

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научные консультанты:

академик РАН, д.м.н., профессор
доктор биологических наук, профессор

Корнева Елена Андреевна
Кокряков Владимир Николаевич

Санкт-Петербург

2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. Обзор литературы	18
1.1 История вопроса	18
1.2 Современное состояние проблемы	22
1.2.1 Антимикробные пептиды бактерий	30
1.2.2 Антимикробные пептиды грибов и растений	30
1.2.3 Антимикробные пептиды кишечнорастворимых, моллюсков и членистоногих	31
1.2.4 Антимикробные пептиды рыб и земноводных	32
1.2.5 Антимикробные пептиды рептилий и птиц	33
1.2.5.1 Кателицидины рептилий и птиц	33
1.2.5.2 β -Дефенсины рептилий и птиц	34
1.2.6 Антимикробные пептиды млекопитающих	35
1.2.6.1 Кателицидины млекопитающих	35
1.2.6.2 Дефенсины млекопитающих	38
1.2.6.2.1 α -Дефенсины млекопитающих	38
1.2.6.2.2 β -Дефенсины млекопитающих	39
1.2.6.2.3 θ -Дефенсины	40
1.2.6.3 Антимикробные пептиды из тромбоцитов, потовых желез и печени	43
1.2.7 Антимикробные пептиды, выделенные и охарактеризованные сотрудниками Отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины"	44
1.3 Механизмы антибактериального действия катионных антимикробных пептидов	47
1.3.1 Мембрано-дезорганизирующие катионные антимикробные пептиды	48
1.3.2 Антимикробные пептиды, не разрушающие мембраны	51
1.3.2.1 Антимикробные пептиды, реализующие свое действие посредством связывания с нуклеиновыми кислотами	52
1.3.2.2 Антимикробные пептиды, осуществляющие свое действие через влияние на синтез белка	53
1.3.3 Синергическая активность антимикробных пептидов	53

1.4 Биологические функции антимикробных пептидов отличные от антибиотических	54
1.4.1 Антимикробные пептиды как хемоаттрактанты	54
1.4.2 Антимикробные пептиды как дегрануляторы тучных клеток	55
1.4.3 Антимикробные пептиды модулируют продукцию хемокинов и цитокинов	56
1.4.4 Антимикробные пептиды как стимуляторы фагоцитоза	57
1.4.5 ДНК- и РНК-опосредованная активация TLR антимикробными пептидами	58
1.4.6 Ингибирование антимикробными пептидами агонист-опосредованной активации TLR	58
1.4.7 Участие антимикробных пептидов в реализации защитных функций организма <i>in vivo</i>	60
1.4.8 Действие антимикробных пептидов на ангиогенез и заживление ран	62
1.4.9 Кортикостатическое действие антимикробных пептидов	62
1.5 Современные представления о системе нейтрофильных гранулоцитов	64
1.5.1 Морфология нейтрофильных гранулоцитов	64
1.5.2 Миграция нейтрофильных гранулоцитов	70
1.5.3 Фагоцитоз и дегрануляция	71
1.5.4 Нейтрофильные внеклеточные ловушки	73
1.5.5 Нейтрофильные гранулоциты и системные воспалительные заболевания	75
1.5.6 Пластичность нейтрофильных гранулоцитов	76
1.5.7 Нейтрофильные гранулоциты и адаптивный иммунитет	77
1.6 Миелопероксидаза	78
1.7 Лактоферрин	82
ГЛАВА 2. Материалы и методы	93
2.1 Экспериментальные животные	93
2.2 Выделение и очистка антимикробных пептидов и белков	93
2.2.1 Выделение лактоферрина и миелопероксидазы из лейкоцитов человека	95
2.2.2 Синтез θ -дефенсинов RTD-1, RTD-2 и RTD-3	96
2.3 Удаление примеси эндотоксина (липополисахарида)	96
2.4 Определение примеси эндотоксина в пробах и оценка ЛПС-связывающей активности пептидов	96
2.5 Электрофоретические методы	97

