabilis* wytwarza metaloproteinazy, które działają na ciężkie łańcuchy IgA i IgG oraz inne białka nienależące do układu immunologicznego, takie jak żelatyna i kazeina [2,7,56,63,91,92,105]. *Streptococcus* grupy B wytwarza endopeptydazę – ScpB, która działa swoiście na C5a. Ponadto, szczep ten wytwarza receptor anafilatoksyny C5a i dzięki temu ogranicza odpowiedź komórkową z udziałem neutrofilów. Proteinazy alkaliczne i elastazy *P. aeruginosa* przejawiają swoje działanie w stosunku do składowych C3b [20].

PODSUMOWANIE

Zebrane i przedstawione w pracy informacje mają na celu zwrócić uwagę na złożoność reakcji zachodzących w surowicy krwi w odpowiedzi na obecność w niej mikroorganizmów. W zjawisku tym niezaprzeczalną rolę pełni system białek dopełniacza wraz z czynnikami regulatorowymi oraz lizozym. Przez lata uważano, że ścieżka alternatywna nie jest zależna od obecności swoistych przeciwciał. Dziś pogląd ten został zweryfikowany i okazuje się, że immunoglobuliny klasy A wzmacniają działanie drogi alternatywnej. Ponadto, ścieżka CP może ulegać aktywacji bezpośrednio przez niektóre wirusy, białko C-reaktywne, MBL, LPS, a także białko SIGN-R1, co zaprzecza powszechnej opinii, iż udział przeciwciał w prawidłowym przebiegu drogi klasycznej jest niezbędny. Jest wiele dowodów na to, że nie tylko białko C3 ulega spontanicznej aktywacji, ale także składowa C1. Droga lektynowa stanowi obecnie największe wyzwanie w badaniach nad komplementem z tego powodu, że przez długi czas była najmniej poznana. Obecnie wiadomo, że oprócz kolektywnego MBL i białek wspomagających typu MASP i ich pochodnych, udział w niej biorą także lektyny – fikoliny, odkryte do tej pory jedynie u człowieka. Wykazano także, że MBL może wiązać się

do polimerycznej formy IgA w obecności jonów wapnia, tym samym inicjując szlak LP.

Deponowanie składników dopełniacza na ścianie komórkowej bakterii nie gwarantuje cytolitycznego działania wobec tych komórek bakterii. Brakuje jednoznacznych dowodów, w jaki sposób dochodzi do eliminacji bakterii Gram-ujemnych z krwi w powiązaniu z działaniem białek C i lizozymu. Wydaje się, że mechanizmu bakteriobójczej aktywności surowicy nie można tłumaczyć jedynie w kontekście aktywacji komplementu, ale również w rozumieniu tych zjawisk należy uwzględnić rolę muramidazy. Niedawno odkrytymi, ciekawymi właściwościami LZ są: „konkurowanie” o jony wapnia w surowicy oraz „wygaszanie” zbyt silnej reakcji zapalnej spowodowanej nadmierną obecnością endotoksyny w ustroju. Ponadto, w badaniach *in vitro* dowiedziano, że lizozym może przenikać przez błony o określonym składzie chemicznym. Kontynuowanie tego rodzaju badań może w istotny sposób przyczynić się do wyjaśnienia procesu uszkodzania ściany komórkowej bakterii na poziomie molekularnym.

Wciąż odkrywa się nowe mechanizmy obrony bakterii przed szkodliwym działaniem surowicy. Zmienność w obrębie struktur powierzchniowych mikroorganizmów, wydzielenie przez nie czynników, które wpływają na przebieg reakcji z udziałem komplementu i lizozymu, utrudniają interpretację zachodzących procesów immunologicznych w odpowiedzi na obecność patogenów. Choćby rola kwasu sjałowego obecnego m.in. w LPS, czy LOS, w determinowaniu oporności bakterii na cytolityczne działanie surowicy jest wciąż słabo poznana. W literaturze światowej znajdują się sprzeczne informacje co do hamującego działania tego związku względem ścieżki alternatywnej układu dopełniacza.

