

На правах рукописи

АЛЕШИНА

Галина Матвеевна

**АНТИМИКРОБНЫЕ КАТИОННЫЕ ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ ВРОЖДЕННОГО
ИММУНИТЕТА КАК ЭФФЕКТОРНЫЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ МОЛЕКУЛЫ
ЗАЩИТНЫХ ФУНКЦИЙ ОРГАНИЗМА**

14.03.03 – патологическая физиология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в Отделе общей патологии и патологической физиологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины»

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, академик РАН
доктор биологических наук, профессор

Корнева Елена Андреевна
Кокряков Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

1) **Шпаков Александр Олегович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эндокринологии и нейрохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

2) **Линькова Наталья Сергеевна** – доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией молекулярных механизмов старения автономной научной некоммерческой организации высшего образования научно-исследовательский центр «Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии»

3) **Черныш Сергей Иванович** – доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофармакологии и иммунологии насекомых биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России

Защита состоится «___» _____ 2020 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д.001.022.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 69-71.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12 и на сайте <https://iemspsb.ru/science/diss/diss001-022-02/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного
совета Д 001.022.02, д.м.н.

Киселева Екатерина Прохоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Важной проблемой современной патологической физиологии является расшифровка молекулярных механизмов реализации и регуляции защитно-приспособительных функций. Развитие любого заболевания, возникающего в результате снижения устойчивости организма к патогенным факторам, связано с нарушением врожденных и адаптивных механизмов защиты. Выявление природы таких нарушений, молекулярных факторов, вовлеченных в регуляцию защитных функций при воспалении и стрессе, открывает новые пути и возможности для коррекции этих нарушений и, таким образом, лечения заболеваний различной природы [Корнева и др., 2010, 2017].

Невосприимчивость человека и животных к патогенам определяется в первую очередь совокупностью биохимических механизмов врожденного иммунитета, ответственных за распознавание, умерщвление и элиминирование потенциально опасных микроорганизмов. В ходе эволюции возникли специальные рекогносцировочные и эффекторные молекулярные факторы, обеспечивающие защиту организма от инфекций. Функции эффекторных молекул выполняют антимикробные (антибиотические) пептиды и белки (АМПБ) – дефенсины, кателицидины, пероксидазы, лактоферрин, лизоцим и др. [Кокряков, 1999].

Несмотря на то, что история изучения эндогенных антибиотических соединений насчитывает более ста лет, систематический интерес к ним возник в последние десятилетия, когда появилась проблема устойчивости патогенов к конвенциональным антибиотикам. По сравнению с обычными антибиотиками, которые, как правило, воздействуют на одну мишень, АМПБ, благодаря своей амфипатичности и положительному заряду, потенциально имеют множество мишеней, что затрудняет развитие к ним резистентности при использовании их в качестве фармакологических препаратов.

Кроме непосредственно антибиотического действия для некоторых АМПБ показано свойство связывать эндотоксины или липополисахариды (ЛПС) бактериальных клеточных стенок, которые являются ведущими патогенетическими факторами, запускающими каскад реакций системного воспаления, приводящего к такому серьезному осложнению как эндотоксиновый шок. Лечение эндотоксинового шока путем антицитокиновой и инсулиновой терапии в сочетании с низкими дозами кортикостероидов и использованием активированного белка С в настоящее время не дает ожидаемого полного терапевтического эффекта. Поэтому на протяжении последних двадцати лет поиск веществ, эффективно нейтрализующих эндотоксины и способствующих их элиминации в организме человека и животных, является актуальной медико-биологической задачей.

Благодаря своим антимикробным и ЛПС-нейтрализующим свойствам АМПБ могут рассматриваться как перспективные объекты для применения в медицине и ветеринарии в качестве основы для создания антибиотических и противовоспалительных препаратов нового поколения.

Необходимо отметить, что АМПБ присутствуют во всех живых организмах, как у животных, так и у растений. Они являются древнейшей частью иммунной системы и эволюционировали вместе с ней, вовлекаясь в функционирование систем, как связанных, так и не связанных напрямую с антимикробной защитой. Спектр АМПБ отличается значительным разнообразием у разных таксономических групп животных. Можно предположить, что такое разнообразие вызвано, в частности особенностями экологических ниш, которые занимают организмы, особенностями питания, различным спектром как потенциальных патогенов, так и микроорганизмов составляющих нормальную микробиоту организма [Voman, 1995]. С другой стороны, возможно, в ходе эволюции происходило закрепление свойств АМПБ как регуляторов других защитных реакций у высших животных.

Так, установлено участие АМПБ в регуляции иммунного ответа. Показано, что сериновые протеиназы могут расщеплять молекулы, вовлеченные в активацию Т-клеток, в частности, CD25 [Bank et al., 1999]. Миелопероксидаза (МПО) ингибирует активацию и миграцию дендритных клеток [Odobasic et al., 2013]. Есть данные, показывающие стимулирующее действие МПО на ДНК-связывающую активность NFκB на культурах человеческих альвеолярных клеток (A549) и моноцитов (THP1) [Nys et al., 2002, 2005]. Некоторые β-дефенсины мыши и человека являются хемоаттрактантами для незрелых дендритных клеток и Т-клеток памяти и могут способствовать созреванию дендритных клеток [Yang et al., 2002]. Кателицидин человека – пептид LL37, являясь хемоаттрактантной молекулой для нейтрофилов, моноцитов, макрофагов, тучных клеток и некоторых Т-лимфоцитов, может способствовать мобилизации клеток иммунной системы в индуктивную фазу адаптивного иммунного ответа. Важно, что на всех рассмотренных клетках иммунной системы выявлен рецептор FPRL-1 (formyl peptide recceptor-like 1), с которым избирательно связывается LL-37 [Yang, et al. 2000]. Таким образом, появляется все больше данных в пользу того, что АМПБ могут реализовать свои эффекты по принципу лиганд-рецепторных взаимодействий. Особый интерес представляют данные о подавляющем влиянии некоторых дефенсинов на стероидогенез клетками коркового слоя надпочечников, индуцированный адренкортикотропным гормоном (АКТГ) *in vitro* [Solomon, 1993], а также АКТГ- и стресс-индуцированную продукцию глюкокортикоидов и иммуносупрессию *in vivo*. Это дает основание рассматривать дефенсины в качестве медиаторов нейроэндокриноиммунных взаимодействий [Шамова и др., 1993; Korneva et al., 1997].

Таким образом, открытие новых антибиотических пептидов (в том числе новых структурных групп пептидов) животных, принадлежащих к различным таксономическим группам, определение их аминокислотных последовательностей и структуры генов, изучение особенностей их антимикробного, противовоспалительного и иммуномодулирующего действия расширяет наши знания о становлении механизмов врожденного иммунитета в ходе эволюции, вовлеченности

их в регуляцию других защитных функций и позволяет разработать подходы к созданию на основе этих пептидов новых медицинских и ветеринарных препаратов.

Степень разработанности темы.

Большая часть исследований антимикробных белков и пептидов связана с их антибиотическим действием, расшифровкой механизмов такого действия и возможности их аппликации в качестве прототипов новых лекарственных препаратов. Активно изучается возможность антимикробных пептидов противостоять образованию биопленок бактерий [Andrea et al., 2018]. Показано, что дефенсины человека и белок лактоферрин могут умерщвлять грибковые клетки по механизму, аналогичному апоптозу высших эукариот [Yount et al., 2009; Andrés et al., 2016]. Цитотоксическое действие антимикробных пептидов на эукариотические клетки вызвало интерес к ним и как к потенциальным противоопухолевым агентам [Shamova et al., 2007].

Как упоминалось, благодаря своим ЛПС-нейтрализующим свойствам АМПБ рассматриваются как возможные препараты для борьбы с септическими осложнениями. Исследования, проводимые с использованием экспериментальных моделей на животных, дают обнадеживающие результаты в отношении многих эндогенных антибиотических пептидов – θ -дефенсинов макак-резуса [Schaal et al., 2012], β -дефенсина человека DEFB123 [Motzkus et al., 2006], кателицидина овцы SMAP-29 [Giacometti et al., 2004], фрагментов антибиотических белков (лактоферрина и др.) [Brandenburg et al., 2011]. Механизм такого действия остается до конца не установленным. Вопрос о том, является ли противовоспалительное действие АМПБ прямым следствием ЛПС-связывающей активности, и какие пептиды проявляют оптимальный набор свойств в качестве потенциального противовоспалительного препарата остается открытым. Дополнительные возможности для реализации механизмов противосептического действия АМПБ показывают данные экспериментов, демонстрирующих сходные эффекты некоторых нейропептидов. В частности, введение орексинов [Ogawa et al., 2016] и урокортина II [Campos-Salinas et al., 2013] снижает смертность экспериментальных животных от септического шока. Также оба этих нейропептида проявляют антимикробную активность в условиях *in vitro* [Ohta et al., 2011; Campos-Salinas et al., 2013]. Важно отметить, что орексины и урокортин II представляют собой катионные амфипатические полипептиды, именно такие же физико-химические свойства характерны и для большинства эндогенных антибиотических пептидов. Но вовлеченность эндогенных АМПБ в нейроэндокриноиммунную регуляцию практически не исследована, кроме упомянутых ранее работ о подавлении некоторыми дефенсинами, названными кортикостатинами, АКТГ-индуцированного стероидогенеза клетками коркового слоя надпочечников *in vitro* [Solomon, 1993], а также АКТГ- и стресс-индуцированной продукции глюкокортикоидов и иммуносупрессии *in vivo* [Шамова и др., 1993; Korneva et al., 1997].

Цель исследования – установить степень и механизмы участия антимикробных пептидов и белков (АМПБ) фагоцитов человека и животных в реализации и регуляции защитных функций организма в качестве эффекторных и регуляторных молекул.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделить в чистом виде новые антимикробные пептиды (АМП) из фагоцитов животных, стоящих далеко друг от друга на эволюционной лестнице – лейкоцитов обезьян (*Macaca mulatta*, *Papio hamadryas*), целомоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*).

2. Изучить антимикробные свойства выделенных АМП в модельных системах *in vitro*. Провести структурный анализ выделенных соединений: установить первичную аминокислотную последовательность и структуру их генов.

3. Получить антитела к отдельным АМПБ человека (лактоферрин, миелопероксидаза) и лабораторных животных (дефенсины) и разработать на их основе иммуноферментные тест-системы для количественного определения содержания этих соединений в биологических жидкостях и тканях.

4. Изучить модулирующее действие дефенсинов, некоторых кателицидинов (протегрины, PR39, профенин) и вновь выделенных пептидов на ЛПС-стимулированную экспрессию генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в клетках мононуклеарных фагоцитов в условиях *in vivo* и *in vitro*.

5. Исследовать влияние АМП (дефенсинов, кателицидинов) на продукцию супероксидного радикала клетками крови в условиях *in vivo* и *in vitro*.

6. Изучить эффекты действия дефенсинов крысы и лактоферрина человека на экспрессию генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в клетках селезенки, уровень глюкокортикоидных гормонов в крови и изменение клеточного состава крови у экспериментальных животных, подвергнутых стрессирующему воздействию.

7. Исследовать количественное содержание лактоферрина и миелопероксидазы в биологических жидкостях и тканях человека при туберкулезе и травматической болезни и выявить изменения, характерные для конкретных видов патологии и представляющие интерес для дифференциальной диагностики и прогноза течения заболевания.

Научная новизна работы:

Впервые из лейкоцитов макак-резуса *Macaca mulatta* выделены и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды (АМП), относящиеся к семейству дефенсинов – θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3. Впервые показано, что циклические θ -дефенсины (RTD-2, RTD-3, RTD-1) представляют собой продукты посттрансляционной системы формирования разнообразия первичных структур антимикробных белково-пептидных соединений, основанной на сочетании процессинга и пептидной рекомбинации. В

данном случае, в образовании трех молекул антимикробных пептидов участвуют только два гена.

Из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas* выделены и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые АМП, относящиеся к семейству дефенсинов – α -дефенсины PHD1, PHD2, PHD3 и θ -дефенсины PhTD-1 и PhTD-3.

Выделены и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые АМП из целомочитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*) – ареницины, относящиеся к новому структурному семейству антимикробных пептидов.

Впервые показано, что в условиях целостного организма введение АМП (протегрин-1, профенин-1, PR39) снижает ЛПС-индуцированную экспрессию гена интерлейкина 1 (ИЛ-1 β) в мононуклеарных клетках крови крыс.

Впервые продемонстрировано, что введение ЛФ человека и дефенсинов крысы RatNP-1 и RatNP-3 экспериментальным животным (крысам) снижает стресс-индуцированный подъем кортикостерона в крови, оказывает нормализующее действие на индуцированные стрессом изменения клеточного состава крови крыс и модулирует стресс-индуцированные изменения экспрессии генов цитокинов и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках селезенки. Впервые показано, что эндогенные дефенсины участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции.

Получены приоритетные данные о характерных изменениях содержания ЛФ и МПО в биологических жидкостях у пациентов с различными видами инфекционной (туберкулез) и неинфекционной (травмы) патологии.

Теоретическое и практическое значение.

Открытие новых антибиотических пептидов (в том числе новых структурных групп пептидов) животных, принадлежащих к различным таксономическим группам, определение их первичных аминокислотных последовательностей и структуры генов, изучение особенностей антибиотического действия расширяют наши знания о становлении механизмов врожденного иммунитета в ходе эволюции.

Данные, показывающие, что введение ЛФ человека и дефенсинов крысы RatNP-3 и RatNP-1 снижает стресс-индуцированный подъем кортикостерона в крови животных и модулирует стресс-индуцированные изменения экспрессии генов цитокинов и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках селезенки указывают на то, что молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета вовлечены не только в противоинфекционную защиту, но и в более широкий круг защитных реакций, а антимикробные пептиды и белки могут функционировать как эндогенные иммуномодуляторы и адаптогены.

Кроме теоретического интереса, связанного с проблемой становления, реализации и регуляции механизмов врожденного иммунитета, полученные данные могут иметь важное практическое значение. Исследуемые антимикробные пептиды и белки являются перспективными объектами для применения в медицине и

ветеринарии в качестве антибиотиков, противовоспалительных препаратов и иммуномодуляторов нового поколения.

Выявление изменений в показателях врожденного иммунитета (внутри- и внеклеточного содержания АМПБ), характерных для конкретных видов патологии, могут быть использованы для дифференциальной диагностики, прогноза течения заболевания и оценки адекватности проводимого лечения, раскрытия звеньев патогенеза заболеваний.