2.5.1 Электрофорез в полиакриламидном геле в кислой буферной системе в присутствии мочевины	97
2.5.2 Диск-электрофорез в полиакриламидном геле присутствии додецилсульфата натрия	97
2.6 Определение дисульфидных связей	98
2.7 Определение молекулярных масс пептидов	99
2.8 Определение аминокислотных последовательностей пептидов	99
2.9 Определение структуры генов, кодирующих ареницины и θ -дефенсинов RTD-2 и RTD-3	100
2.9.1 Определение структуры генов, кодирующих ареницины	100
2.9.2 Определение структуры генов, кодирующих θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3	101
2.10 Оценка антимикробной активности выделенных пептидов	101
2.11 Исследование эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов	103
2.11.1 Модель для испытания эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов <i>in vitro</i>	103
2.11.2 Модель для испытания эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов <i>in vivo</i>	104
2.12 Экспериментальные модели стресса	104
2.12.1 Электролевой стресс	104
2.12.2 Плавательный стресс	105
2.12.3 Модели холодового стресса	105
2.13 Исследование экспрессии генов	105
2.13.1 Выделение РНК и получение кДНК	105
2.13.2 Проведение полимеразной цепной реакции	106
2.14 Исследование генерации супероксидного радикала	107
2.15 Определение уровня диеновых конъюгатов в плазме	109
2.16 Дегрануляция нейтрофилов фобол-12-мирилат-13-ацетатом	109
2.17 Иммунохимические методы исследования	110
2.17.1 Получение антисывороток к лактоферрину, миелопероксидазе и дефенсинам	110
2.17.1.1 Конъюгирование дефенсинов крысы с овальбумином	110

2.17.1.2 Иммунизация кроликов лактоферрином, миелопероксидазой или конъюгатом дефенсинов с овалбумином	110
2.17.2 Выделение антител к лактоферрину, миелопероксидазе и дефенсинам крысы из антисывороток	111
2.17.2.1 Связывание белков и пептидов с цианоген бромид-активированной агарозной матрицей	111
2.17.2.2 Получение моноспецифических иммуноглобулинов	111
2.17.3 Конъюгация антител с пероксидазой хрена	112
2.17.4 Иммуноцитохимический метод контроля сыворотки на наличие специфических антител	112
2.17.5 Процедура иммуноферментного определения концентрации миелопероксидазы, лактоферрина, дефенсина RatNP-3 в биологических жидкостях	113
2.18 Лизосомально-катионный тест	114
2.19 Иммуноферментное определение концентрации кортикостерона, адренкортикотропного гормона, норадреналина и цитокинов	114
2.20 Клинический материал	115
2.21 Статистическая обработка результатов	115
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение	116
3.1 Поиск и идентификация новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов макака-резуса <i>Macaca mulatta</i>	116
3.1.1 Аминокислотные последовательности выделенных дефенсинов	119
3.1.2 Сравнительный анализ натуральных и синтетических дефенсинов	121
3.2 Поиск и идентификация новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов гамадрила <i>Papio hamadryas</i>	124
3.2.1 Молекулярные массы выделенных пептидов	127
3.2.2 Первичные структуры выделенных пептидов	128
3.2.3 Антимикробная активность дефенсинов PHD1-3	129
3.2.4 Идентификация антимикробных пептидов лейкоцитов гамадрила с молекулярной массой менее 3 кДа	131
3.3 Антибиотические пептиды из целоцитов пескожила	137

3.3.1 Анализ кислотного экстракта из целомацитов пескожила и выделение из него индивидуальных фракций антимикробных пептидов	138
3.3.2 Антимикробная активность выделенных пептидов	143
3.3.3 Молекулярная масса ареницинов	145
3.3.4 Первичная структура ареницинов	145
3.4 Разработка иммуноферментных тест-систем для количественного определения пептидов и белков нейтрофильных гранулоцитов	149
3.4.1 Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов крыс	150
3.4.2 Разработка иммуноферментных тест-систем для количественного определения МПО и ЛФ из нейтрофильных гранулоцитов человека	153
3.5 Антимикробные пептиды как соединения, модулирующие ЛПС-индуцированную воспалительную реакцию	155
3.6 Иммуномодулирующее действие антимикробных пептидов и белков в условиях стрессирующего воздействия	167
3.6.1 Особенности развития стресс-реакции в условиях экспериментальной модели плавательного стресса	173
3.6.2 Иммуномодулирующее действие дефенсинов из нейтрофилов крысы при экспериментальном плавательном стрессе у крыс	178
3.6.3 Иммуномодулирующее действие лактоферрина человека при экспериментальном плавательном стрессе у крыс	186
3.7 Функциональная активность компонентов врожденного иммунитета у больных туберкулезом	194
3.7.1 Исследование показателей врожденного иммунитета у больных туберкулезом легких	198
3.7.2 Показатели врожденного иммунитета у больных внелегочным туберкулезом	203
3.7.2.1 Туберкулез почек	203
3.7.2.2 Спондилит	205
3.8 Функциональная активность компонентов врожденного иммунитета у больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей	210
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	218

ВЫВОДЫ	227
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	229
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	233

ВВЕДЕНИЕ

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., 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 многие другие [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 [Woman, 1995]. С другой стороны, возможно, в ходе эволюции происходило закрепление свойств АМПБ как регуляторов других защитных реакций у высших животных.