Niedobory składowych komplementu lub czynników regulujących RCA predysponują do zwiększonej podatności na zakażenia. Coraz częściej, w przypadku chorób o nieznannej etiologii, poszukuje się zakażeń, które być może są główną przyczyną „rozregulowania” odpowiedzi immunologicznej organizmu. Wobec powyższego, bakteriobójcze działanie surowicy można uznać za proces bardzo złożony i nie w pełni obecnie poznany. Prowadzone w tym zakresie badania przybliżają nas do pełnego jego wyjaśnienia.

PIŚMIENICTWO

- [1] Alberti S., Marqués G., Hernández-Allés S., Rubires X., Tomás J.M., Vivanco F., Benedi V.J.: Interaction between complement subcomponent C1q and the *Klebsiella pneumoniae* porin OmpK36. *Infect. Immun.*, 1996; 64: 4719–4725
- [2] Almogren A., Senior B.W., Loomes L.M., Kerr M.A.: Structural and functional consequences of cleavage of human secretory and human serum immunoglobulin A1 by proteinases from *Proteus mirabilis* and *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 3349–3356
- [3] Aoyagi Y., Adderson E.E., Min J.G., Matsushita M., Fujita T., Takahashi S., Okuwaki Y., Bohnsack J.F.: Role of L-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes in the opsonophagocytosis of type III group *B streptococci*. *J. Immunol.*, 2005; 174: 418–425
- [4] Apicella M.A., Mandrell R.E., Shero M., Wilson M.E., Griffiss J.M., Brooks G.F., Lamell C., Breen J.F., Rice P.A.: Modification by sialic acid of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide epitope expression in human urethral exudates: an immunoelectron microscopic analysis. *J. Infect. Dis.*, 1990; 162: 506–512
- [5] Arlaud G.J., Barlow P.N., Gaboriaud C., Gros P., Narayana S.V.: Deciphering complement mechanisms: the contributions of structural biology. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3809–3822
- [6] Artymiuk P.J., Blake C.C., Grace D.E., Oatley S.J., Phillips D.C., Sternberg M.J.: Crystallographic studies of the dynamic properties of lysozyme. *Nature*, 1979; 280: 563–568
- [7] Batten M.R., Senior B.W., Kilian M., Woolf J.M.: Amino acid sequence requirements in the hinge of human immunoglobulin A1 (IgA1) for cleavage by streptococcal IgA1 proteases. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 1462–1469
- [8] Bąk-Romaniszyn L., Cedzyński M., Szemraj J., Świerzek A.S., Zeman K., Kałużyński A., Płaneta-Malecka I.: Mannan-binding lectin in children with chronic gastritis. *Scand. J. Immunol.*, 2006; 63: 131–135
- [9] Becherer J.D., Alsenz J., Lambris J.D.: Molecular aspects of C3 interactions and structural/functional analysis of C3 from different species. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1990; 153: 45–72

- [10] Bugła-Płoskońska G., Cisowska A., Karpińska K., Jankowski S., Doroszkiewicz W.: The mechanisms of activation of normal human serum complement by *Escherichia coli* strains with K1 surface antigen. *Folia Microbiol.*, 2006; 51: 627–632
- [11] Bugła-Płoskońska G., Doroszkiewicz W.: Bactericidal activity of normal bovine serum (NSB) directed against some *Enterobacteriaceae* with sialic acid-containing lipopolysaccharides (LPS) as a component of cell wall. *Pol. J. Microbiol.*, 2006; 55: 169–174
- [12] Bugła-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołocho B., Doroszkiewicz W.: Cooperation between lysozyme and complement system in bactericidal action of human serum – is everything already clear? *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2008; 33: 37–42
- [13] Bugła-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołocho B., Doroszkiewicz W.: Killing of Gram-negative bacteria with normal human serum and normal bovine serum: use of lysozyme and complement proteins in the death of *Salmonella* strains O48. *Microb. Ecol.*, 2009; 58: 276–289
- [14] Bugła-Płoskońska G., Kiersnowski A., Futoma-Kołocho B., Doroszkiewicz W.: Serum as an environment to live or not to live for Gram-negative bacteria: relationship between lysozyme and complement system in killing *Salmonella* O48 strain. W: *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, red. A. Mendez-Vilas. World Scientific Publishing Co.Pte.Ltd, Singapore 2009, 523–527