Результаты работы защищены двумя патентами РФ: 1. Пептиды ареницины, выделенные из морского кольчатого червя *Arenicola marina*, обладающие антимикробным действием. Овчинникова Т.В., Алешина Г.М., Баландин С.В., Маркелов М.Л., Краснодембская А.Д., Кокряков В.Н. Патент на изобретение RU 2261866 10.02.2004; 2. Способ определения активности туберкулезного спондилита. Гусева В.Н., Керко О.В., Новикова Н.С., Алешина Г.М., Кокряков В.Н., Шендерова Р.И., Сушкова Е.А. Патент на изобретение RU 2308723 25.06.2004.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Открыты и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды, относящиеся к семейству дефенсинов – α -дефенсины PND1, PND2, PND3, θ -дефенсины PhTD-1 и PhTD-3 из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*, θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3 из лейкоцитов макак-резуса *Macaca mulatta* и антимикробные пептиды ареницины из целомоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*), относящиеся к новому структурному семейству антимикробных пептидов.

2. Введение АМП (дефенсины, протегрин-1, профенин-1, PR39) в условиях целостного организма снижает ЛПС-индуцированную экспрессию гена интерлейкина 1 в мононуклеарных клетках крови крыс, но усиливает продукцию супероксидного радикала (кроме профенина). Профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для создания на его основе эндотоксин-нейтрализующего препарата – связывает ЛПС с высокой аффинностью, нормализует ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов, не усиливает перекисное окисление.

3. Введение дефенсинов крысы RatNP-1 и RatNP-3 экспериментальным животным (крысам) снижает амплитуду стресс-индуцированного подъема кортикостерона в крови и оказывает нормализующее действие на стресс-индуцированные изменения клеточного состава крови и экспрессии генов цитокинов и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках селезенки. Эндогенные дефенсины участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции.

4. Введение ЛФ человека экспериментальным животным (крысам) снижает амплитуду стресс-индуцированного подъема кортикостерона в крови и оказывает нормализующее действие на стресс-индуцированные изменения клеточного состава крови и экспрессии генов цитокинов и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках

селезенки. Кортикостатическое действие лактоферрина человека зависит от аминокислотной последовательности в N-концевой области молекулы.

5. Данные о характерных изменениях содержания ЛФ и МПО в биологических жидкостях пациентов с различными видами патологии – туберкулезом, травмами, коррелируют с динамикой заболевания, дают возможность осуществлять дифференциальную диагностику и способствуют раскрытию звеньев патогенеза заболеваний.

Методология и методы исследования. В исследовании использован комплекс современных высокоинформативных патофизиологических, биохимических, молекулярно-биологических и иммунологических методов и адекватные задачам экспериментальные модели на целостном организме и выделенных клетках.

Личный вклад в проведенную работу

Личный вклад автора в работу заключается в самостоятельном планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их теоретическом обобщении. Статьи написаны или самим автором, или при активном его участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Данные, составляющие основное содержание работы и касающиеся получения новых пептидов, разработки иммуноферментных тест-систем, анализа содержания АМПБ в биологических жидкостях, исследования экспрессии генов, получены автором лично. Аминокислотные последовательности и структуры генов новых антибиотических пептидов определяли в совместных исследованиях с лабораториями профессора Р. Лерера (Prof. Robert Lehrer, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США), д.х.н., профессора Т.В. Овчинниковой (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН) и профессора Р. Хоффмана (Prof. Ralf Hoffmann, Университет г. Лейпцига, ФРГ).

Степень достоверности и апробация результатов работы.

Достоверность результатов обеспечена разнообразием применяемых методов, корректной обработкой данных методами статистического анализа.

Основные положения диссертации были представлены на VII Международном Симпозиуме “Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии”, 27–31 мая 2019 г., г. Санкт-Петербург, Россия; V Международном симпозиуме по антимикробным пептидам, 6-8 июня 2016 года, г. Монпелье, Франция; IV Европейском конгрессе иммунологов, 6-9 сентября 2015 года, г. Вена, Австрия; V Международном Симпозиуме “Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии”, 23–26 июня 2015 г., г. Санкт-Петербург, Россия; IX Конгрессе Международного общества по нейроиммуномодуляции, Льеж, Бельгия, 25-27 сентября, 2014; Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, 15–19 сентября 2014 г., г. Москва, Россия; IV Международном Симпозиуме “Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии”, 18–21 июня 2013 г., г. Санкт-Петербург, Россия; Объединенном иммунологическом форуме–2013, 30 июня – 5 июля 2013 г., Нижний Новгород,

Россия; 38-ом Конгрессе Федерации Европейских биохимических обществ, 6–11 июля 2013 г., г. Санкт-Петербург, Россия; XI Международной конференции по лактоферрину: структура, функции и применение, 6–10 октября 2013 г., г. Рим, Италия; Объединенном иммунологическом форуме, 30 июня–5 июля 2008 г., г. Санкт-Петербург, Россия; Международном Симпозиуме “Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии”, 31 мая – 2 июня 2007 г., г. Санкт-Петербург, Россия; IX Всероссийском научном форуме с международным участием им. акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 23-26 мая 2005 г., г. Санкт-Петербург, Россия

Публикации. По теме диссертации опубликовано 47 научных работ, из них 25 статей в журналах рекомендованных ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований, 14 из которых в изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования. Получены 2 патента на изобретение.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 283 страницах и содержит 70 рисунков, 26 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела материала и методов работы, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиографический указатель содержит 553 источника, в том числе 51 работа на русском и 502 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение и очистка АМП. Выделение пептидов из лейкоцитов крови обезьян (*Papio hamadryas* и *Macaca mulatta*), целомоцитов пескожила (*Arenicola marina*), человека, крысы и свиньи проводили по стандартной схеме, традиционно применяемой для выделения АМП, включающей экстракцию пептидов из фагоцитов в кислой среде, их фракционирование методами ультрафильтрации и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии [Kokryakov et al., 1993; Narwig et al., 1993]. Экстракцию АМП из клеток костного мозга макак-резуса проводили с помощью TRI-реагента и 5 н уксусной кислоты.

Определение молекулярных масс. Молекулярные массы пептидов определяли методом масс-спектрометрии на установках MALDI-TOF (Matrix Assisted Laserdesorbition Ionization–Time Of Flight), масс-спектрометр Voyager DE («Perseptive Biosystem Inc.», Framingham, MA, США) на базе ЦКП фонда ТВН, Санкт-Петербург, MALDI-TOF/TOF MS (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) в университете г. Лейпцига (ФРГ), MALDI-масс-спектрометре Vision 2000 (ThermoBioAnalysis, США) в институте Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (г. Москва).

Определение первичных структур. Определение аминокислотной последовательности ареницинов было выполнено методом деградации по Эдману на

автоматическом секвенаторе Procise cLC 491 Protein Sequencing System (PE Applied Biosystems, USA) в институте Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, α -дефенсинов гамадрила PHD1, PHD2 и PHD3 на автоматическом секвенаторе «Porton Model 2090E» в Калифорнийском университете Лос-Анджелеса, США, там же была определена первичная структура θ -дефенсинов RTD-2 и RTD-3 из лейкоцитов макак-резуса методом синтеза *de novo* и секвенированием протеолитических фрагментов. Определение аминокислотной последовательности θ -дефенсинов PhTD-1 и PhTD-3 из лейкоцитов гамадрила было осуществлено секвенированием протеолитических фрагментов на тандемной спектрометрической установке MALDI-TOF/TOF MS (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) в университете г. Лейпцига (ФРГ).

Определение структуры генов. Анализ нуклеотидной последовательности ареницинов проводили с помощью метода дидезокси- терминации цепи в двухцепочечном векторе с использованием флуоресцентно-меченного красителя на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) в институте Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Транскрипты получали путем обратной транскрипции и амплификации (RT-PCR), которую проводили с помощью набора реактивов SMART^{*} RACE^{**} cDNA Amplification Kit (Clontech, США; ^{*}SMART – Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript; ^{**}RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends) и ген-специфических праймеров. Определение нуклеотидной последовательности θ -дефенсинов RTD-2 и RTD-3 было осуществлено методом RACE-анализа с использованием тотальной РНК, выделенной из костного мозга макак-резуса в Калифорнийском университете Лос-Анджелеса, США. Специфические праймеры были сконструированы на основе кДНК α -дефенсинов человека.

Синтез θ -дефенсинов RTD-1, RTD-2 и RTD-3. Синтез осуществлен с помощью синтезатора ABI 431 A в Калифорнийской университете Лос-Анджелеса (США).

Оценка антимикробной активности (АМА) выделенных пептидов. АМА полученных пептидных фракций определяли методом радиальной диффузии в агарозном геле, предложенным Р. Лерером [Lehrer et al., 1991]. В качестве тест-микробов использовали грамотрицательную бактерию *Escherichia coli*, штамм ML-35p; грамположительные бактерии *Listeria monocytogenes*, штамм EGD и *Staphylococcus aureus*, штамм MRSA ATCC 33591; дрожжеподобный гриб *Candida albicans*, штамм 820. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) полученных пептидов определяли путем построения линейных регрессий зависимости антимикробной активности от концентрации пептидов. Точка пересечения графика регрессии с осью абсцисс принималась за МИК.

Модель для испытания эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов *in vivo*. Подопытным крысам внутривенно вводили раствор липополисахарида *E. coli* (“Sigma”, серотип 055:B5), антимикробные пептиды

или забуференный «физиологический» раствор – 0,01М Na-фосфатный буфер, pH 7,2-7,4 с 0,14М NaCl. Антимикробные пептиды и ЛПС вводили из расчета 100 мкг/кг веса и 25 мкг/кг веса животного, соответственно. В случае совместного испытания антимикробные пептиды вводили через 10 минут после введения ЛПС. Через 1 час после введения препаратов осуществляли забор крови. Фракцию мононуклеарных клеток крови выделяли по стандартной методике с помощью центрифугирования в градиенте плотности в среде для разделения клеток крови LYMPHOSEP. Эндотоксин-нейтрализующее действие АМП оценивали по изменению ЛПС-индуцированной экспрессии гена провоспалительного ИЛ-1 β в мононуклеарных лейкоцитах крови лабораторных животных.

Экспериментальная модель стресса. В качестве экспериментальной модели стресса использовали комбинированный эмоционально-физический стресс – плавание в холодной воде (2°-4° С) в течение 2-х минут. Препараты RatNP-1, RatNP-3, ЛФ и овальбумина (ОА) разводили в воде для инъекций и вводили животным внутрибрюшинно непосредственно перед стрессирующим воздействием из расчета 100 мкг/кг веса животного для пептидов и 200 мкг/кг – для белков, в объеме 500 мкл. Забор крови осуществляли через 30 минут и 3 часа после окончания стрессирующего воздействия, после быстрой декапитации.

Исследование экспрессии генов. Выделение РНК проводили с помощью коммерческого наборов Aurum Total RNA Mini Kit (фирма BioRad) и Gene Elute Mammalian total RNA kit (фирма Sigma-Aldrich) по соответствующим протоколам. Праймеры подбирали с использованием компьютерной программы Primer3, доступной в Интернете по адресу <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/> (Университет Тарту, Эстония) и по литературным данным. Синтез праймеров осуществляла фирма «Бигль» (Санкт-Петербург).

Для оценки экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени использовали реактивы фирмы Thermo Scientific – смесь для ПЦР Maxima SYBR Green qPCR Master mix (2x).

Исследование генерации супероксидного радикала клетками цельной крови крыс *in vitro* проводили с использованием теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в биохимической модификации [Катаева и др., 1988; Киселева, Полевщиков, 1994].

Получение конъюгатов белков. Конъюгацию дефенсина RatNP-3 с овальбумином проводили с использованием глутаральдегида. Конъюгаты антител с пероксидазой хрена получали периодатным методом [Catty, Raykundalia, 1989].

Получение моноспецифических антител. Иммунные сыворотки к ЛФ, МПО и дефенсинам получали иммунизированием кроликов по схеме Призвански К. [Pryzwansky et al., 1978]. Моноспецифические антитела выделяли с использованием аффинных колонок на основе агарозных матриц с пришитыми антигенами.

Определение концентрации ЛФ, МПО и RatNP-3 в биологических жидкостях осуществляли твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА),

методом «сэндвича», где в качестве вторичных антител использовали конъюгаты соответствующих специфических антител с пероксидазой хрена.

Определение концентрации кортикостерона, АКТГ, норадреналина и цитокинов. Иммуноферментный определение кортикостерона и адренкортикотропного гормона (АКТГ) проводили с помощью наборов фирмы DRG Corticosterone ELISA EIA-4164 и АСТН EIA-3647, согласно инструкциям производителя. Определение концентрации норадреналина в плазме крови проводили иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора 3-CAT ELISA Fast Track фирмы LDN (Германия), согласно инструкции, приложенной к набору. Содержание ИЛ-1 и ИЛ-10 в плазме крови крыс определяли иммуноферментным методом с помощью наборов фирмы eBiosciences.

Клинический материал. В работе использовали сыворотку крови больных туберкулезом, полученную из ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России, цельную кровь больных с сочетанными травмами и кровопотерей, полученную из ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе». Получено информированное согласие пациентов на обследование.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна-Уитни, для последовательностей с нормальным распределением – по t-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов крови макак-резуса *Macaca mulatta*.

Цельная кровь была получена из НИИ физиологии им. ак. И.П. Павлова, (Санкт-Петербург) от двух взрослых самок макак-резусов, наркотизированных в целях, не относящихся к данному исследованию. Очистку антимикробных пептидов проводили по стандартной схеме, традиционно применяемой для выделения АМП, включающей экстракцию пептидов из фагоцитов в кислой среде, их фракционирование методами ультрафильтрации и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) [Kokryakov et al., 1993; Harwig et al., 1993]. Получены два пептида, сохраняющие свою антимикробную активность при повышенной ионной силе раствора (0,1 М NaCl). Масс-спектрометрический анализ показал, что их молекулярные массы составляли 2082 Да и 2075 Да. Попытка определить аминокислотную последовательность на автоматическом секвенаторе потерпела неудачу, что указывало на возможную модификацию N-концевой аминокислоты. Дальнейшие эксперименты проводили на пептидах, выделенных из костного мозга обезьян.

Клетки костного мозга лизировали в смеси TRI-реагента и 5н уксусной кислоты, белковую фракцию осаждали добавлением изопропанола к фенол-

этанольному супернатанту, центрифугировали, осадок промывали, растворяли в 10% уксусной кислоте и смесь разделяли с помощью препаративного электрофореза в ПААГ в кислой буферной среде рН 2,2. Фракции, содержащие низкомолекулярные компоненты, обладающие антимикробной активностью при концентрации NaCl 0,1 М, подвергли разделению с помощью (ОФ-ВЭЖХ. Получены три антибиотических пептида, физико-химические и антимикробные свойства которых позволяли предположить, что они представляют собой циклические дефенсины RTD-1, RTD-2 и RTD-3.