В частности, установлено участие АМПБ в регуляции иммунного ответа. Показано, что сериновые протеиназы могут расщеплять молекулы, вовлеченные в активацию Т-клеток, такие как 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 (**f**ormyl **p**eptide **r**eceпtor-**l**ike 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 дефензинов на стероидогенез клетками коркового слоя надпочечников, индуцированный адренокортикотропным 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 макака-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*), целомочитов 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 целомоцитов кольчатого червя пескожила (*Arenicola marina*) – асеницины, 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 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 ареницины из целоцитов 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. академиком 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

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.

Благодарности. Автор выражает благодарность д.х.н., профессору Т.В. Овчинниковой (Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова) за помощь в определении первичной структуры и строения генов ареницинов, профессору Ральфу Хоффманну (Университет г. Лейпцига, ФРГ) за помощь в определении первичной структуры тета-дефенсинов из лейкоцитов обезьяны *Rapio hamadryas*, профессору Роберту Лереру (Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США) за помощь в определении первичной структуры и строения генов θ -дефенсинов RTD-2 и RTD-3 из лейкоцитов обезьяны *Macaca mulatta* и первичной структуры альфа-дефенсинов из обезьяны *Rapio hamadryas*. Особая благодарность научным сотрудникам лаборатории нейроиммунофизиологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Н.С. Новиковой и С.В. Перекрест за постановку ЛКТ-теста. Автор выражает глубокую признательность всему коллективу отдела Общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ» за помощь в проведении экспериментов и научным консультантам академику РАН Е.А. Корневой и д.б.н., профессору В.Н. Кокрякову.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Молекулярные механизмы защиты от инфекции, мобилизующиеся в первые минуты и часы взаимодействия организма с патогенами и их роль в развитии сопутствующих патофизиологических процессов (воспаление, лихорадка и др.) остаются предметом интенсивных медико-биологических исследований. Именно эти механизмы защиты от микроорганизмов (врожденный иммунитет) предшествовали в эволюции животных появлению приобретенного (адаптивного) иммунитета, представленного в развитой форме только у позвоночных. Реализация экстренной защиты осуществляется с участием специальных распознающих и эффекторных молекулярных факторов. По современным представлениям функции эффекторных молекул выполняют антимикробные пептиды и белки (АМПБ).

Наиболее интенсивно изучение АМПБ осуществлялось в течение последних десятилетий рядом научных школ, в числе которых ведущую роль играли американская – профессора Р. Лерера [Lehrer et al., 1993], шведская – профессора Х. Бомана [Boman, 1995], французская – лауреата Нобелевской премии Ж. Хоффманна [Hoffmann, 2003] и канадская – профессора Р. Хэнкока [Hancock, 1997]. Важный вклад в разработку этой проблемы внесли и отечественные ученые, в частности, еще с начала 70-х годов XX века сотрудники Института экспериментальной медицины АМН СССР под руководством профессоров В.Е. Пигаревского и В.Н. Кокрякова проводили совместные с кафедрой биохимии Ленинградского государственного университета (ныне СПбГУ) и другими научными учреждениями исследования по поиску, выделению и структурно-функциональному анализу антимикробных пептидов (дефенсинов, кателицидинов и др.) и белков (лактоферрина, миелопероксидазы и др.) и оценке их значимости во врожденном иммунитете [Ашмарин и др., 1972; Пигаревский, 1988].

1.1 История вопроса

Многие считают изучение АМПБ относительно новой темой, тем не менее, история открытия эндогенных противомикробных веществ начинается практически одновременно с открытием антиген-специфических антител, на существование которых

в 1890 году указал немецкий врач Эмиль фон Беринг совместно с Сибасабуро Китасато [von Behring, Kitasato, 1890]

В 1887 году Fodor J. [Fodor, 1887] был одним из первых, кто обратил внимание на антрацидное действие (антибактериальное действие против возбудителя сибирской язвы *Bacillus anthracis*) дефибринированной крови. В дальнейшем было показано, что антрацидная активность сыворотки крысы выдерживала нагрев при 60°C в течение часа и, что термостабильный антрацидный фактор сыворотки крови оказался бактерицидным для различных грамположительных бактерий [Pirenne, 1904], этот фактор получил название бета-лизин [Pettersson, 1926] в отличие от термолабильного альфа-лизина.