- [15] Callewaert L., Aertsen A., Deckers D., Vanoirbeek K.G., Vanderkelen L., Van Herreweghe J.M., Masschalck B., Nakimbugwe D., Robben J., Michiels C.W.: A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000019
- [16] Callewaert L., Masschalck B., Deckers D., Nakimbugwe D., Atanassova M., Aertsen A., Michiels C.W.: Purification of Ivy, a lysozyme inhibitor from *Escherichia coli*, and characterisation of its specificity for various lysozymes. *Enz. Microb. Technol.*, 2005; 37: 205–211
- [17] Cedzyński M., Madaliński K., Gregorek H., Świerzko A.S., Nowicka E., Obtulowicz K., Dzierżanowska-Fangrat K., Wojda U., Rabczenko D., Kawakami M.: Possible disease-modifying factors: the mannann-binding lectin pathway and infections in hereditary angioedema of children and adults. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2008; 56: 69–75
- [18] Cisowska A., Tichaczek-Goska D., Goska W.: Aktywność przeciwciała ludzkiej lektyny wiążącej mannozę (MBL). *Post. Mikrobiol.*, 2007; 46: 249–261
- [19] Clark A., Weymann A., Hartman E., Turmelle Y., Carroll M., Thurman J.M., Holers V.M., Hourcade D.E., Rudnick D.A.: Evidence for non-traditional activation of complement factor C3 during murine liver regeneration. *Mol. Immunol.*, 2008; 45: 3125–3132
- [20] Cunningham M.W.: Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2000; 13: 470–511
- [21] Davis C.A., Vallota E.H., Forristal J.: Serum complement levels in infancy: age related changes. *Pediatr. Res.*, 1979; 13: 1043–1046
- [22] Devine D.A., Roberts A.P.: K1, K5 and O antigens of *Escherichia coli* in relation to serum killing via the classical and alternative complement pathways. *J. Med. Microbiol.*, 1994; 41: 139–144
- [23] Devyatayrova-Johnson M., Rees I.H., Robertson B.D., Turner M.W., Klein N.J., Jack D.L.: The lipopolysaccharide structures of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Neisseria gonorrhoeae* determine the attachment of human mannose-binding lectin to intact organisms. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 3894–3899
- [24] Doonan S.: Białka i peptydy. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008
- [25] Dumestre-Pérard C., Doerr E., Colomb M.G., Loos M.: Involvement of complement pathways in patients with bacterial septicemia. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 1631–1638
- [26] Düring K., Porsch P., Mahn A., Brinkmann O., Gieffers W.: The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Lett.*, 1999; 449: 93–100
- [27] Epstein R.J.: *Biologia molekularna człowieka. Molekularne podłoże zjawisk w stanie zdrowia i przebiegu chorób.* Wydawnictwo CZELEJ, Lublin 2005
- [28] Estabrook M.M., Griffiss J.M., Jarvis G.A.: Sialylation of *Neisseria meningitidis* lipooligosaccharide inhibits serum bactericidal activity by masking lacto-N-neotetraose. *Infect. Immun.*, 1997; 65: 4436–4444
- [29] Exley R.M., Shaw J., Mowe E., Sun Y.H., West N.P., Williamson M., Botto M., Smith H., Tang C.M.: Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J. Exp. Med.*, 2005; 201: 1637–1645
- [30] Facon M.J., Skura B.J.: Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella enteritidis*. *Intern. Dairy J.*, 1996; 6: 303–313
- [31] Falkow S., Isberg R.R., Portnoy D.A.: The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 1992; 8: 333–363
- [32] Feingold D.S., Goldman J.N., Kuritz H.M.: Locus of the action of serum and the role of lysozyme in the serum bactericidal reaction. *J. Bacteriol.*, 1968; 96: 2118–2126
- [33] Ferriani V.P., Barbosa J.E., de Carvalho I.F.: Complement haemolytic activity (classical and alternative pathways), C3, C4 and factor B titres in healthy children. *Acta Paediatr.*, 1999; 88: 1062–1066