Так как стандартным методом деградации по Эдману установить первичную аминокислотную последовательность пептидов оказалось невозможно, были определены последовательности генов, кодирующих эти пептиды методом RACE-анализа с использованием тотальной РНК, выделенной из костного мозга макаки. Специфические праймеры были сконструированы на основе кДНК человеческих α -дефенсинов. В результате получено 3 транскрипта α -дефенсинов, у которых стоп-кодон размещался не после кодона, соответствующего шестому цистеину, как у классических α -дефенсинов, а раньше. Полипептиды, соответствующие этим «половинкам», были названы демидефенсинами:

Демидефенсин-1 *MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD*⁴⁰
⁴¹*QGMAHSFTRPENAALPLSESA-RGLRCLCRRGVCQLL*⁷⁶

Демидефенсин-2 *MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD*⁴⁰
⁴¹*QGMAHSFTRPENAALPLSESA-KGLRCICTRGFCQLL*⁷⁶

Демидефенсин-3 *MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD*⁴⁰
⁴¹*QGMAHSFTRPENAALPLSESE-RGLRCICVLGICQLL*⁷⁶

(Жирным шрифтом отмечены последовательности зрелых демидефенсинов, курсивом – сигнальный пептид и прочасть)

На основании полученных данных были синтезированы циклические пептиды, представляющие собой различные варианты комбинаций зрелых демидефенсинов:

RTD-1: RCLCRRGVCRCICTRGFC (продукт демидефенсина-1 и демидефенсина-2).

RTD-2: RCLCRRGVCRCICRRGVC (продукт только демидефенсина-1)

RTD-3: RCICTRGFCRCICTRGFC (продукт только демидефенсина-2)

Чтобы идентифицировать полученные пептиды как циклические минидефенсины RTD-1, RTD-2 и RTD-3 провели их сравнение с синтетическими аналогами. Каждая исследуемая пара имела идентичное время элюции с ОФ-ВЭЖХ и массу. Натуральные и синтезированные пептиды подвергали протеолизу с помощью трипсина. Полученные протеолитические фрагменты для каждой пары пептидов имели идентичную молекулярную массу. На основании электрофоретического, хроматографического и масс-спектрометрического анализов можно утверждать, что клетки костного мозга макак-резуса продуцируют по крайней мере три циклических минидефенсина, которые кодируются двумя генами демидефенсинов.

Таким образом, впервые показано, что циклические минидефенсины (RTD-2, RTD-3, RTD-1) представляют собой продукты посттрансляционной системы

формирования разнообразия первичных структур белково-пептидных соединений с антимикробной активностью без увеличения числа генов. В данном случае, в образовании трех молекул антимикробных пептидов участвуют только два гена демидефенсинов.

Выделение новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*. Для выделения дефенсинов использовали экстракцию 10% уксусной кислотой, с последующей ультрафильтрацией через фильтр YM-10. Данные электрофоретического анализа показали, что большая часть антимикробных пептидов с молекулярной массой 3-4 кДа не прошли через этот фильтр. Дальнейшее разделение этой фракции осуществляли с помощью препаративного электрофореза в ПААГ в кислой буферной среде. Содержимое всех фракций тестировали на антимикробную активность. Окончательную очистку низкомолекулярных фракций, демонстрирующих АМА, проводили методом ОФ ВЭЖХ. В результате было выделено три высокоочищенных пептида. По данным масс-спектрометрического анализа молекулярные массы пептидов составляют 3938.7 Да, 3782.3 Да и 3725.3 Да.

Первичные структуры пептидов были определены методом деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе (в лаборатории профессора Р. Лерера в Калифорнийском университете Лос-Анджелеса). Анализ первичных структур этих пептидов выявил консервативное расположение шести остатков цистеина, двух – глицина, двух – аргинина и одного остатка глутаминовой кислоты характерное для уже изученных ранее α -дефенсинов, что позволяет отнести выделенные пептиды к данному подсемейству дефенсинов. Поэтому они получили названия PHD1, PHD2 и PHD3 (*Papio hamadryas defensin*) соответственно. Первичные структуры PHD1-3 представлены на рисунке 1. Для сравнения приведена первичная структура α -дефенсина из нейтрофилов человека HNP-1.

PHD1	RRICRCRIGRCLGLEVYFGVCFLHGRLARRCCR
PHD2	RICRCRIGRCLGLEVYFGVCFLHGRLARRCCR
PHD3	RTCRCRLGRCSRRESYSGSCNINGRISLCCR
HNP1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC

Рис. 1. Первичные структуры α -дефенсинов гамадрила PHD1-3 и человека HNP-1 Жирным шрифтом выделены инвариантные остатки аминокислот.

Оценка антимикробной активности PHD1-3. Анализ АМА показал, что PHD1-3 проявляют антимикробный эффект в отношении всех тестируемых микроорганизмов, хотя и в различной степени. МИК PHD1-3 и HNP1 для четырех тестируемых микроорганизмов представлены в таблице 1. Сравнение МИК PHD1-3 и HNP1 показывает, что, в целом, они схожи по эффективности и характеру АМА.

Анализ степени структурного родства с помощью программы BLAST выявил, что дефенсины PHD1 и PHD2 имеют высокую степень гомологии (до 70%) с энтеральными дефенсинами макак-резуса, а PHD3 до 90% гомологии с лейкоцитарными дефенсинами макак-резуса.

Таблица 1. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) дефенсинов (мкМ).

Пептиды	МИК (мкМ) для <i>E.coli</i>		МИК (мкМ) для <i>L.monocytogenes</i>		МИК (мкМ) для <i>S.aureus</i>		МИК (мкМ) для <i>C.albicans</i>	
	без NaCl	с 0,1 М NaCl	без NaCl	с 0,1 М NaCl	без NaCl	с 0,1 М NaCl	без NaCl	с 0,1 М NaCl
HNP1	2,1	10,2	1,3	2,1	3,5	>50	3,2	>50
PHD1	1,6	3,5	1,3	1,8	3,8	>50	2,3	4,5
PHD2	1,7	2,9	2,1	1,9	7,8	>50	4,0	7,5
PHD3	2,0	3,1	1,2	1,9	4,5	7,8	2,6	3,8

После разделения препаративным электрофорезом и очистки на установке ОФ-ВЭЖХ фракции экстрактов лейкоцитов гамадрила, которые прошли через фильтр УМ-10, получены две фракции антимикробных пептидов с молекулярными массами 2053,66 Да и 2047,44 Да.

При анализе антимикробной активности выделенных пептидов установлено, что в присутствии повышенной концентрации NaCl выделенные пептиды практически не снижают своей антибиотической активности против *E.coli* и *S.aureus* (табл. 2), в отличие от α -дефенсинов HNP-1 или выделенных нами PHD1-3 (табл. 1). Такая особенность АМА, малая молекулярная масса (около 2000 Да) и невозможность определить аминокислотную последовательность методом деградации по Эдману позволила предположить, что выделенные пептиды представляют собой θ -дефенсины.

Таблица 2. Минимальные ингибирующие концентрации выделенных антимикробных пептидов с молекулярными массами 2053,66 Да и 2047,44 Да

Пептиды	МИК (мкМ) для <i>E.coli</i>		МИК (мкМ) для <i>L.monocytogenes</i>		МИК (мкМ) для <i>S.aureus</i>		МИК (мкМ) для <i>C.albicans</i>	
	без NaCl	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl
Пептид А 2053,66 Да	1,5	2,0	1,6	1,7	2,5	3,6	1,6	6,5
Пептид В 2047,44 Да	1,7	2,2	1,5	1,9	1,7	4,5	1,4	7,4

Определение молекулярной массы пептидов, восстановленных дитиотреитолом и алкилированных иодацетамидом выявило увеличение массы на 348,3 Да, что говорит о наличии в обоих пептидах трех внутримолекулярных дисульфидных связей. Анализ аминокислотного состава вкупе с масс-спектрометрическими данными показал, что пептиды содержат по 18 аминокислотных остатков, представляют собой макроциклические структуры и содержат три дисульфидных внутримолекулярных связи, что является характерным признаком θ -дефенсинов, и что дает нам основание назвать выделенный пептид А - PhTD-1 (**P**ario **h**amadryas **t**heta-**d**efensin), а пептид В - PhTD-3, по аналогии с θ -дефенсинами из лейкоцитов макак-резуса RTD-1 и RTD-3 (**R**hesus **t**heta-**d**efensin).

Аминокислотные последовательности были определены методом масс-спектрометрии фрагментов пептидов, полученных энзиматическим гидролизом, с

помощью tandemного масс-спектрометра MALDI-TOF/TOF MS (Рис. 2) в ходе совместной работы с лабораторией профессора Р. Хоффманна института Биоаналитической химии Лейпцигского университета (Германия). Паттерн дисульфидных связей выбран по аналогии с θ -дефенсинами макак-резуса.

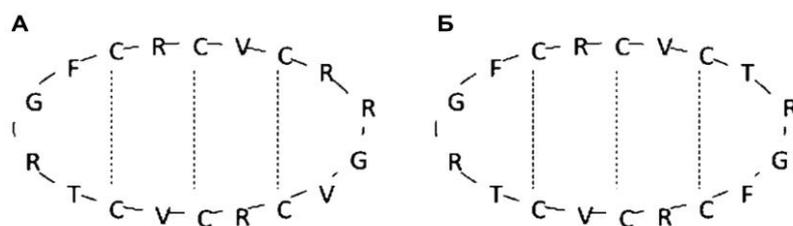


Рис. 2. Аминокислотные последовательности θ -дефенсинов, выделенных из лейкоцитов гамадрила. А - PhTD-1; Б - PhTD-3.

Пептиды из целомоцитов пескожила *Arenicola marina*. Выделение и очистка антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила проводили по той же схеме, что и выделение дефенсинов из лейкоцитов гамадрила. В результате были получены два антимикробных пептида с молекулярной массой 2758.1 Да и 2772.3 Да., названные соответственно ареницин-1 и ареницин-2. Масс-спектрометрический анализ восстановленных и алкилированных пептидов свидетельствовал о наличии в каждом пептиде двух остатков цистеина, образующих одну дисульфидную связь.

Первичная структура ареницинов. Для определения N-концевой аминокислотной последовательности выделенных пептидов применяли автоматическое микросеквенирование на приборе Procise 491 cLC Protein Sequencing System (Applied Biosystems, США). Таким образом, была установлена частичная (95%) аминокислотная последовательность за исключением последнего аминокислотного остатка для каждого из выделенных пептидов:

Ареницин-1 – R¹-W²-PES³-V⁴-Y⁵-A⁶-Y⁷-V⁸-R⁹-I¹⁰-R¹¹-G¹²-V¹³-L¹⁴-V¹⁵-R¹⁶-Y¹⁷-R¹⁸-R¹⁹-PES²⁰-X²¹

Ареницин-2 – R¹-W²-PES³-V⁴-Y⁵-A⁶-Y⁷-V⁸-R⁹-V¹⁰-R¹¹-G¹²-V¹³-L¹⁴-V¹⁵-R¹⁶-Y¹⁷-R¹⁸-R¹⁹-PES²⁰-X²¹

где PES - пиридинэтилцистеин

Для установления полной первичной структуры была определена структура генов ареницинов. Была выделена РНК из целомоцитов, получены транскрипты с помощью ген-специфических праймеров, которые были лигированы с плазмидным вектором и клонированы. В результате секвенирования по методу Сэнгера стала известна последовательность 3'-конца кДНК, на основании структуры которой были синтезированы праймеры для амплификации 5'-концевой области. Дальнейшая работа по клонированию и определению 5'-концевой последовательности проводилась по той же схеме, что и для 3'-концевой области. Таким образом, была определена полная первичная структура. Обе последовательности (GenBank Accession Nos.: AY684856, AY684857) содержат 609 нуклеотидных пар, кодирующих предшественник пептидов, состоящий из 202 аминокислотных остатков. Кроме замены Val/Ile в активном пептиде, имеют место еще 12 нуклеотидных замен, приводящих к 6 заменам аминокислотных остатков в прекурсор.

Обнаруженные антимикробные пептиды имеют следующие аминокислотные последовательности:

Ареницин-1 – R¹-W²-C³-V⁴-Y⁵-A⁶-Y⁷-V⁸-R⁹-I¹⁰-R¹¹-G¹²-V¹³-L¹⁴-V¹⁵-R¹⁶-Y¹⁷-R¹⁸-R¹⁹-C²⁰-W²¹
 Ареницин-2 – R¹-W²-C³-V⁴-Y⁵-A⁶-Y⁷-V⁸-R⁹-V¹⁰-R¹¹-G¹²-V¹³-L¹⁴-V¹⁵-R¹⁶-Y¹⁷-R¹⁸-R¹⁹-C²⁰-W²¹

Поиск в программе BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям не выявил сходства с уже известными последовательностями, таким образом, можно говорить, что ареницины, содержащие 21 аминокислотный остаток и образующие большое кольцо из 18 аминокислотных представляют новую структурную группу антимикробных пептидов.

Работа по определению первичной аминокислотной последовательности и структуры кДНК выполнялась совместно с Институтом биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН (Учебно-научный центр, рук. Центра д.х.н., профессор Т.В. Овчинникова).

Разработка иммуноферментных тест-систем для выявления ЛФ и МПО человека и дефенсина крысы RatNP-3 в биологических жидкостях.

Выделение МПО из лейкоцитов человека осуществляли по модифицированному методу Р. Дессера [Desser et al., 1972], ЛФ из лейкоцитов человека проводили по ранее описанному методу [Кокряков и др. 1988], дефенсина RatNP-3 из лейкоцитов крысы проводили аналогично выделению дефенсинов из лейкоцитов гамадрила. Антисыворотки к этим белкам и пептиду получали, иммунизируя кроликов. В случае с дефенсином в качестве антигена использовали конъюгат пептида и овальбумина. Антитела выделяли из сывороток с помощью аффинной хроматографии на колонках с антигенами, связанными с матрицей. Концентрацию МПО, ЛФ и RatNP-3 в биологических жидкостях определяли твердофазным иммуноферментным анализом, методом «сэндвича». В качестве вторичных антител использовали соответствующие специфические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Полученные тест-системы для ЛФ и МПО имеют чувствительность 1 нг/мл и диапазон измерений 1-80 нг/мл, у тест-системы для определения RatNP-3 чувствительность – 0,1 нг/мл и диапазон измерений 0,1-8 нг/мл.

Антимикробные пептиды как соединения, модулирующие ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов.