Уже современные исследования показали, что бета-лизины – это катионные полипептиды, имеющие тромбоцитарное происхождение [Donaldson, Tew, 1977] и являются протеолитическими фрагментами тромбоцитарных белков, в частности, тромбоцитарного фактора IV [Yeaman, 2010].

Альфа-лизин было не самое распространенное название термолабильного бактерицидного фактора нормальной сыворотки крови. Ганс Бухнер дал такому фактору имя «алексин» (от греческого "отразить") [Buchner, 1891], а Эрлих предложил название «комплément» [Ehrlich, 1906]. Термины "алексин" и "комплément" сосуществовали долгое время, хотя еще в 1928 году была показана фактическая идентичность этих соединений [Gordon, Wormall, 1928].

Свое название для бактерицидных факторов крови предложил И.И. Мечников – "цитазы", предположив, что эти соединения находятся в цитоплазме фагоцитов, обеспечивая завершенность фагоцитоза, а в случае разрушения лейкоцитов, могут действовать внеклеточно [Мечников, 1903].

Такое предположение имело под собой основание, так как было установлено, что экстракты лейкоцитов были гораздо более активны против грамотрицательных [Buchner, 1894] и грамположительных бактерий [Мечников, 1903.], чем соответствующая сыворотка от тех же самых экспериментальных животных. Эти результаты указывали на наличие других антибактериальных факторов в лейкоцитах, которые не были связаны с алексином.

В 1905 году A. Petterson выделил из лейкоцитов гноя человека антимикробные субстанции, которые по заключению автора представляли смесь щелочных (катионных, основных) протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб [Pettersson, 1905].

В 1909 году Шнайдер назвал эту группу антибактериальных веществ «лейкинами», отделив их от алексинов на основании их большей термостабильности, антибактериальной селективности для грамположительных бактерий и их источника [Schneider, 1909.].

В 1956 году Хирш [Hirsch, 1956] продемонстрировал бактерицидный материал, присутствующий в цитоплазме нейтрофилов кролика, человека и морских свинок, активный против нескольких видов грамотрицательных бактерий. Хирш назвал это соединение "фагоцитином" и предположил, что оно, вероятно, аналогично или идентично "лейкинам".

Одним из первых антимикробных белков, найденных в различных секретах и тканях, а не только в лейкоцитах и сыворотке крови, был лизоцим – фермент, разрушающий клеточные стенки грамположительных бактерий путём гидролиза их пептидогликана. История его открытия хорошо известна – Александр Флеминг нанес слизь из носа человека, страдающего насморком, на чашку Петри с высеянными бактериями и наблюдал лизис бактерий в местах нанесения. В своей оригинальной статье об обнаружении лизоцима А. Флеминг [Fleming, 1922] сообщил, что он активен и в отношении некоторых грамотрицательных бактерий-патогенов. Позднее было показано, что лизоцим в очищенном состоянии не обладает широким спектром антимикробного действия, а антибактериальная активность, в частности, слюны и слез обусловлена, по большей части, наличием в этих жидкостях других факторов [Thompson, 1941] или, что более вероятно, синергическим действием нескольких факторов, включая лизоцим.

Дальнейший поиск антибиотических соединений позволил выявить в различных тканях полипептиды основной (катионной, щелочной) природы, проявляющие антимикробные свойства. Пептид из тимуса телят, проявляющий активность против микобактерий, также был основным, содержал большое количество лизина и аргинина и имел изоэлектрическую точку между рН 10 и 11 [Dubos, Hirsch, 1954]. Основные тканевые полипептиды также были получены из селезенки и ткани щитовидной железы. Последующие работы показали, что такого рода пептиды представляют собой фрагменты ядерных белков гистонов [Skarnes, Watson, 1956].

Было предположено, что антибактериальные свойства основных тканевых пептидов обусловлены наличием больших количеств основных аминокислот – лизина и

аргинина. Благодаря их положительному заряду антимикробные основные белки и полипептиды могут связываться с отрицательно заряженными поверхностными компонентами бактерий (липополисахариды, липотейхоевые кислоты), что может приводить к нарушению барьерных функций клеточных стенок и нарушению осмотического равновесия [Few, Schulman, 1953].

Качественно новый этап изучения антимикробных белков и пептидов начался благодаря развитию лабораторных методов, позволивших выделять клеточные органеллы и получать индивидуальные вещества в очищенном виде, а в дальнейшем осуществлять автоматическое секвенирование белков и ДНК.