- [34] Frisk A., Ahmed H.J., Van Dyck E., Lagergard T.: Antibodies specific to surface antigens are not effective in complement-mediated killing of *Haemophilus ducreyi*. *Microb. Pathog.*, 1998; 25: 67–75
- [35] Fudala R., Doroszkiewicz W., Niedbach J., Gamian A., Weintraub A., Kaca W.: The factor C3 conversion in human complement by smooth *Shigella flexneri* lipopolysaccharide. *Acta Microbiol. Pol.*, 2003; 52: 45–52
- [36] Futoma B., Bugła-Płoskońska G., Doroszkiewicz W.: Bactericidal complement activity against *Salmonella enterica* strains. *Pol. J. Env. Stud.*, 2005; 14: 101–104
- [37] Garlatti V., Belloy N., Martin L., Lacroix M., Matsushita M., Endo Y., Fujita T., Fontecilla-Camps J.C., Arlaud G.J., Thielens N.M., Gaboriaud C.: Structural insights into the innate immune recognition specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J.*, 2007; 26: 623–633
- [38] Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W.: *Immunologia.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004
- [39] Harmat V., Gál P., Kardos J., Szilágyi K., Ambrus G., Véghe B., Náray-Szabó G., Závodszy P.: The structure of MBL-associated serine protease-2 reveals that identical substrate specificities of C1s and MASP-2 are realized through different sets of enzyme-substrate interactions. *J. Mol. Biol.*, 2004; 342: 1533–1546
- [40] Herzberger P., Siegel C., Skerka C., Fingerle V., Schulte-Spechtel U., van Dam A., Wilske B., Brade V., Zipfel P.F., Wallich R., Kraiczky P.: Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect. Immun.*, 2007; 75: 4817–4825
- [41] Hornef M.W., Wick M.J., Rhen M., Normark S.: Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, 2002; 3: 1033–1040
- [42] Huber R., Scholze H., Pâques E.P., Deisenhofer J.: Crystal structure analysis and molecular model of human C3a anaphylatoxin. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1980; 361: 1389–1399
- [43] Hume E.B., Willcox M.D.: Survival of *Serratia marcescens* in the presence of complement. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2001; 13: 55–62
- [44] Inzana T.J., Glindemann G., Cox A.D., Wakarchuk W., Howard M.D.: Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 4870–4879
- [45] Jack D.L., Klein N.J., Turner M.W.: Mannose-binding lectin: targeting the microbial world for complement attack and opsonophagocytosis. *Immunol. Rev.*, 2001; 180: 86–99
- [46] Jankowski S.: Mechanizmy obronne chroniące bakterie Gram-ujemne przed bakteriobójczym działaniem dopełniacza. *Post. Mikrobiol.*, 1995; 34: 23–44
- [47] Jankowski S.: Rola dopełniacza w odporności na zakażenia pierwotniakami. *Wiad. Parazyt.*, 1997; 43: 369–383
- [48] Jankowski S., Grzybek-Hrynczewicz K.: Znaczenie bakteriobójczego działania dopełniacza w odporności na zakażenia bakteriami Gram-ujemnymi. *Post. Med. Klin. Dośw.*, 1995; 4: 479–490
- [49] Janssen B.J., Christodoulidou A., McCarthy A., Lambris J.D., Gros P.: Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature*, 2006; 444: 213–216
- [50] Jarva H., Ram S., Vogel U., Blom A.M., Meri S.: Binding of the complement inhibitor C4bp to serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J. Immunol.*, 2005; 174: 6299–6307
- [51] Joiner K.A., Hammer C.H., Brown E.J., Cole R.J., Frank M.M.: Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. I. Terminal complement components are deposited and released from *Salmonella minnesota* S218 without causing bacterial death. *J. Exp. Med.*, 1982; 155: 797–808
- [52] Jongerijs I., Köhl J., Pandey M.K., Ruyken M., van Kessel K.P., van Strijp J.A., Rooijackers S.H.: *Staphylococcal* complement evasion by various convertase-blocking molecules. *J. Exp. Med.*, 2007; 204: 2461–2471

- [53] Kaca W., Literacka E., Sjöholm A.G., Weintraub A.: Complement activation by *Proteus mirabilis* negatively charged lipopolysaccharides. *J. Endotoxin Res.*, 2000; 6: 223–234
- [54] Kang Y.S., Do Y., Lee H.K., Park S.H., Cheong C., Lynch R.M., Loeffler J.M., Steinman R.M., Park C.G.: A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell*, 2006; 125: 47–58