Известно, что некоторые катионные антимикробные пептиды могут связывать эндотоксин в условиях *in vitro* [Scott et al., 2000] и оказывать противовоспалительный эффект *in vivo* [Giacometti et al., 2004]. Однако вопрос о том, является ли такой эффект АМП прямым следствием ЛПС-связывающей активности и какие пептиды проявляют оптимальный набор свойств в качестве потенциального противовоспалительного препарата остается открытым.

Исследовано свойство антимикробных пептидов α -дефенсина человека 1 (HNP-1), профенина-1 (PF-1), протегрина-1 (PG-1), PR39, ареницина-1, которые связывали ЛПС в LAL-тесте с различной эффективностью (табл. 3), нейтрализовать ЛПС-стимулированную экспрессию провоспалительного цитокина ИЛ-1 β мононуклеарными клетками крови крыс в условиях *in vivo*. Исследуемые пептиды,

кроме HNP-1 и PR39 были в разное время открыты и охарактеризованы нами, θ -дефенсины не использовали в этих экспериментах, так как они были получены в недостаточном количестве. Полученные результаты показывают, что такая активность не зависит напрямую от способности пептидов связывать ЛПС. Для антибиотических пептидов HNP-1, PF-1, PG-1, PR39 продемонстрировано наличие эндотоксин-нейтрализующей активности, в то время как введение ареницина-1 не снижает уровень ЛПС-индуцированной экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 β (табл. 4).

Таблица 3. Концентрации пептидов, при которой 50% ЛПС находится в связанном состоянии ($ЭК_{50}$)

	PG-1	PR 39	PF-1	Ареницин-1	HNP-1
$ЭК_{50}$ (мкМ)	3,00 \pm 0,60	4,01 \pm 0,75	3,78 \pm 0,69	5,03 \pm 1,05	39,9 \pm 7,2

Таблица 4. Экспрессия ИЛ-1 β в мононуклеарах крови крыс, показатели спонтанного НСТ-теста и содержание диеновых конъюгатов в крови крыс при введении пептидов и ЛПС

Группы	Вводимые препараты	Уровень экспрессии гена ИЛ-1 β (у.е.)	Интенсивность НСТ-теста (у.е.)	Кол-во диеновых конъюгатов (у.е.)
1	ЛПС	28,57# (23,41; 33,51)	30,0# (22,9; 31,5)	0,38 (0,30; 0,41)
2	ЗФР	1,18* (0,84; 1,38)	16,1* (14,3; 22,1)	0,12 (0,12; 0,35)
3	ЛПС+ PG-1	4,05* (2,08; 5,09)	76,2* (56,2; 118,1)	6,51* (3,07; 6,63)
4	PG-1	1,63 (1,23; 1,83)	46,0# (28,0; 55,3)	1,01# (0,95; 1,29)
5	ЛПС+PR39	4,09* (3,48; 9,10)	88,5* (54,5; 129,8)	1,82* (1,61; 5,23)
6	PR39	0,43# (0,33; 0,78)	102,5# (86,7; 126,7)	2,32# (0,99; 4,37)
7	ЛПС+ PF-1	2,55* (1,64; 6,03)	15,66 (6,73; 46,54)	0,21 (0,13; 0,37)
8	PF-1	2,02# (1,55; 2,26)	15,79 (12,05; 21,60)	0,28 (0,13; 0,74)
9	ЛПС+ HNP-1	1,19* (0,88; 1,43)	-	-
10	HNP-1	1,55 (0,68; 3,19)	-	-
11	ЛПС+ареницин-1	37,28 (27,14; 60,01)	-	-
12	Ареницин-1	4,54 (1,04; 7,45)	-	-

* - $p < 0,05$ vs группы 1 # - $p < 0,05$ vs группы 2 (по критерию Манна-Уитни)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

Примечание: Величина экспрессии ИЛ-1 β нормализована относительно экспрессии гена "домашнего хозяйства" глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (ГАФД) и изменения представлены по отношению к экспрессии гена ИЛ-1 β в группе контроля – ЗФР (забуференный «физиологический» раствор – 0,01М Na-фосфатный буфер, pH 7,2-7,4 с 0,14М NaCl) (n=5 – 7; n – количество животных в группе)

Известно, что в условиях эндотоксинового шока в организме усиливается выработка свободных радикалов, которые могут повреждать собственные клетки. Один из наиболее изученных на настоящее время процессов подобной деструкции – перекисное окисление липидов (ПОЛ).

Влияние АМП на продукцию супероксидного радикала оценивали с помощью теста с восстановлением нитросинего тетразолия (НСТ-тест), интенсивность ПОЛ оценивали по содержанию диеновых конъюгатов.

Показано, что в условиях *in vivo* антимикробные пептиды – PG-1, PR39, но не PF-1, усиливают продукцию супероксидного радикала клетками цельной крови крыс (табл. 4). HNP-1 не испытывали в тесте *in vivo*, так как он показал сильное стимулирующее действие на продукцию супероксидного радикала в условиях *in vitro*.

Повышенный уровень спонтанной продукции свободных радикалов должен был вызвать повышение перекисного окисления липидов, что мы и выявили с помощью измерения содержания диеновых конъюгатов (табл. 4). Введение ЛПС и PF-1 (по отдельности или совместно) не влияет на уровень содержания диеновых конъюгатов, в то время как введение PG-1 и PR39 достоверно повышает содержание продуктов ПОЛ. Введение PF-1 нормализует ЛПС-индуцированное повышение уровней цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-10 (табл. 5) в плазме крови крыс.

Таблица 5. Динамика количества ИЛ-1 и ИЛ-10 в плазме крови крыс после введения ЛПС (500 мкг/кг веса) и PF-1 (100 мкг/кг веса)

Группы животных	Цитокины	Количество цитокинов		
		Медиана (пг/мл)	LQ (пг/мл)	UQ (пг/мл)
интактные	ИЛ-1 β	32,4	15,1	57,8
	ИЛ-10	15,1	11,1	25,8
После введения ЛПС				
через 1 час	ИЛ-1 β	184,8*	54,8	210,2
	ИЛ-10	552,7*	446,5	582,1
через 3 часа	ИЛ-1 β	52,7	39,0	93,4
	ИЛ-10	188,7*	157,0	297,3
через 6 часов	ИЛ-1 β	4,97	1,98	19,20
	ИЛ-10	131,3*	93,6	242,2
через 24 часа	ИЛ-1 β	35,9	22,2	55,3
	ИЛ-10	28,5	24,5	32,5
После введения ЛПС и PF-1				
через 1 час	ИЛ-1 β	7,54#	2,50	32,3
	ИЛ-10	121,3*#	58,2	299,9
через 3 часа	ИЛ-1 β	5,99	3,00	33,43
	ИЛ-10	182,1*	123,6	307,3
через 6 часов	ИЛ-1 β	14,12	5,99	20,22
	ИЛ-10	105,3*	85,2	170,1
через 24 часа	ИЛ-1 β	28,3	24,8	66,4
	ИЛ-10	31,8	22,4	49,2

* - $p < 0,05$ относительно группы интактных животных

- $p < 0,05$ относительно группы животных, у которых забор проводили через 1 час после введения ЛПС (по критерию Манна-Уитни); LQ - нижний квартиль, UQ - верхний квартиль; (n=5 – 7)

Таким образом, показано, что профенин-1 (PF-1) обладает оптимальным набором свойств для создания потенциального эндотоксин-нейтрализующего препарата – связывает ЛПС с высокой аффинностью, нормализует ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов, не усиливает перекисное окисление. Ранее было показано, что профенин не оказывает цитотоксического действия на эукариотические клетки [Wessely-Szponder et al., 2010].

В то же время эксперименты на выделенных клетках моноклеарного ряда крови (моноцитах) показали, что в условиях *in vitro* профенин-1 и PR39 не снижают ЛПС-стимулированную экспрессию ИЛ-1 ни через 2 часа, ни через 24 часа инкубации (табл. 6). В свою очередь, дефенсин HNP-1 даже увеличивает уровень ЛПС-индуцированной экспрессии через 24 часа инкубации с ЛПС (табл. 6), что соответствует данным других авторов [Chaly et al., 2000; Shi et al., 2007].

Таблица 6. Экспрессия гена ИЛ-1 β в моноцитах крови человека под действием ЛПС (10 нг/мл) и антибиотических пептидов (10 мкг/мл) через 2 и 24 часа инкубации. Данные по экспрессии нормализованы относительно гена "домашнего хозяйства" – β -2-микроглобулина.

Введенные препараты	Экспрессия гена ИЛ-1 β через 2 часа после введения препаратов	Экспрессия гена ИЛ-1 β через 24 часа после введения препаратов
контроль (ЗФР)	0,045 \pm 0,012	0,050 \pm 0,015
ЛПС	2,483 \pm 0,347*	5,650 \pm 1,396*
дефенсин HNP-1	0,037 \pm 0,005	0,074 \pm 0,059
ЛПС+ HNP-1	4,896 \pm 1,299*	49,557 \pm 14,393*#
PR39	0,043 \pm 0,016	0,063 \pm 0,024
ЛПС+ PR39	1,556 \pm 0,320*	3,290 \pm 1,714*
профенин-1	0,047 \pm 0,019	0,137 \pm 0,034
ЛПС+профенин-1	2,296 \pm 0,229*	4,703 \pm 2,684*

* – $p < 0,05$ относительно контроля (по t-критерию Стьюдента)

– $p < 0,05$ относительно группы животных, которым вводили ЛПС (по t-критерию Стьюдента)

Тот факт, что данные, полученные в экспериментах *in vivo* и *in vitro*, разнятся между собой, позволяет предположить, что свойство антибиотических пептидов из нейтрофильных гранулоцитов модулировать экспрессию генов цитокинов зависит не только от их способности нейтрализовать ЛПС, но и от их более широкого участия в регуляции защитных функций организма, в том числе в нейрогуморальной регуляции.

Иммуномодулирующее действие дефенсинов из нейтрофилов крысы в условиях стрессирующего воздействия

Нами впервые показано, что превентивное введение дефенсинов (RatNP-1, RatNP-3) нормализует абсолютное содержание нейтрофилов в крови через 3 часа после стресса, когда абсолютное содержание нейтрофилов увеличивалось (Рис. 3). На основании полученных данных можно предположить, что дефенсины, секретируемые

нейтрофилами в кровь, включаются в формирование механизмов обратной связи, направленных на снижение числа циркулирующих нейтрофилов.

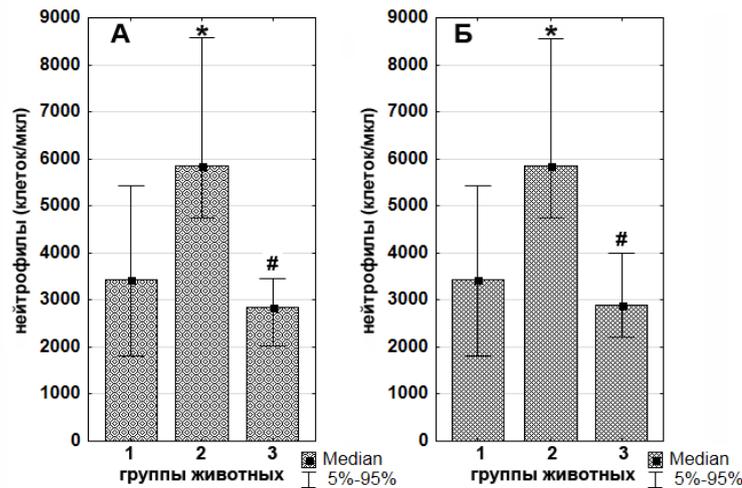


Рис. 3. Абсолютное содержание нейтрофилов в крови крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б)

Группы животных: 1 – контроль (интактные); 2 – через 3 часа после стресса; 3 – через 3 часа после стресса и введения дефенсинов (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр. 1, # – $p < 0,05$ относительно гр. 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

Можно было предположить, что механизмы реализации этих реакций могут осуществляться посредством изменения продукции катехоламинов симпатoadреналовой системой, но введение дефенсинов не влияет на стресс-индуцированные изменения уровня норадреналина в крови крыс (табл. 7)

Таблица 7. Содержание норадреналина в плазме крови крыс через 30 мин и 3 часа после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 и плавательного стресса

Группы животных	Норадреналин в плазме крови (пг/мл)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	104,6 (76,1; 138,7)	105,5 (77,1; 150,6)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	240,3* (208,2; 259,2)	167,4* (108,9; 837,7)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	261,4* (197,9; 331,0)	376,1* (238,5; 618,4)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	132,6 (69,9; 183,7)	123,8 (65,5; 165,3)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	95,1 (92,7; 100,9)	108,0 (44,2; 128,0)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs группы 1 (по критерию Манна-Уитни) (n=5 – 8)

Известно, что перераспределение лейкоцитов может являться следствием изменения уровня не только катехоламинов, но и глюкокортикоидов.

Продемонстрировано, что превентивное введение дефенсинов снижает стресс-индуцированное повышение концентрации кортикостерона через 30 минут после аппликации стресса. Через 3 часа изменений в содержании кортикостерона выявлено не было (табл. 8).

Таблица 8. Содержание кортикостерона в плазме крови крыс после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 и плавательного стресса

Группы животных	Кортикостерон в плазме крови (нмоль/л)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	260 (240; 264)	250 (220; 340)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	1830* (1594; 2038)	2340* (1950; 2350)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	1306# (844; 1446)	1063# (915; 1187)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	100 (75; 210)	175 (85; 315)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	210 (147; 245)	100 (73; 190)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs группы 1; # - $p < 0,05$ vs группы 2 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Выбор дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 для исследования обусловлен тем, что ранее для некоторых дефенсинов было выявлено кортикостатическое действие *in vitro* на культуре клеток коркового слоя надпочечников крыс, а именно было показано, что RatNP-1 в экспериментах *in vitro* на культуре клеток надпочечников снижает АКТГ-индуцированный синтез кортикостерона, в то время как RatNP-3 практически не проявляет такой активности [Solomon, 1993].

Таким образом, обнаруженное кортикостатическое действие дефенсина RatNP-3, оцениваемое на максимуме развития глюкокортикоидной реакции, описано впервые.

Следует отметить, что кортикостатическое действие дефенсинов, по-видимому, не связано с возможным влиянием этих пептидов на содержание АКТГ в крови экспериментальных животных, так как при введении дефенсинов не было выявлено снижения стресс-индуцированного повышенного уровня АКТГ (табл. 9).

Плавание в холодной воде приводит к повышению экспрессии генов ИЛ-4 и TLR4 через 3 часа (но не 30 минут) после стресса, а также к подавлению экспрессии гена фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α) в клетках селезенки крыс через 30 минут после стресса и гена трансформирующего фактора роста бета (ТФР- β) через 3 часа после стресса.