В 1963 году были впервые получены индивидуальные фракции антимикробных катионных полипептидов из гранул нейтрофилов морской свинки с молекулярной массой менее 10 кДа [Zeya, Spitznagel, 1963]. А с помощью морфологических методов с использованием красителя прочного зеленого, избирательно связывающегося с катионными биополимерами, было показано, что потеря жизнеспособности фагоцитированных микроорганизмов коррелирует с сорбцией лизосомных катионных белков на их поверхности [Spitznagel, Chi, 1963].

Это стало началом процесса расшифровки молекулярных механизмов биохимических основ фагоцитарной теории иммунитета, впервые сформулированной И.И.Мечниковым в 1883 году на VII Съезде русских естествоиспытателей и врачей в Одессе [Мечников, 1950].

В 1984 году в лаборатории профессора Р. Лерера были определены первичные структуры шести катионных пептидов, выделенных из гранул нейтрофилов (псевдоэозинофилов) кроликов [Selsted et al., 1985b], и получивших название "дефенсины" (от английского "defense" – защищать) [Ganz et al., 1985]. Стоит отметить, что среди этих пептидов были и два пептида, ранее выделенных ими из альвеолярных макрофагов кролика [Selsted et al., 1983]. Та же группа исследователей впоследствии идентифицировала три дефенсина в человеческих нейтрофилах [Selsted et al., 1985a]. В настоящее время эти пептиды классифицированы как α -дефенсины.

Признавая роль И.И. Мечникова как вдохновителя своих исследований, профессор Лерер выразил ему свою благодарность в одной из своих работ: "We thank Eli Metchnikoff for showing the way." («Мы благодарим Илью Мечникова за указанный путь») [Lehrer, Ganz, 1996].

1.2 Современное состояние проблемы

В настоящее время охарактеризовано несколько сотен полипептидов и белков с антимикробными свойствами, выделенных из тканей различных видов позвоночных и беспозвоночных животных. Некоторые из этих пептидов, локализованы в гранулах фагоцитарных клеток, другие являются гуморальными факторами и выявляются в различных биологических жидкостях организма. Информация о них, а также об искусственно синтезированных соединениях, содержится в специализированных базах данных, таких как APD [1 <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>], CAMP_{R3} [2 <http://www.camp.bicnirrh.res.in/>] и LAMP [3 <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp/>].

Существуют различные варианты классификации антимикробных пептидов (АМП). Одну из них, в основе которой лежат различия в первичной и вторичной структуре пептидов предложил Х. Боман [Voman, 1995].

Боман разделил пептиды на 5 групп:

- 1) Линейные, в основном спиральные, пептиды без цистеина;
- 2) Линейные пептиды без цистеина и с высокой долей определенных аминокислотных остатков;
- 3) Антимикробные пептиды с одной дисульфидной связью;
- 4) Пептиды с двумя или более S-S связями, образующими β -складчатую вторичную структуру;
- 5) Антимикробные пептиды – производные из более крупных полипептидов или белков с другими известными свойствами

Одним из самых распространенных семейств АМП, объединяющих пептиды по сходству структур являются уже упомянутые выше дефенсины. Первоначально название дефенсины получили пептиды из нейтрофилов человека [Ganz et al., 1985], а по мере открытия все новых АМП под этим названием объединили пептиды из разных источников, для которых характерно высокое содержание остатков основных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин), обуславливающих положительный заряд этих молекул, и наличие шести остатков цистеина, формирующих три внутримолекулярных дисульфидных мостика, важных в поддержании функционально значимой вторично-третичной структуры пептидов, которая характеризуется разобщением в пространстве положительно заряженных и гидрофобных боковых групп аминокислотных остатков,

что придает рассматриваемым молекулам амфипатический характер. В зависимости от порядка образования дисульфидных мостиков дефенсины разделяются на α - и β -дефенсины, дефенсины насекомых (рис. 1.1).

Особое место занимают θ -дефенсины, отличительной особенностью первичной структуры которых является отсутствие у них N- и C-концевых аминокислотных остатков, которые задействованы в образовании двух пептидных связей между двумя молекулами-предшественницами, транслируемыми с разных мРНК, по типу «голова-хвост» с образованием одной макроциклической пептидной молекулы (рис. 1.2).