- [55] Kelly P., Jack D.L., Naeem A., Mandanda B., Pollok R.C., Klein N.J., Turner M.W., Farthing M.J.: Mannose-binding lectin is a component of innate mucosal defense against *Cryptosporidium parvum* in AIDS. *Gastroenterology*, 2000; 119: 1236–1242
- [56] Kern I.: Wydzielanie do środowiska białek z komórek bakterii Gram-ujemnych. *Post. Mikrobiol.*, 1996; 35: 381–405
- [57] Kirkitadze M.D., Barlow P.N.: Structure and flexibility of the multiple domain proteins that regulate complement activation. *Immunol. Rev.*, 2001; 180: 146–161
- [58] Kraiczy P., Hartmann K., Corvey C., Skera C., Kirschfink M., Karas M., Brade V., Miller J.C., Stevenson B., Zipfel P.F., Wallich R.: Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: interaction of BBCRASP-2 with complement regulators factor H and FHL-1. 1st Joint Meeting of European National Societies of Immunology. 16th European Congress of Immunology, Paris, France, 2006
- [59] Kumagai I., Sunada F., Takeda S., Miura K.: Redesign of the substrate-binding site of hen egg white lysozyme based on the molecular evolution of C-type lysozymes. *J. Biol. Chem.*, 1992; 267: 4608–4612
- [60] Landschoot A., Coorevits A., De Vos P., Villa A.: Hen egg white lysozyme as an antibacterial agent in the brewing industry. *Book of Abstracts II Conference on Environmental, Industr. Appl. Microbiol.*, 2007; 366
- [61] Lasek W.: Immunologia. Podstawowe zagadnienia i aktualności. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009
- [62] Li K., Sacks S.H., Zhou W.: The relative importance of local and systemic complement production in ischaemia, transplantation and other pathologies. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3866–3874
- [63] Loomes L.M., Senior B.W., Kerr M.A.: Proteinases of *Proteus spp.*: purification, properties, and detection in urine of infected patients. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2267–2273
- [64] Lutz H.U., Fumia S., Schurtenberger C., Alaia V.: Stimulation of complement amplification or activation of the alternative pathway of complement? *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3862–3865
- [65] Lynch N.J., Roscher S., Hartung T., Morath S., Matsushita M., Maennel D.N., Kuraya M., Fujita T., Schwaebler W.J.: L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J. Immunol.*, 2004; 172: 1198–1202
- [66] Madico G., Welsch J.A., Lewis L.A., McNaughton A., Perlman D.H., Costello C.E., Ngampasutadol J., Vogel U., Granoff D.M., Ram S.: The meningococcal vaccine candidate GNA1870 binds the complement regulatory protein factor H and enhances serum resistance. *J. Immunol.*, 2006; 177: 501–510
- [67] Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I.: *Immunology*, 7th edition, Mosby Elsevier, 2006
- [68] Martinez R.J., Carroll S.F.: Sequential metabolic expressions of the lethal process in human serum-treated *Escherichia coli*: role of lysozyme. *Infect. Immun.*, 1980; 28: 735–745
- [69] Masschalck B., Van Houdt R., Van Haver E.G., Michiels C.W.: Inactivation of gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme, and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67: 339–344
- [70] Matsushita M., Fujita T.: Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol. Rev.*, 2001; 180: 78–85
- [71] Matsushita M., Matsushita A., Endo Y., Nakata M., Kojima N., Mizuuchi T., Fujita T.: Origin of the classical complement pathway: Lamprey orthologue of mammalian C1q acts as a lectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 10127–10131
- [72] Merino S., Camprubi S., Alberti S., Benedi V.J., Tomás J.M.: Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect. Immun.*, 1992; 60: 2529–2535
- [73] Mielnik G., Doroszkiewicz W., Korzeniowska-Kowal A.: Struktury zewnętrzne bakterii Gram-ujemnych a bakteriobójcza aktywność dopełniacza. *Post. Mikrobiol.*, 2004; 43: 39–57
- [74] Mokracka-Latajka G., Jankowski S., Grzybek-Hrynciewicz K., Krzyżanowska B.: The mechanism of bactericidal action of normal human serum against *Salmonella* rods. *Acta Microbiol. Pol.*, 1996; 45: 169–180