Введение дефенсинов снижает стресс-стимулированную экспрессию генов TLR4 (табл. 10) и ИЛ-4 (табл. 11), восстанавливает экспрессию гена ТФР- β (табл. 12), но не влияет на экспрессию гена ФНО- α (табл. 13)

Таблица 9. Содержание АКТГ в плазме крови крыс после введения дефенсина RatNP-1 и RatNP-3 и плавательного стресса

Группы животных	АКТГ в плазме крови (пг/мл)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	9,11 (7,21; 13,36)	8,60 (6,71; 13,36)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	27,40* (21,99; 28,71)	24,62* (21,00; 28,56)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	19,36 (16,48; 21,99)	14,47 (11,47; 30,00)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	18,86 (16,23; 22,18)	6,21 (3,58; 14,10)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	11,15 4,58; 18,04	15,73 8,84; 16,73

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs групп 1 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Таблица 10. Экспрессия гена TLR4 в спленocyтaх крыс после плавательного стресса после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3, нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД (x100).

Группы животных	Уровень экспрессии гена TLR4 (y.e.)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	0,112 (0,072; 0,134)	0,311 (0,241; 0,416)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	0,109 (0,066; 0,123)	0,216 (0,141; 0,310)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	0,087 (0,059; 0,131)	0,224 (0,188; 0,241)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	0,264* (0,200; 0,311)	1,258* (0,550; 2,295)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	0,144# (0,068; 0,171)	0,256# (0,154; 0,315)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs гр.1; # - $p < 0,05$ vs гр. 4 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Таблица 11. Экспрессия гена ИЛ-4 в спленocyтaх крыс после плавательного стресса после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3, нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД (x1000).

Группы животных	Уровень экспрессии гена ИЛ-4 (y.e.)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	0,170 (0,140; 0,300)	0,170 (0,140; 0,300)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	0,250 (0,210; 0,910)	0,250 (0,210; 0,910)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	0,450 (0,410; 0,490)	0,395 (0,375; 0,430)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	1,150* (0,810; 1,320)	1,150* (0,810; 1,320)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	0,185# (0,160; 0,200)	0,165# (0,140; 0,180)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs гр.1; # - $p < 0,05$ vs гр. 4 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Таблица 12. Экспрессия гена ТФР- β в спленоцитах крыс после плавательного стресса после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД).

Группы животных	Уровень экспрессии гена ТФР- β (у.е.)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	0,226 (0,204; 0,257)	0,226 (0,204; 0,257)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	0,273 (0,187; 0,301)	0,271 (0,269; 0,276)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	0,279 (0,242; 0,325)	0,317 (0,260; 0,345)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	0,158* (0,134; 0,175)	0,157* (0,112; 0,160)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	0,255 # (0,232; 0,283)	0,314# (0,278; 0,324)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs гр.1; # - $p < 0,05$ vs гр. 4 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Таблица 13. Экспрессия гена ФНО- α в спленоцитах крыс после плавательного стресса после введения дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б) (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД).

Группы животных	Уровень экспрессии гена ФНО- α (у.е.)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	0,0268 (0,0116; 0,0269)	0,0280 (0,0269; 0,0369)
2. Через 30 мин после стресса и введения растворителя	0,0073* (0,0060; 0,0095)	0,0147* (0,0110; 0,0172)
3. Через 30 мин после стресса и введения дефенсина	0,0059* (0,0044; 0,0062)	0,0088* (0,0082; 0,0096)
4. Через 3 часа после стресса и введения растворителя	0,0167 (0,0129; 0,0187)	0,0287 (0,0240; 0,0303)
5. Через 3 часа после стресса и введения дефенсина	0,0117 (0,0053; 0,0151)	0,0209 (0,0183; 0,0257)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* - $p < 0,05$ vs группа. 1 (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод об адаптогенном действии экзогенных дефенсинов крысы на организм при экспериментальном стрессе у крыс.

Для оценки влияния эндогенных дефенсинов крысы на развитие стресс-реакции, в частности, уровень кортикостерона в крови крыс при стрессе нами были получены поликлональные антитела к суммарной фракции дефенсина: RatNP-1, RatNP-2, RatNP-3, RatNP-4. Антитела к дефенсинам были введены экспериментальным животным непосредственно перед стрессом. В качестве контроля другой группе животных вводили суммарную фракцию иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки, взятой у кроликов до иммунизации.

При введении антител к дефенсинам крыс уровень кортикостерона в плазме экспериментальных животных оставался на повышенном уровне через 3 часа после

стресса, а не снижался до уровня характерного для обычного течения стресса без введения антител (Рис. 4А).

При введении антител наблюдалось также снижение относительной концентрации (нг/10⁶ нейтрофилов) дефенсина RatNP-3 в плазме экспериментальных крыс через 3 часа после стрессирующего воздействия, что подтверждает предположение о том, что вводимые поликлональные антитела связываются с эндогенными дефенсинами (Рис. 4Б).

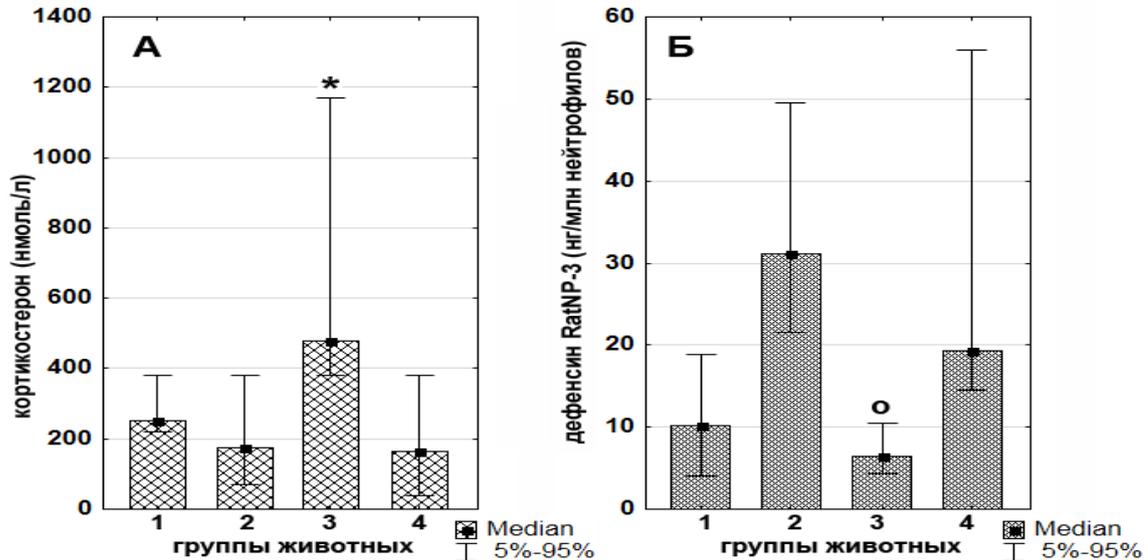


Рис. 4. Концентрация кортикостерона (А) и относительная концентрация дефенсина RatNP-3 (Б) в крови крыс через 3 часа после введения антител к дефенсинам крысы и плавательного стресса

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 3 часа после стресса; 3 – через 3 часа после стресса и введения антител к дефенсинам; 4 – через 3 часа после стресса и введения иммуноглобулинов нормальной сыворотки; (n=5 – 7)

* - $p < 0,05$ vs гр.1, 2, 4; ^o - $p < 0,05$ vs гр. 2, 4 (по критерию Манна-Уитни)

Таким образом, с использованием метода иммуонейтрализации впервые показано, что эндогенные дефенсины участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции.

Иммуномодулирующее действие лактоферрина человека в условиях стрессирующего воздействия

Лактоферрин является неотъемлемым компонентом специфических гранул нейтрофильных гранулоцитов, содержимое которых быстро выходит во внеклеточную среду под действием различных стимулов.

Нами изучено влияние внутрибрюшинного введения лактоферрина на стресс-индуцированные изменения уровня кортикостерона и АКТГ в крови, клеточного состава крови, а также экспрессии генов цитокина ИЛ-4 и паттерн-распознающего рецептора TLR4 в клетках селезенки крыс. В качестве контроля для сравнения эффектов, оказанных лактоферрином, было взято вещество белковой природы – овалбумин (ОА), в той же концентрации, что и лактоферрин (200 мкг/кг веса).

Превентивное внутрибрюшинное введение ЛФ (но не ОА) снижает стресс-стимулированную экспрессию генов ИЛ-4 и TLR4 в селезенке крыс (рис. 5.) и повышенный уровень нейтрофилов в крови через 3 часа после стресса (табл. 14).

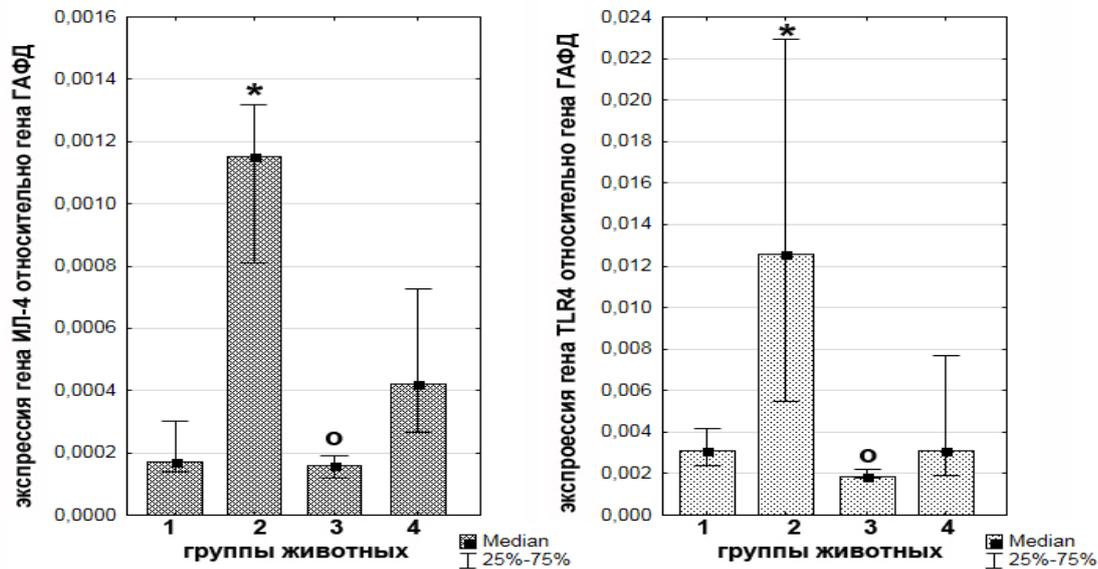


Рис. 5. Экспрессия генов ИЛ-4 (А) и TLR4 (Б) в спленocyтaх крыс при плавательном стрессе после введения ЛФ человека и ОА (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД).

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 3 часа после стресса и введения растворителя; 3 – через 3 часа после стресса и введения ЛФ; 4 – через 3 часа после стресса и введения ОА, (n=5 – 6)

* - $p < 0,05$ vs гр.1; o - $p < 0,05$ vs гр. 2 (по критерию Манна-Уитни)

Таблица 14. Содержание нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в крови крыс через 30 минут и 3 часа после стрессирующего воздействия и введения белков

Группы животных	НГ (%)		НГ (клеток/мкл)	
	30 минут	3 часа	30 минут	3 часа
1. Интактные	25.0 (24.0, 31.0)	25.5 (23.0, 31.0)	3440 (2916, 3875)	3480 (2854, 3965)
2. Инъекция растворителя	29.5 (15.0, 37.0)	14.0 (10.0, 26.0)	3103 (1515, 4033)	1631 (1060, 3094)
3. Инъекция растворителя и стресс	14.0* (4.0, 16.0)	46.5* (38.0, 54.0)	3304 (864, 3408)	5844* (5046, 7526)
4. Инъекция ЛФ и стресс	18.0 (10.0, 21.0)	29.0 [#] (23.0, 32.0)	2279 (2194, 2640)	3040 [#] (2668, 3922)
5. Инъекция ОА и стресс	19.0 (14.0, 24.0)	36.5 (30.0, 45.0)	2770 (1800, 3612)	5046 (2801, 7405)

Данные представлены как – медиана (нижний квартиль, верхний квартиль)

* – $p < 0,05$ vs гр.1 и 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

– $p < 0,05$ vs гр. 3 (по U-критерию Манна-Уитни), (n=5 – 6)

Введение ЛФ также не влияло на стресс-индуцированные изменения уровня норадреналина в крови крыс (табл. 15).

Таблица 15. Содержание норадреналина в плазме крови крыс через 30 минут и 3 часа после стрессорирующего воздействия и введения ЛФ

Группы животных	Норадреналин в плазме крови (пг/мл)	
	через 30 минут	через 3 часа
1. Инъекция растворителя	230 (199; 271)	275 (222;563)
2. Инъекция растворителя и стресс	502* (345; 677)	350 (287;460)
3. Инъекция ЛФ и стресс	414 (146; 555)	371 (215;468)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

* отличается от соответствующей группы 1

$p < 0,05$ (по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 6)

Превентивное введение ЛФ снижает стресс-индуцированное повышение концентрации кортикостерона через 30 минут после аппликации стресса. При введении овальбумина подобного эффекта не наблюдалось. Кортикостатическое действие не проявлял и апо-ЛФ человека ("БелЛактоферрин", БГУ, НПЦ НАН Беларуси по животноводству) полученный из молока трансгенных коз-продуцентов, выведенных в рамках научно-технической программы Союзного государства «БелРосТрансген-2», который имеет на два остатка аргинина на N-конце меньше, чем нативный лактоферрин (Рис. 6). Через 3 часа изменений в концентрации кортикостерона выявлено не было.