Наряду с дефенсинами широко распространены антимикробные пептиды семейства кателицидинов [Zanetti et al., 1995; Zanetti, 2004]. Отличительной особенностью пептидов этой группы является их синтез в виде молекул-предшественниц, в состав которых входят сигнальный пептид, определяющий конечную лизосомную локализацию антимикробного пептида, про-часть, являющаяся молекулой гомологичной ингибитору катепсина L из лейкоцитов свиньи – кателину (cathelin – **cathepsin L inhibitor**), и C-концевая часть молекулы, которая отщепляется в ходе ограниченного протеолиза и представляет собой непосредственно тот или иной антимикробный пептид (рис. 1.3). По своей первичной структуре зрелые антимикробные пептиды группы кателицидинов относятся к разным структурным семействам. Среди них встречаются как соединения с дисульфидными связями (додекапептид, протегрины), так и линейные молекулы (PR-39, профенины, бактенецины Bac5, 7, и др.).

В таблицах 1.1-1.4 представлены аминокислотные последовательности наиболее хорошо изученных АМП, выделенных из организмов разных таксономических групп – от бактерий до млекопитающих [Ageitos et al., 2016].

α -дефенсины (1-6, 2-4, 3-5) β -дефенсины (1-5, 2-4, 3-6)

Дефенсины насекомых (1-4, 2-5, 3-6)

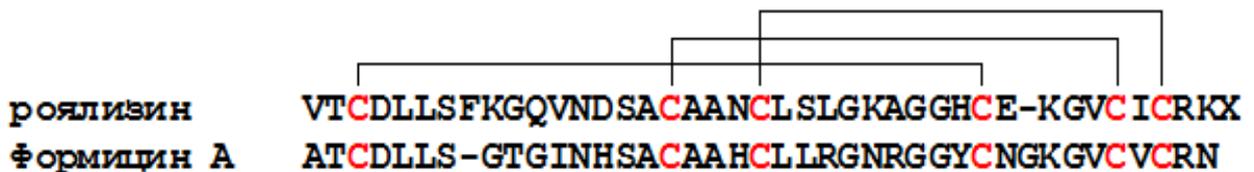


Рисунок 1.1 – Структуры дефенсинов.

HNP-1 – α -дефенсин из нейтрофилов человека [Selsted et al., 1985a], NP-1 – α -дефенсин из гетерофилов кролика [Selsted et al., 1985b], PHD1 – α -дефенсин из нейтрофилов гамадрила [Цветкова и др., 2006], BNBD-1 – β -дефенсин из нейтрофилов крупного рогатого скота [Selsted et al., 1993], GAL-1 – β -дефенсин из нейтрофилов кур [Harwig et al., 1994], TBD-1 – β -дефенсин из нейтрофилов черепахи [Stegemann et al., 2009], роялизин – дефенсин из маточного молочка пчелы *Apis mellifera* [Fujiwara et al., 1990], формицин А – дефенсин из гемолимфы личинки падальной мухи *Phormia terranova* [Lambert et al., 1989]

Однобуквенное обозначение аминокислотных остатков:

А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, Е – глутаминовая 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