- [75] Mold C.: Role of complement in host defense against bacterial infection. *Microbes Infect.*, 1999; 1: 633–638
- [76] Mollnes T.E., Jokiranta T.S., Truedsson L., Nilsson B., Rodriguez de Cordoba S., Kirschfink M.: Complement analysis in the 21st century. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3838–3849
- [77] Morgan B.P.: Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit. Rev. Immunol.*, 1999; 19: 173–198
- [78] Mudgil P., Torres M., Millar T.J.: Adsorption of lysozyme to phospholipid and meibomian lipid monolayer films. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2006; 48: 128–137
- [79] Nagar B., Jones R.G., Diefenbach R.J., Isenman D.E., Rini J.M.: X-ray crystal structure of C3d: a C3 fragment and ligand for complement receptor 2. *Science*, 1998; 280: 1277–1281
- [80] Namieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P.: Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym. CEEAM Politechnika Gdańska, Gdańsk 2003
- [81] Nawrot U., Mokracka-Latajka G., Grzybek-Hrynciewicz J., Krzyżanowska B., Jankowski S.: Bactericidal activity of normal human serum against *Morganella*, *Proteus*, and *Providencia* strains. *Acta Microbiol. Pol.*, 1995; 44: 55–61
- [82] Nelson B.W., Roantree R.J.: Analyses of lipopolysaccharides extracted from penicillin-resistant, serum-sensitive *Salmonella* mutants. *J. Gen. Microbiol.*, 1967; 48: 179–188
- [83] Nowak J.Z., Waszczyk M.: Rola zapalenia i układu dopełniacza w etiopatogenezie zwyrodnienia płamki związanego z wiekiem. *Mag. Okul.*, 2006; 3: 142–151
- [84] Ogundele M.O.: A novel anti-inflammatory activity of lysozyme: modulation of serum complement activation. *Mediators Inflamm.*, 1998; 7: 363–365
- [85] O'Hara A.M., Moran A.P., Wurzner R., Orren A.: Complement-mediated lipopolysaccharide release and outer membrane damage in *Escherichia coli* J5: requirement for C9. *Immunology*, 2001; 102: 365–372
- [86] Patarakul K., Cole M.F., Hughes C.A.: Complement resistance in *Borrelia burgdorferi* strain 297: outer membrane proteins prevent MAC formation at lysis susceptible sites. *Microb. Pathog.*, 1999; 27: 25–41
- [87] Ram S., Sharma A.K., Simpson S.D., Gulati S., McQuillen D.P., Pangburn M.K., Rice P.A.: A novel sialic acid binding site on factor H mediates serum resistance of sialylated *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.*, 1998; 187: 743–752
- [88] Rautemaa R., Jarvis G.A., Marnila P., Meri S.: Acquired resistance of *Escherichia coli* to complement lysis by binding of glycoposphoinositol-anchored protectin (CD59). *Infect. Immun.*, 1998; 66: 1928–1933
- [89] Rautemaa R., Rautelin H., Puolakkainen P., Kokkola A., Kärkkäinen P., Meri S.: Survival of *Helicobacter pylori* from complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). *Gastroenterology*, 2001; 120: 470–479
- [90] Roos A., Bouwman L.H., van Gijlswijk-Janssen D.J., Faber-Krol M.C., Stahl G.L., Daha M.R.: Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J. Immunol.*, 2001; 167: 2861–2868
- [91] Różalski A.: Czynniki chorobotwórczości pałeczek z rodzaju *Proteus*. *Post. Mikrobiol.*, 1992; 31: 205–224
- [92] Różalski A., Sidorczyk Z., Kotelko K.: Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1997; 61: 65–89
- [93] Schiller N.L., Alazard M.J., Borowski R.S.: Serum sensitivity of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. *Infect. Immun.*, 1984; 45: 748–755
- [94] Seelen M.A., Roos A., Wieslander J., Mollnes T.E., Sjöholm A.G., Wurzner R., Loos M., Tedesco F., Sim R.B., Garred P., Alexopoulos E., Turner M.W., Daha M.R.: Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J. Immunol. Methods*, 2005; 296: 187–198
- [95] Selander B., Martensson U., Weintraub A., Holmström E., Matsushita M., Thiel S., Jensenius J.C., Truedsson L., Sjöholm A.G.: Mannan-binding lectin activates C3 and the alternative complement pathway without involvement of C2. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 1425–1434