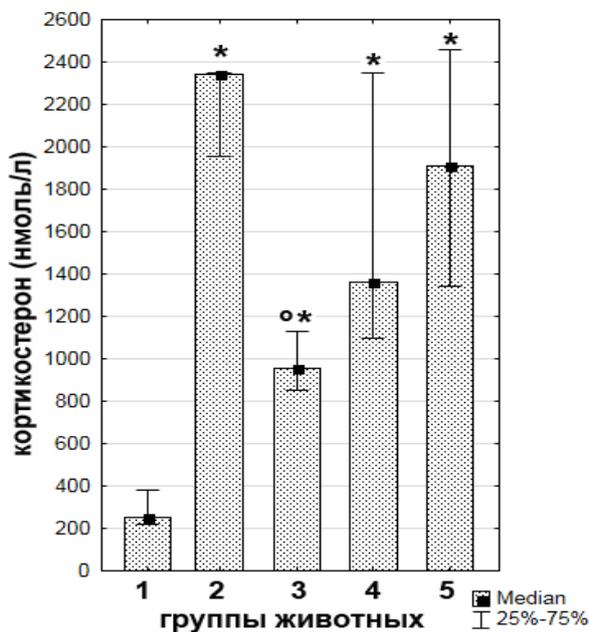


Рис. 6. Концентрация кортикостерона в крови крыс через 30 минут после плавательного стресса и введения лактоферрина, овальбумина и трансгенного лактоферрина

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса и введения растворителя; 3 – через 30 мин после стресса и введения лактоферрина; 4 – через 30 мин после стресса и введения овальбумина; 5 – через 30 мин после стресса и введения трансгенного лактоферрина;

* - $p < 0,05$ vs гр.1; ^o - $p < 0,05$ vs гр. 2

(по критерию Манна-Уитни), (n=5 – 8)

Выявленное кортикостатическое действие лактоферрина, оцениваемое на максимуме развития глюкокортикоидной реакции, описано впервые. Следует подчеркнуть, что кортикостатическое действие ЛФ не связано с возможным влиянием ЛФ на содержание АКТГ в крови экспериментальных животных, так как введение ЛФ не отменяет стресс-индуцированное повышение уровня АКТГ (табл. 16).

Таблица 16. Содержание АКТГ в плазме крови крыс через 30 минут и 3 часа после плавательного стресса и введения ЛФ

Группы животных	АКТГ в плазме крови (пг/мл)	
	через 30 минут	через 3 часа
1. Инъекция растворителя	15,1 (7,1; 21,0)	13,6 (6,7; 14,0)
2. Инъекция растворителя и стресс	24,7* (17,0; 29,3)	22,8* (16,3; 23,5)
3. Инъекция ЛФ и стресс	19,7 (15,0; 24,0)	14,7 (10,5; 19,7)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль), (n=5–6)
* отличается от соответствующей группы 1; p<0,05 (по критерию Манна-Уитни)

Полученные результаты по влиянию лактоферрина на уровень кортикостерона и катехоламинов подтверждаются недавно опубликованными данными японских исследователей, которые демонстрируют, что превентивное внутрибрюшинное введение лактоферрина экспериментальным животным снижает стресс-индуцированного повышения уровня кортикостерона и не влияет на уровень катехоламинов, в данном случае адреналина [Maekawa et al., 2017].

Необходимо отметить, что введение крысам лактоферрина человека и дефенсина крысы не влияет на уровень кортикостерона в крови и экспрессию генов цитокинов, но изменяет экспрессию гена паттерн-распознающего рецептора TLR4. Введение дефенсина RatNP-3 индуцировало повышение экспрессии гена TLR4 через полчаса после введения, а лактоферрина – через 3 часа после введения (Рис. 7).

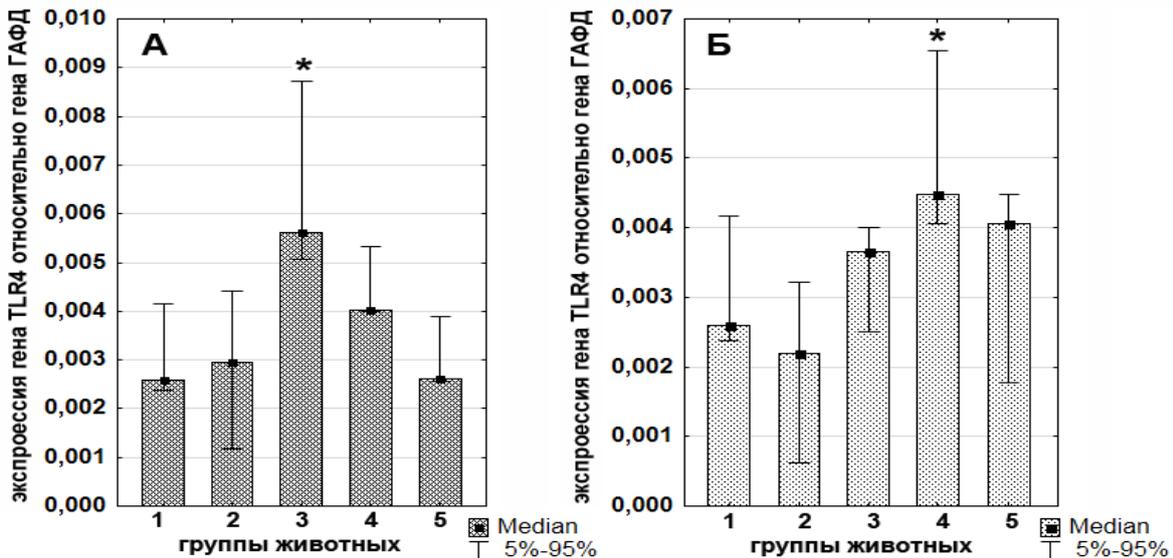


Рис. 7. Экспрессия гена TLR4 в спленоцитах крыс через 30 минут (А) и 3 часа (Б) после введения дефенсина RatNP-3, лактоферрина и овальбумина (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД).

Группы животных: 1 – интактные; 2 – после введения растворителя; 3 – после введения дефенсина; 4 – после введения лактоферрина; 5 – после введения овальбумина; (n=5 – 6)
* - p<0,05 vs гр.1 и 2 (по критерию Манна-Уитни)

Возможно, появление в организме повышенной концентрации белково-пептидных соединений из нейтрофилов является сигналом (сигналом тревоги – алармином), имитирующим стрессорное воздействие и тем самым вызывающим индукцию экспрессии гена TLR4.

Стоит отметить, что при введении крысам дефенсина RatNP-3 в количестве 100 мкг/кг веса животного (именно это количество использовалось в экспериментах) содержание пептида в крови не превышало его концентрацию при плавательном стрессе: через 30 минут после введения концентрация RatNP-3 в крови составила 257 ± 127 нг/мл (медиана – 200 нг/мл; LQ=71; UQ=504), что соответствует количеству пептида в крови через 3 часа после стресса – 246 ± 69 нг/мл (медиана – 225 нг/мл; LQ=153; UQ=339).

Содержание лактоферрина и миелопероксидазы в биологических жидкостях человека при определенных видах патологии.

В клинической практике значение показателей функциональной активности нейтрофилов связано, как правило, с использованием их для оценки резервных возможностей защитных функций, а также определения глубины и динамики патологических процессов как инфекционной, так и неинфекционной природы.

В работе исследована функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных туберкулезом. Антибактериальный потенциал нейтрофилов оценивали по содержанию катионных антимикробных белков и пептидов в этих клетках с помощью цитохимического лизосомально-катионного теста (ЛКТ) [Пигаревский, 1975], а их секреторную активность по содержанию в сыворотке крови МПО и ЛФ, определяемых иммуноферментным методом.

Выявлено уникальное сочетание изменений этих показателей у больных туберкулезом: значительное повышение уровня катионных антимикробных белков и пептидов в нейтрофилах и повышение содержания миелопероксидазы и лактоферрина в сыворотке крови (табл. 17).

Столь значительная активация системы нейтрофильных гранулоцитов при туберкулезе может иметь диагностическое значение, так как при неспецифических воспалительных заболеваниях, в частности, заболеваний почек регистрировалось резкое снижение показателей ЛКТ [Пигаревский, Мазинг, 1984].

Аналогичная картина выявлена при сравнении показателей врожденного иммунитета у больных туберкулезным спондилитом и гематогенным остеомиелитом позвоночника. У подавляющего большинства больных в острой стадии специфического и неспецифического спондилита обнаружено исключительно высокое содержание МПО и ЛФ. В то же время для больных туберкулезным спондилитом оказались характерными высокие показатели ЛКТ, тогда как при остеомиелите этого не происходит.

На основании комплекса полученных данных предложена методика (получен патент РФ на изобретение RU 2308723 25.06.2004) определения степени активности

туберкулезного спондилита, суть которой состоит в определении внутриклеточного и внеклеточного содержания индивидуальных лизосомально-катионных белков нейтрофильных гранулоцитов периферической крови. Величины СЦК лизосомально-катионного теста ≥ 1.6 , концентрации миелопероксидазы и лактоферрина в сыворотке крови не ниже 200 нг/мл и 1300 нг/мл соответственно свидетельствуют о наличии активного туберкулезного процесса. Предлагаемая методика позволяет судить о степени активности туберкулезного спондилита, сократить длительность периода обследования больного на 10-15 дней, своевременно начать противотуберкулезную терапию и позволить врачам решить вопрос о необходимости хирургического лечения.

Таблица 17. Показатели врожденного иммунитета у больных туберкулезом различной локализации

	Локализация туберкулезного процесса				
	легкие (n=20)	позвоночник (n=10)	почки (n=11)	глаза (n=10)	норма (n=10)
МПО (нг/мл)	730* (415; 842)	570* (475; 800)	950* (750; 1010)	755* (665; 900)	143 (110, 204)
ЛФ (нг/мл)	4010* (1650; 6025)	4200* (1870; 5700)	7300* (6700; 10000)	4750* (3900; 7700)	1137 (810, 1510)
МПО-отн (нг/кл)	170* (110; 229)	187* (102; 237)	342* (285; 447)	326* (300; 428)	47,7 (36,8, 68,0)
ЛФ-отн (нг/кл)	978* (524; 1393)	1003* (650; 1600)	2844* (2160; 3580)	2208* (1250; 2900)	379 (280, 503)
ЛКТ	1,75* (1,59; 1,88)	1,65* (1,59; 1,73)	1,83* (1,72; 1,97)	1,93* (1,59; 2,11)	1,56 (1,55; 1,57)

* – $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей нормой (по критерию Манна-Уитни)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

Примечание: МПО-отн и ЛФ-отн – относительная концентрация белков в крови в нанограммах на 1 миллион нейтрофилов

n – количество пациентов

Функциональная активность нейтрофилов изменяется не только в случае инфекционных заболеваний, но и при других неблагоприятных воздействиях. Результаты исследования уровня спонтанной и стимулированной форболмиристатацетатом генерации супероксидного радикала фагоцитами крови (табл. 18), а также секреторной активности нейтрофильных гранулоцитов и внутриклеточного содержания гранулярных белков нейтрофилов – МПО (табл. 19) и ЛФ (табл. 20), у больных со сложной сочетанной травмой и острой кровопотерей свидетельствуют о том, что содержание МПО в плазме крови у больных с острой кровопотерей и тяжелой сочетанной травмой повышены в течение 14 дней после травмы, что коррелирует с повышением количества нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови больных.

Внутриклеточное содержание ЛФ у пациентов с острой кровопотерей остается ниже нормы в течение всего периода наблюдения (14 суток после травмы), тогда как

у пациентов с тяжелой сочетанной травмой этот показатель через две недели нормализуется.

Таблица 18. Показатели спонтанного (НСТ-сп) и стимулированного (НСТ-ст) НСТ-теста (в условных единицах) у здоровых доноров и больных с острыми кровопотерями и тяжелой сочетанной травмой.

Группы	Сутки обследования					
	1		7		14	
	НСТ-сп	НСТ-ст	НСТ-сп	НСТ-ст	НСТ-сп	НСТ-ст
доноры (n=8)	95 (39; 129)	614 (403; 927)	-	-	-	-
кровопотеря (n=13)	13 (0; 34)	271* (249; 354)	34 (14; 50)	463 (304; 480)	43 (9; 136)	507 (311; 734)
травма (n=18)	0* (0; 11)	314* (179; 451)	26 (6; 58)	238* (210; 338)	11 (0; 43)	441 (174; 762)

* $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых доноров (по критерию Манна-Уитни)
Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

Таблица 19. Содержание МПО в плазме крови (МПО-пл) и нейтрофильных гранулоцитах крови (МПО-НГ) у больных с острой кровопотерей, тяжелой сочетанной травмой и здоровых доноров.

День обл.	Кровопотеря (n=13)		Травма (n=18)		Доноры (n=8)	
	МПО-пл нг/мл	МПО-НГ нг/млн клеток	МПО-пл нг/мл	МПО-НГ нг/млн клеток	МПО-пл нг/мл	МПО-НГ нг/млн клеток
1	313* (235; 436)	123 (78; 269)	348* (150; 563)	184 (128; 200)	106 (95; 224)	210 (165; 282)
7	324* (136; 396)	131 (124; 254)	419* (281; 510)	117* (75; 173)	-	-
14	248* (220; 375)	207 (173; 320)	429* (297; 595)	206 (73; 451)	-	-

* $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых доноров (по критерию Манна-Уитни)
Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

Таблица 20. Содержание ЛФ в плазме крови (ЛФ_пл) и в нейтрофильных гранулоцитах крови (ЛФ_НГ) у больных с острой кровопотерей, тяжелой сочетанной травмой и здоровых доноров.

День обл.	Кровопотеря (n=13)		Травма (n=18)		Доноры (n=8)	
	ЛФ_пл нг/мл	ЛФ_НГ нг/1000 клеток	ЛФ_пл нг/мл	ЛФ_НГ нг/1000 клеток	ЛФ_пл нг/мл	ЛФ_НГ нг/1000 клеток
1	2529 (505; 4659)	3,82* (2,17; 6,16)	2517 (1693; 3537)	3,31* (1,85; 6,06)	2050 (641; 3573)	9,83 (6,84; 15,45)
7	1393 (915; 4264)	5,59* (2,62; 5,97)	2853 (2172; 4764)	4,24* (2,24; 6,55)	-	-
14	1430 (862; 1859)	3,02* (2,10; 6,38)	3354 (2886; 4776)	10,64 (2,57; 13,17)	-	-

* $p < 0,05$ по сравнению с группой здоровых доноров (по критерию Манна-Уитни)
Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль)

В течение суток после травмы нейтрофилы пациентов демонстрируют сниженную способность к стимулированному дыхательному взрыву. У пациентов с тяжелыми сочетанными травмами этот дефект сохраняется в течение недели.

Таким образом, у больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей происходит снижение функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, а именно, снижение уровня генерации супероксидного радикала и внутриклеточный дефицит ЛФ, что может способствовать развитию инфекционных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антимикробные пептиды и белки присутствуют во всех живых организмах, как у животных, так и у растений. Они являются древнейшей частью системы жизнедеятельности и эволюционировали вместе с ней, вовлекаясь в функционирование систем, связанных и не связанных напрямую с антимикробной защитой.

В настоящей работе охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам открытые нами антимикробные пептиды, относящиеся к семейству дефенсинов – α -дефенсины PHD1, PHD2, PHD3, θ -дефенсины PhTD-1 и PhTD-3 из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*, θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3 из лейкоцитов макак-резуса *Macaca mulatta* и антимикробные пептиды асеницины из целомоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*), относящиеся к новой группе антимикробных пептидов.