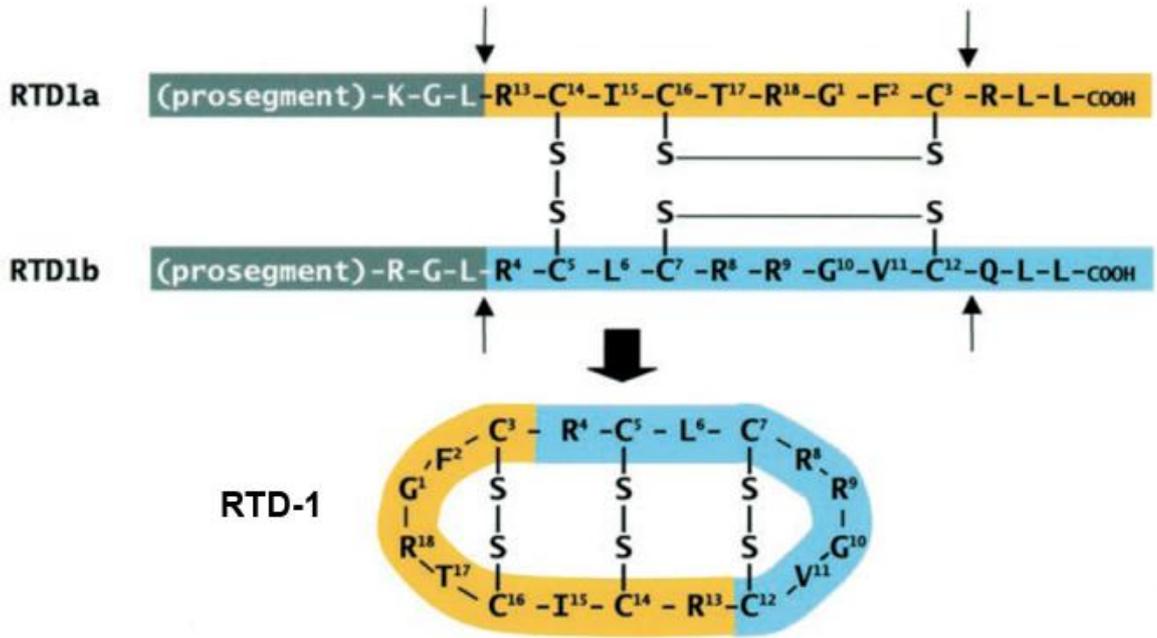


Рисунок 1.2 – Структура тета-дефенсина RTD-1, выделенного из лейкоцитов обезьяны *Macaca mulatta* [Tang et al., 1999].

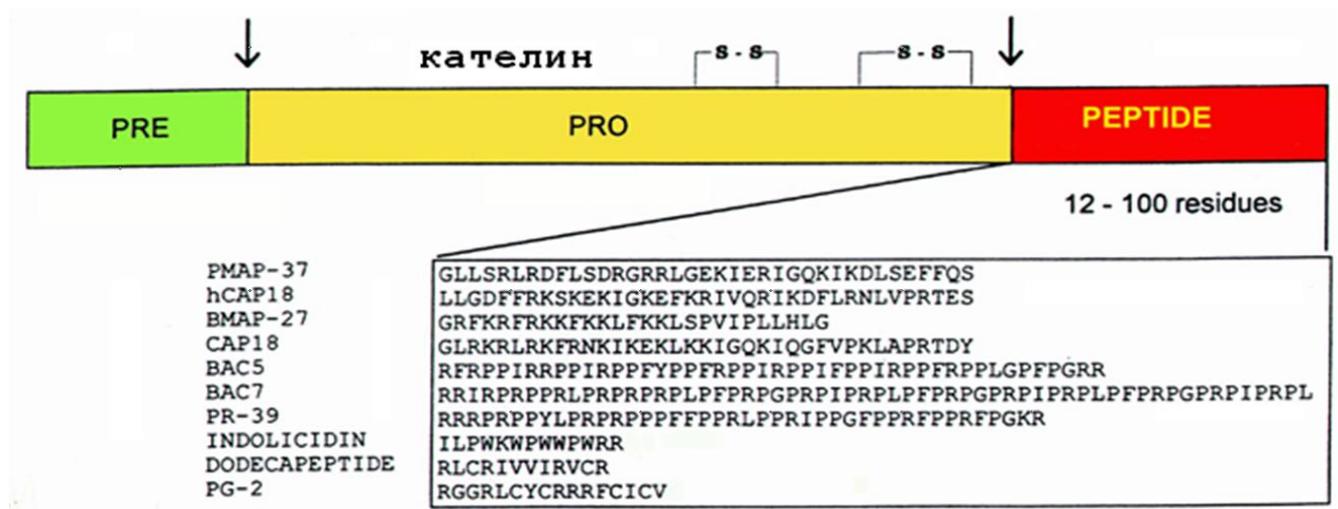


Рисунок 1.3 – Структуры кателицидинов.

Таблица 1.1 – Антимикробные пептиды, продуцируемые бактериями (1), грибами (2) и растениями (3)

Вид	АМП	Первичная аминокислотная последовательность	Ссылка
<i>B. brevis</i> 1	Грамицидин А	CHOVGADLADVVDVWDLWDLWLW NHCH ₂ CH ₂ OH	Townsley et al., 2001
	Грамицидин В	CHOVGADLADVVDVWDLFLDWLW NHCH ₂ CH ₂ OH	Townsley et al., 2001
<i>L. lactis</i> 1	Низин А	IDhbcyclo(AIDhaLA)cyclo(AbuPGA)Kcyclo(AbuGALMGA)NMKcyclo(AbuAAbuAHA)SIHVDhaK	Bierbaum, Sahl, 2009
<i>P. polymyxa</i> 1	Полимиксин В	(S)-6-Methyloctanoyl-DabTDab-cyclo(DabDabDFLDabDabT)	Orwa et al., 2001
<i>P. nigrella</i> 2	Плектазин	GFGCNGPWDEDDMQCHNHCKSIKGYKGGYCAKGGFVCKCY	Mygind et al., 2005
<i>T. viride</i> 2	Аламетицин	AcAibPAibAAAQAibVAibGLAibPVAibAibEQPhl	Payne et al., 1970
<i>O. affinis</i> 3	Калата В1	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN	Tam et al., 1999
<i>T. aestivum</i> 3	α_1 Пуротионин	KSCCRSTLGRNCYNLCRARGAQKLCAGVCRCKISSGLSCPkgfPK	Fernandez de Caley et al., 1972
<i>C. ternatea</i> 3	γ -тионин Ст-AMP1	NLCERASLTWTGNCGNTGHCDTQCRNWESAKHGACHKRGNWKCFCYFDC	Osborn et al., 1995