- [96] Severi E., Hood D.W., Thomas G.H.: Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiol.*, 2007; 153: 2817–2822
- [97] Schnaitman C.A.: Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1971; 108: 553–563

- [98] Smykał-Jankowiak K., Niemir Z.I.: Budowa i funkcja C1q składowej dopełniacza oraz jej znaczenie w rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 134–141
- [99] Steinrauf L.K., Shiuan D., Yang W.J., Chiang M.Y.: Lysozyme association with nucleic acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999; 266: 366–370
- [100] Takahashi K., Shi L., Gowda L.D., Ezekowitz R.A.: Relative roles of complement factor 3 and mannan-binding lectin in host defense against infection. *Infect. Immun.*, 2005; 73: 8188–8193
- [101] Tan S.M., Chung M.C., Kon O.L., Thiel S., Lee S.H., Lu J.: Improvements on the purification of mannan-binding lectin and demonstration of its Ca²⁺-independent association with a C1s-like serine protease. *Biochem. J.*, 1996; 319: 329–332
- [102] Taylor P.W.: Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1983; 47: 46–83
- [103] Thiel S.: Complement activating soluble pattern recognition molecules with collagen-like regions, mannan-binding lectin, ficolins and associated proteins. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3875–3888
- [104] Tokarz-Deptuła B., Niedźwiedzka P., Deptuła W.: Surowiczy lizozym (LZM) u królików eksperymentalnie zakażonych czterema polskimi szczepami RHDV (rabbit haemorrhagic disease virus). 8th Conf. Molecular Biology in Diagnostics Infectious Diseases and Biotechnology. Wyd. SGGW, Warszawa, 2005; 132–136
- [105] Toma C., Honma Y., Iwanaga M.: Effect of *Vibrio cholerae* non-O1 protease on lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin A. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1996; 135: 143–147
- [106] Vogel U., Claus H., Heinze G., Frosch M.: Functional characterization of an isogenic meningococcal -2,3-sialyltransferase mutant: the role of lipooligosaccharide sialylation for serum resistance in serogroup B meningococci. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1997; 186: 159–166
- [107] Witholt B., Heerikhuizen H.V., De Leij L.: How does lysozyme penetrate through the bacterial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta*, 1976; 443: 534–544
- [108] Wojnicz D., Bar J., Jankowski S.: Rola błonowych glikoprotein CD46, CD55 i CD59 w ochronie komórek nowotworowych przed litycznym działaniem dopełniacza. *Post. Hig. Med. Dośw.*, 2002; 56: 603–616
- [109] Wojnicz D., Jankowski S.: MBP - białko wiążące mannozę i jego rola w odporności przeciwwzakaźnej. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2000; 9: 261–274
- [110] Wojnicz D., Jankowski S.: Białko CD59 – charakterystyka i jego rola w ochronie komórek przed działaniem dopełniacza. *Post. Mikrobiol.*, 2000; 39: 37–53
- [111] Wolska K., Bukowski K., Anusz Z., Jakubczak A.: Bakteriobójcza aktywność surowicy ludzkiej, świńskiej i bydłowej wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 1999; 51: 339–345
- [112] Woźniak G.: Bakteryjne białka wiążące immunoglobuliny – zastosowanie tych białek w immunotechnologii. *Post. Mikrobiol.*, 1994; 33: 119–128
- [113] Würzner R.: Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. *Mol. Immunol.*, 1999; 36: 249–260
- [114] Yuan B., Xing L.L., Zhang Y.D., Lu Y., Luo Y.Y., Mai Z.H., Li M.: Penetration and saturation of lysozyme in phospholipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.*, 2007; 111: 6151–6155
- [115] Zipfel P.F., Würzner R., Skerka C.: Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol. Immunol.*, 2007; 44: 3850–3857
- [116] Zuiderweg E.R., Nettlesheim D.G., Mollison K.W., Carter G.W.: Tertiary structure of human complement component C5a in solution from nuclear magnetic resonance data. *Biochemistry*, 1989; 28: 172–185

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.