Впервые показано, что циклические θ -дефенсины RTD-2, RTD-3 и RTD-1 макак-резуса *Macaca mulatta* представляют собой продукты посттрансляционной системы формирования разнообразия первичных структур антимикробных белково-пептидных соединений, основанной на сочетании процессинга и пептидной рекомбинации. В данном случае установлено, что за образование трех выделенных изоформ θ -дефенсинов ответственны только два гена демидефенсинов.

Кроме теоретического интереса, связанного с проблемой становления, и реализации механизмов врожденного иммунитета, открытие новых антибиотических пептидов, изучение особенностей их антибиотического действия, могут иметь важное практическое значение. Исследуемые антимикробные пептиды и белки могут быть перспективными объектами для применения в медицине и ветеринарии в качестве антибиотиков, противовоспалительных препаратов и иммуномодуляторов нового поколения.

Так, профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для разработки потенциального эндотоксин-нейтрализующего препарата – связывает ЛПС с высокой аффинностью, нормализует ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов, не усиливает перекисное окисление. Ранее было показано, что профенин не оказывает цитотоксического действия на эукариотические клетки [Wessely-Szponder et al., 2010].

В то же время нельзя сказать, что препараты, созданные на основе антибиотических пептидов, в настоящее время успешно внедряются в медицинскую

практику [Koo, Seo, 2019]. Возможно, причина в том, что эффекты действия АМП в условия *in vitro* и *in vivo* могут заметно различаться.

Результаты проведенного в настоящей работе скрининга антибиотических пептидов, связывающих ЛПС *in vitro*, на предмет выявления среди них молекул, обладающих эндотоксин-нейтрализующей активностью *in vivo*, показывают, что такая активность не зависит напрямую от способности пептидов связывать ЛПС *in vitro*. Для антибиотических пептидов – дефенсина человека HNP-1, профенина-1, протегрина-1, PR39 – продемонстрировано наличие эндотоксин-нейтрализующей активности в условиях целостного организма, но при этом ЛПС-нейтрализующая активность исследуемых антимикробных пептидов не проявлялась в экспериментах на выделенных моноцитах крови.

Такие различия для результатов экспериментов *in vivo* и *in vitro* позволяют предположить, что свойство антибиотических пептидов из нейтрофильных гранулоцитов, в частности дефенсинов, модулировать экспрессию генов цитокинов в целостном организме зависит не только от их способности нейтрализовать ЛПС, но и от их более широкого участия в регуляции защитных функций организма, в том числе и нейрогуморальной регуляции.

Первоначально основание для такого предположения дали работы канадской группы исследователей, которые показали, что некоторые α -дефенсины нейтрофильных гранулоцитов, названные кортикостатинами, ингибируют продукцию кортикостерона в культуре клеток коркового слоя надпочечников крысы. Это кортикостатическое действие *in vitro* на культуре клеток надпочечников, по предположению авторов было обусловлено конкурентным связыванием дефенсинов с рецептором АКТГ [Solomon, 1993]. Позднее сотрудниками отдела Общей патологии и патофизиологии Института экспериментальной медицины было показано, что парентеральное введение тотальных фракций α -дефенсинов крысы или кролика, которые содержат, в том числе, и кортикостатины, снижает уровень кортикостерона в крови при стрессе и отменяет стресс-индуцированную иммуносупрессию у экспериментальных животных [Шамова и др., 1993; Шамова и др., 1995; Korneva, Kokryakov, 2003].

В настоящем исследовании впервые показано, что введение крысам дефенсина RatNP-3, не являющегося по данным канадских исследователей кортикостатином, снижает стресс-индуцированное повышение уровня кортикостерона в крови экспериментальных животных в той же степени, как и кортикостатический дефенсин RatNP-1. Можно предположить, что кортикостатическое действие этих пептидов в целостном организме опосредуется не только через рецептор АКТГ на клетках надпочечников. Возможно, условия взаимодействия дефенсинов с рецептором АКТГ в экспериментах *in vitro* не полностью соответствуют реальным условиям организма.

В проведенной работе показано, что превентивное введение крысам дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 нормализует абсолютное число нейтрофилов в крови через 3 часа после стресса, когда абсолютное содержание нейтрофилов

увеличивалось. Также введение дефенсинов нормализует процентное содержание нейтрофилов. На основании полученных данных можно предположить, что дефенсины, секретлируемые нейтрофилами в кровь, вовлечены в формирование механизмов обратной связи, направленных на снижение числа циркулирующих нейтрофилов.

При экспериментальном моделировании плавательного стресса происходит повышение уровня экспрессии генов TLR4, ИЛ-4 и снижение уровня экспрессии гена ТФР- β в селезенке крыс, а введение дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов (RatNP-1, RatNP-3) экспериментальным животным снижает стресс-стимулированную экспрессию генов TLR4, ИЛ-4 и восстанавливает экспрессию гена ТФР- β . Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод об адаптогенном действии дефенсинов на организм при экспериментальном стрессе у крыс.

Эксперимент по иммунной нейтрализации дефенсинов, показывающий, что введение крысам антител к дефенсинам нейтрофильных гранулоцитов перед стрессирующим воздействием приводит к сохранению повышенного уровня кортикостерона через 3 часа после стресса, демонстрирует, что дефенсины нейтрофилов могут быть естественными регуляторами, поддерживающими гомеостаз в процессе развития стресс-реакции.

Другим важным компонентом гранул нейтрофильных гранулоцитов является лактоферрин – один из самых полифункциональных белков в организме млекопитающих, который, как было показано, проявляет также и стресс-протективное действие. Как и в случае с дефенсинами, предварительное введение лактоферрина человека снижает стресс-стимулированное повышение уровня кортикостерона в крови крыс и уровня экспрессии генов ИЛ-4 и TLR4 в селезенке.

Таким образом, молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, мобилизуемые в первые минуты и часы воздействия на организм неблагоприятных факторов, вовлечены не только в противомикробную защиту, но и в более широкий круг защитных реакций, а антимикробные пептиды и белки могут выполнять функцию эндогенных иммуномодуляторов и адаптогенов.

Если говорить о возможных механизмах таких эффектов дефенсинов и лактоферрина, то в первую очередь обращает на себя внимание катионный характер этих соединений, что позволяет предположить их действие на систему меланокортиновых рецепторов. Как известно, меланокортиновые рецепторы представляют из себя рецепторы, ассоциированные с G-белками, для которых показано, что пептидные соединения катионной природы могут являться негормональными регуляторами сигнальных систем, связанных с такими белками [Шпаков, 2009].

Для меланокортинового рецептора 2 типа (рецептора АКТГ) такое взаимодействие уже показано на примере кортикостатических дефенсинов. Позднее было показано, что, по крайней мере, два β -дефенсины человека (hBD1 и hBD3) являются лигандами для меланокортинового рецептора 1 [Kaelin, et al., 2008]. Не

исключено, что повышенная масса тела, наблюдаемая у мышей трансгенных по пептиду PR-39 [Zeng, et al., 2018] может быть вызвана именно конкуренцией катионного пептида с меланокортиновыми рецепторами, так как активация меланокортиновой системы приводит к уменьшению массы тела [Côté, et al., 2018].

Что касается лактоферрина, то возможно, что кортикостатическое действие ЛФ человека, впервые описанное нами, обусловлено его конкурентным связыванием с рецептором АКТГ (меланокортиновым рецептором 2), так как этот белок имеет в своей первичной структуре блок из четырех аргининов в N-концевой области молекулы, схожая конфигурация наблюдается у кортикостатических дефензинов и АКТГ. Эксперимент с трансгенным лактоферрином человека, у которого вместо четырех остатков аргинина присутствуют только два, показал, что такой лактоферрин не проявляет кортикостатической активности, то есть наше предположение имеет под собой основание.

В клинической практике значение показателей функциональной активности нейтрофилов связано, как правило, с использованием их для оценки резервных возможностей защитных функций, а также определения глубины и динамики патологических процессов как инфекционной, так и неинфекционной природы.

Ранее было установлено, что при заболеваниях инфекционной природы происходит снижение показателей лизосомально-катионного теста (суммарного показателя содержания катионных антимикробных пептидов и белков в нейтрофилах). Падение показателей ЛКТ на 50% от уровня возрастной нормы свидетельствует о развитии гнойных осложнений, а более чем на 90% предполагает высокую вероятность летального исхода [Пигаревский, 1988; Мазинг, 1995]. Показано, что по уровню экспрессии различных рецепторов и их соотношениям у нейтрофилов можно осуществить дифференциальную диагностику инфекций, вызываемых бактериями, ДНК- или РНК-вирусами [Lilius EM, Nuutila, 2012]

В проведенном диссертационном исследовании изучена функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных туберкулезом. Туберкулезный процесс приводит к определенным изменениям показателей врожденного иммунитета, а именно, к одновременному повышению концентрации антимикробных белков нейтрофилов (миелопероксидаза и лактоферрин) в сыворотке крови и внутриклеточного содержания катионных антимикробных белков и пептидов. Выраженность изменения зависит от локализации туберкулезного процесса, тяжести течения и характера возбудителя, в частности, на основе этих данных получен патент РФ «Способ определения активности туберкулезного спондилита» RU 2308723 C2 (опубликовано 20.10.2007).

Исследование уровня спонтанной и стимулированной форболмирилатацетатом генерации супероксидного радикала фагоцитами крови, а также секреторной активности нейтрофильных гранулоцитов и внутриклеточного содержания гранулярных белков нейтрофилов – МПО и ЛФ, у больных со сложной сочетанной травмой и острой кровопотерей, позволило констатировать снижение

функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, а именно, уровня генерации супероксидного радикала и внутриклеточный дефицит ЛФ, что может способствовать развитию инфекционных осложнений.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют говорить о том, что нейтрофилы высших позвоночных являются не только фагоцитарными клетками, но и участвуют в формировании механизмов поддержания гомеостаза благодаря секреции АМПБ, проявляющих свойства иммуномодуляторов и адаптогенов.

В то же время исследования изменений функциональных особенностей нейтрофильных гранулоцитов, в том числе и содержания АМПБ в биологических жидкостях и клетках организма при заболеваниях инфекционной природы или травмах позволяют осуществлять дифференциальную диагностику, прогнозировать течение заболеваний и способствовать раскрытию звеньев их патогенеза.

Дальнейшая разработка темы с изучением клеток-мишеней эндогенных антимикробных пептидов и белков и путей их сигнальной трансдукции позволит вывести решение проблемы коррекции различных патофизиологических процессов и создания новых лекарственных препаратов на основе эндогенных АМПБ на качественно новый уровень.

ВЫВОДЫ

1. Открыты и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды из лейкоцитов крови и костного мозга макак-резуса *Macaca mulatta*, относящиеся к семейству θ -дефенсинов – RTD-2 и RTD-3.

2. Циклические θ -дефенсины из лейкоцитов макак-резуса *Macaca mulatta* (RTD-2, RTD-3, RTD-1) представляют собой продукты посттрансляционной системы формирования разнообразия первичных структур антимикробных белково-пептидных соединений, основанной на сочетании процессинга и пептидной рекомбинации. За образование трех изоформ θ -дефенсинов ответственны только два гена, белковые продукты которых получили название демидефенсинов.

3. Открыты и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*, относящиеся к семейству дефенсинов – α -дефенсины PHD1, PHD2, PHD3 и θ -дефенсины PhTD-1 и PhTD-3. При сравнении первичных структур θ -дефенсинов близкородственных видов обезьян семейства марышковых (*Papio hamadryas* и *Macaca mulatta*) в их структуре выявлены только 2 синонимичные замены.

4. Открыты и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам новые антимикробные пептиды из целоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*), относящиеся к новой структурной группе антимикробных пептидов.

5. Введение лабораторным животным (крысам) антимикробных пептидов (дефенсин HNP-1, протегрин-1, PR39) и ЛПС снижает ЛПС-индуцированную

экспрессию гена интерлейкина 1β в мононуклеарных клетках крови крыс и увеличивает продукцию активных форм кислорода клетками крови и перекисное окисление липидов.

6. Профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для создания эндотоксин-нейтрализующего препарата – связывает ЛПС с высокой аффинностью, нормализует ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов клетками иммунной системы и эндотелия, не усиливая перекисное окисление липидов.

7. Введение дефенсинов крысы RatNP-1 и RatNP-3 экспериментальным животным (крысам) в равной степени снижает стресс-индуцированный подъем кортикостерона в крови, оказывает нормализующее действие на индуцированные стрессом изменения клеточного состава крови крыс и модулирует стресс-индуцированные изменения экспрессии генов цитокинов интерлейкина 4, трансформирующего фактора роста бета и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках селезенки.

8. Эндогенные дефенсины крысы участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции.

9. Введение лактоферрина человека экспериментальным животным (крысам) снижает стресс-индуцированный подъем кортикостерона в крови, модулирует стресс-индуцированные изменения клеточного состава крови крыс и экспрессии гена цитокина интерлейкина 4 и Toll-подобного рецептора TLR4 в клетках селезенки. Кортикостатическое действие лактоферрина человека зависит от аминокислотной последовательности в N-концевой области молекулы.

10. Изменения содержания ЛФ и МПО в плазме крови у пациентов с туберкулезом и травмами отражают ход течения заболевания, дают возможность осуществлять дифференциальную диагностику и способствуют раскрытию звеньев патогенеза заболеваний

11. Комплекс проведенных исследований расширяет представления о структурном и функциональном разнообразии молекулярных факторов врожденного иммунитета, позволяет установить степень вовлеченности антимикробных пептидов и белков в регуляцию защитно-приспособительных реакций в качестве эндогенных иммуномодуляторов и адаптогенов, что является новым шагом в решении важной задачи современной патологической физиологии – адресной коррекции нарушений механизмов защиты.

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Алешина, Г.М.** Иммуномодулирующее действие дефенсина RatNP-1 – антибиотического пептида из нейтрофилов крысы, в условиях экспериментального стресса / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Российский иммунологический журнал. – 2017. – Т. 11(20), № 4. – С. 673-675.

2. **Алешина, Г.М.** Лактоферрин человека модулирует экспрессию гена рецептора TLR4 в селезенке крысы в условиях экспериментального стресса / Г.М.

Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10 (19), № 2(1). – С. 60-62.

3. **Алешина, Г.М.** Стресс-протективное действие лактоферрина человека / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, Е.Т. Захарова, В.Н. Кокряков // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова 2016. Т. 102, № 7. С. 846-851.

4. Цветкова, Е.В. Антимикробные свойства α -дефенсинов из лейкоцитов крови павиана гамадрила *Papio hamadryas* / Е.В. Цветкова, Л.Е. Леонова, **Г.М. Алешина**, [и др.] // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2016. Т. 52. № 2. С. 118-125.

5. Янкелевич, И.А. Особенности развития стресс-реакции у крыс при стрессирующем воздействии и введении антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 / И.А. Янкелевич, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков // Медицинский академический журнал. – 2014. – Т. 14. № 4. – С. 63-67.

6. **Алешина, Г.М.** Особенности дегрануляции нейтрофильных гранулоцитов под действием различных стимуляторов / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2; URL: www.science-education.ru/116-12479

7. Кокряков, В.Н. Антимикробные пептиды животных как молекулярные факторы иммунитета / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, М.Н. Берлов [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Т. 8 (17), № 3. – С. 325-328.

8. **Алешина, Г.М.** Эндотоксин-нейтрализующее действие антимикробных пептидов / Г.М. Алешина, О.В. Шамова, С.В. Перекрест [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2013. – Т. 12, № 1-2. – С. 72-77.

9. **Алешина, Г.М.** Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов крыс / Г.М. Алешина, И.А. Янкелевич, В.Н. Кокряков // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 7). – С. 1347-1351

10. Кокряков, В.Н. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова [и др.] // Медицинский академический журнал. 2010. Т. 10. № 4. С. 149-160.

11. Stegemann, C. De novo sequencing of two new cyclic theta-defensins from baboon (*Papio hamadryas*) leukocytes by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry / C. Stegemann, E.V. Tsvetkova, **G.M. Aleshina** [et al] // Rapid Commun Mass Spectrom. – 2010. – Vol. 24, No. 5. – P. 599-604.

12. **Алешина, Г.М.** Экспрессия генов эндогенных биорегуляторов – цитокинов и нейропептида орексина – в условиях стрессорного воздействия и введения иммуномодулирующего препарата Деринат / Г.М. Алешина, Н.С. Новикова, Т.В. Абрамова [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 18-22.

13. Цветкова, Е.В. α -Дефенсины из лейкоцитов крови обезьяны *Papio hamadryas* / Е.В. Цветкова, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова [и др.] // Биохимия. – 2006. – Т. 71, вып. 8. – С. 1083-1090

14. Кокряков, В.Н. Катионные противомикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета: мультифункциональность / В.Н. Кокряков, Л.В. Ковальчук, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 2. – С. 98-105.
15. Сахарова, И.Я. Показатели иммунитета и биологические свойства микобактерий при инфильтративном туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг, Б.И. Вишневский, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 11. – С. 14-18.
16. Ovchinnikova, T.V. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* / T.V. Ovchinnikova, **G.M. Aleshina**, S.V. Balandin [et al] // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 577. – P. 209-214.
17. Краснодембская, А.Д. Оценка разнообразия антимикробных пептидов из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* (Annelida, Polychaeta) / А.Д. Краснодембская, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков [и др.] // Вестн. С.-Петербургского ун-та. Сер.3. – 2004. – № 4. – С. 93-96.
18. Сахарова, И.Я. Показатели приобретенного иммунитета и катионные белки нейтрофильных гранулоцитов при туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 10. – С.50-53.
19. Ботерашвили, Н.М. Миелопероксидаза и лактоферрин в сыворотке крови и ликворе детей больных менингитом / Н.М. Ботерашвили, **Г.М. Алешина**, М.Н. Сорокина, В.В. Иванова // Медицинская иммунология. – 2002. – Т. 4, № 4-5. – С. 565-572.
20. Кокряков В.Н. Достижения и проблемы в изучении антибиотических пептидов животного происхождения / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова [и др.] // Вестник РАМН. – 2002. – № 12. – С. 15-20.
21. Кокряков, В.Н. Антимикробные пептиды как молекулярные факторы иммунитета / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова // Медицинский академический журнал. – 2002. – Т. 2, № 4. – С. 29-38.
22. Leonova L.E. Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity / L.E. Leonova, V.N. Kokryakov, **G.M. Aleshina** [et al] // Journal of Leukocyte Biology. – 2001. – Vol. 70. – P. 461-464.
23. Краснодембская А.Д. Новые антимикробные пептиды из целомоцитов пескожила *Arenicola marina* / А.Д. Краснодембская, **Г.М. Алешина**, П.А. Лодыгин [и др.] // Вестн. С.-Петербургского ун-та. Сер. 3. – 2001 – вып. 4. – С. 104-108.
24. Кокряков В.Н. Развитие концепции "цитаз" И.И.Мечникова в современных медико-биологических исследованиях / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова [и др.] // Вестн. С.-Петербургского ун-та. Сер.3. – 1998. – вып.4, № 24. – С. 41-46.
25. Кокряков В.Н. Дефенсины и родственные им антибиотические пептиды в эволюции защитных систем животных / В.Н. Кокряков, В.Е. Стефанов, **Г.М.**

Алешина [и др.] // Журнал эволюц. биохимии и физиологии. – 1997. – Т. 33, № 1. – С. 109-123.

Статьи, опубликованные в других изданиях:

1. **Алешина, Г.М.** Лактоферрин – эндогенный регулятор защитных функций организма / Г.М. Алешина // Медицинский академический журнал. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 35-44.

2. **Aleshina, G.M.** The corticostatic effect of human lactoferrin depends on the amino acid composition of the N-terminus of the molecule / G.M. Aleshina // Медицинский академический журнал. – 2019. – Supplement. – P. 159-160.

3. Цветкова, Е.В. α -Дефенсины нейтрофильных гранулоцитов обезьяны *Rapio hamadryas* как молекулярные факторы врожденного иммунитета / Е.В. Цветкова, **Г.М. Алешина**, Л.Е. Леонова, [и др.] // в Сб. «Нервная система», Вып. 39. Под ред. Е.Г.Скворцевича, Н.Д.Ещенко.– СПб.: СПбГУ, 2005. – С. 209-214

4. Сахарова, И.Я. Жизнеспособность микобактерий туберкулеза и показатели иммунитета при инфильтративном туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.И. Вишневецкий, Б.Е. Кноринг, Л.А. Скворцова, Г.Ю. Васильева, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков, (Левашов Ю.Н. – гл. редактор сборника) // в Сб. «Актуальные вопросы диагностики и лечения туберкулеза». – СПб.: ФГУ СПб НИИ фтизиопульмонологии, 2005. – С. 268-271.

5. Кокряков, В.Н. Антибиотические пептиды как регуляторные молекулы / В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, О.В. Шамова, [и др.] // в Сб. «Нервная система», Под ред. Е.Г.Скворцевича, Н.Д.Ещенко. – СПб.: СПбГУ, 2004. – С. 52-63

6. Ариэль, Б.М. Сравнительное исследование защитных факторов нейтрофильных гранулоцитов и характера специфического иммунного ответа при легочном и внелегочном туберкулезе / Б.М. Ариэль, И.Я. Сахарова, Л.А. Скворцова, Б.Е. Кноринг, Р.К. Ягафарова, В.Н. Гусева, О.А. Якунова, Е.И. Потапенко, **Г.М. Алешина**, Н.С. Новикова, В.Н. Кокряков // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Туберкулез. Проблемы диагностики, лечения и профилактики». – СПб.: СПб ГУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, 2003. – С. 119-124.

7. Сахарова, И.Я. Комплексное исследование защитных факторов нейтрофильных лейкоцитов и характера специфического иммунного ответа при туберкулезе легких / И.Я. Сахарова, Б.М. Ариэль, Л.А. Иванова, Б.Е. Кноринг, О.А. Якунова, В.Н. Кокряков, **Г.М. Алешина**, Т.Б. Ряснянская // Сб. «Туберкулез в Северо-Западном регионе России: Современные проблемы», вып.2. – СПб., 2002. – С. 65-74.

8. Шендерова, Р.И. Вклад факторов естественной резистентности нейтрофильного происхождения в направление и интенсивность специфического ответа у больных туберкулезом почек / Р.И. Шендерова, Р.К. Ягафарова, Е.И. Потапенко, М.О. Кусурсуз, О.Л. Короленок, Е.А. Сушкова, О.А. Якунова, Н.С.

Новикова, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // Сб. «Туберкулез в Северо-Западном регионе России: Современные проблемы». – СПб., 2001. – С. 61-66.

Тезисы докладов основные:

1. **Aleshina, G.M.** Stress-protective effect of antimicrobial peptide defensin RatNP-3 / G.M. Aleshina, I.A. Yankelevich, V.N. Kokryakov // Abstracts of VI International symposium "Interaction of the nervous and immune systems in health and disease" June 20 – June 23, 2017, Saint-Petersburg. Russia, P. 6-7.

2. **Aleshina, G.** Defensin RatNP-3 as an immunomodulator and a corticostatin / Aleshina G., Yankelevich I., Kokryakov V. // Abstracts of 5th Antimicrobial Peptide Symposium, Montpellier, France, 6-8 June, 2016, P. 119

3. **Aleshina, G.M.** Immunomodulating effect of antimicrobial peptide defensin RatNP3 / G.M. Aleshina, I.A. Yankelevich, V.N. Kokryakov // Abstracts of the 4th European Congress of Immunology - ECI 2015 – September 6-9, Vienna, Austria, P. 328.

4. **Aleshina, G.M.** Immunomodulating effect of human lactoferrin / G.M. Aleshina, I.A. Yankelevich, V.N. Kokryakov // Abstracts of V International symposium "Interaction of the nervous and immune systems in health and disease" June 23 – June 26, 2015, Saint-Petersburg. Russia, P. 6.

5. **Aleshina, G.M.** Administration of antimicrobial peptide defensin changes the gene expression of interleukin 1 β , interleukin 4 and Toll-like receptor 4 in rat splenocytes under stress conditions / G.M. Aleshina, I.A. Yankelevich, V.N. Kokryakov // Neuroimmunomodulation. – 2014. – Vol. 21 (suppl 1). – P. 22-23. Abstracts of 9th Congress of the International Society of Neuroimmunomodulation (ISNIM). Liège, Belgium, 25-27 September, 2014:

6. **Aleshina, G.M.** Stress-protective effect of human lactoferrin / G.M. Aleshina, I.A. Yankelevich, V.N. Kokryakov // Acta Naturae. – Special Issue №1. International Conference on Bioorganic Chemistry, Biotechnology and Bionanotechnology. September 15-19, 2014, Moscow, Russia, P. 13.

7. Yankelevich, I. Human lactoferrin reduces the stress-induced level of plasma corticosterone and IL-4 gene expression in spleen in rats under experimental stress / Yankelevich I., **Aleshina G.**, Kokryakov V. // Abstracts of XI International Conference on Lactoferrin Structure, Function & Applications. October 6-10, 2013, Rome, Italy, P. 30.

8. Yankelevich, I.A. Administration of antimicrobial peptide defensin changes the gene expression of the pro- and anti-inflammatory cytokines in rats under stress conditions / I.A. Yankelevich, **G.M. Aleshina**, V.N. Kokryakov // Abstracts of IV International symposium "Interaction of the nervous and immune systems in health and disease" June 18 – June 21, 2013, Saint-Petersburg. Russia, P. 82.

9. **Алешина, Г.М.** Иммуноферментное определение содержания дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов в плазме крови крыс в условиях экспериментального стресса / Г.М. Алешина, И.А. Янкевич // Тезисы докладов объединенного иммунологического форума. 30 июня – 5 июля 2013, г. Нижний Новгород. Российский иммунологический журнал. 2013. Т. 7(16), № 2-3. С. 127-128.

10. Kokryakov, V.N. Antimicrobial peptides of animals as molecular factors of innate immunity / V.N. Kokryakov, **G.M. Aleshina**, O.V. Shamova, [et al] // FEBS Journal. 2013. Vol. 280, Issue Supplement s1. P. 491. Abstracts of 38th FEBS Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6–11, 2013

11. **Aleshina, G.M.** Endogenous antibiotic peptides as potential endotoxin-neutralizing medications / G.M. Aleshina, O.V. Shamova, S.V. Perekrest, [et al] // Abstracts of III International Symposium “Interaction of the nervous and immune systems in health and disease”, June 7 – June 10 2011, Saint Petersburg, Russia. P. 5

12. **Алешина, Г.М.** Лактоферрин и миелопероксидаза в клетках и биологических жидкостях организма при различных патологиях / Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // Материалы Объединенного иммунологического форума, Санкт-Петербург, 30 июня – 5 июля 2008 г. Российский иммунологический журнал. 2008. Т. 2 (11), № 2-3. С. 147.

13. Chesnokov, O.D. The experience of employment of functional test-systems in traumatology and surgery / O.D. Chesnokov, S.N. Shanin, E.G. Rybakina, **G.M. Aleshina**, A.E. Chikin, S.F. Bagnenko // Abstracts of the International Symposium “Interaction of the nervous and immune systems in health and disease” May 31 – June 2, 2007. Saint-Petersburg, Russia. P. 17.

14. Керко, О.В. Роль иммунологических показателей при туберкулезе и остеомиелите позвоночника / О.В. Керко, В.Н. Гусева, Е.И. Потапенко, О.А. Якунова, Н.С. Новикова, **Г.М. Алешина**, В.Н. Кокряков // Материалы IX Всероссийского научного форума с международным участием им. акад. В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», 23-26 мая 2005 г. Медицинская иммунология. 2005, Т.7, № 2-3. С.243.

Патенты:

1. Пептиды асеницины, выделенные из морского кольчатого червя *Arenicola marina*, обладающие антимикробным действием. Овчинникова Т.В., **Алешина Г.М.**, Баландин С.В., Маркелов М.Л., Краснодембская А.Д., Кокряков В.Н. Патент на изобретение RUS 2261866 10.02.2004

2. Способ определения активности туберкулезного спондилита. Гусева В.Н., Керко О.В., Новикова Н.С., **Алешина Г.М.**, Кокряков В.Н., Шендерова Р.И., Сушкова Е.А. Патент на изобретение RU 2308723 25.06.2004.

Список сокращений

LAL-тест – количественный хромогенный Лимулюс тест (Limulus amoebocyte lysate)

TLR4 – Toll-подобный рецептор 4

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АМА – антимикробная активность

АМПБ – антимикробные пептиды и белки

АМП – антимикробные пептиды

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗФР – забуференный «физиологический» раствор – 0,01М Na-фосфатный буфер, рН 7,2-7,4 с 0,14М NaCl

ИЛ – интерлейкин

ЛКТ – лизосомально-катионный тест

ЛПС – липополисахарид

ЛФ – лактоферрин

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МПО – миелопероксидаза

НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием

ОА – овальбумин

ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТФР-β – трансформирующий фактор роста бета

ФНО-α – фактор некроза опухолей альфа

Однбуквенное обозначение аминокислотных остатков:

А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, Е – глутаминовая кислота, рЕ – пироглутаминовая кислота, F – фенилаланин, G – глицин, H – гистидин, I – изолейцин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, N – аспарагин, P – пролин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, W – триптофан, Y – тирозин