1 – Бактерии, **2** – Грибы **3** – Растения; Orn: орнитин; Dhb: дидегидроаминомасляная кислота; Dha: дидегидроаланин; Abu: аминомасляная кислота; Dab: диаминомасляная кислота. Ac: ацетилованный. Aib: α -аминоизомасляная кислота. Phl: фенилаланинол.

Однобуквенное обозначение аминокислотных остатков:

А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, pE – 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

Таблица 1.2 – Антимикробные пептиды, продуцируемые кишечнорастворимыми (1), моллюсками (2), членистоногими (3) и рыбами (4)

Вид	АМП	Первичная аминокислотная последовательность	Ссылка
<i>A. aurita</i> 1	Аурелин	AACSDRAHGHICESFKSFCCKDSGRNGVKLRANCKKTCGLC	Ovchinnikova et al., 2006
<i>Mytilus sp.</i> 2	Дефенсин А	GFGCPNDYPCRHCKSIPGRXGGYCGGXHRLRCTCYR	Mitta et al., 2000
	Митилин-А	GCASRCKAKCAGRRCKGWASASFRGRCYCKCFRC	Mitta et al., 2000
<i>T. tridentatus</i> 2	Тахиплезин I	KWCFRVCYRGICYRRCR-NH ₂	Bulet et al., 2004
<i>A. mellifera</i> 3	Мелиттин	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	Dorman, Markley, 1971
<i>D. melanogaster</i> 3	Дрозоцин	GKPRPYSPRPT(O)SHPRPIRV	Bulet et al., 1993
<i>H. cecropia</i> 4	Цекропин А	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH ₂	Steiner et al., 1981
<i>G. morhua</i> 4	кателицидин трески codCath	SRSGRGSGKGGRRGSSGSRGSKGPSGSRGSSGSRGSKGSRGGR S GRGSTIAGNGNRNNGGTRTA	Broekman et al., 2011a
	β-дефенсин трески	WSCPTLSGVCRKVCLPTEMFPGPLGCGKEFQCCVSHFF	Ruangsri et al., 2013
<i>P. americanus</i> 4	Плеуроцидин	GWGSFFKKAHVGVKHHVKAALTHYL	Cole et al., 1997
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i> 4	Аципенсин-2	SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLR	Shamova et al., 2014

1 – Кишечнополостные; 2 – Моллюски; 3 – Членистоногие; 4 – Рыбы

iL: Трет-лейцин; Cys(O₃H): цистеиновая кислота cysteic acid; Sar: саркозин; NMeGln: N-метилглутамин; NH₂: амидированный C-конец; (O): O-гликозилированный; BrTrp: Бромотриптофан.

Таблица 1.3 – Антимикробные пептиды, продуцируемые земноводных (1), рептилиями (2) и птицами (3)

Вид	АМП	Первичная аминокислотная последовательность	Ссылка
<i>A. loloensi</i> 1	Кателицидин AL	RRSRRGRGGRRGGSGGRGGRGGGGRSGAGSSIAGVGSRGGGGGRH YA	Hao et al., 2012
<i>B. gargarizans</i> 1	Буфорин I	AGRQKQGGKVRKAKTRSSRAGLQFPVGRVHRLLRKGN	Park C.B.C. et al., 1996
	Буфорин II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	Park C.B.C. et al., 1996
<i>B. variegata</i> 1	Бомбинин	GIGALSAKALKGLAKGLAEHFAN-NH ₂	Simmaco et al., 2009
<i>P. sauvagii</i> 1	Дермасептин S1	ALWKTMLKKLGTMLHAGKAALGAAADTISQGTQ	Mor et al., 1994
<i>P. yunnanensis</i> 1	Раналексин	FLGGLIKIVPAMICAVTKKC	Clark et al., 1994
<i>X. laevis</i> 1	Магейнин I	GIGKFLHSAGKFGKAFVGEIMKS	Zasloff, 1987
	Магейнин II	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Zasloff, 1987
<i>C. d. terrificus</i> 2	Кротамин	YKQCHKKGGHCFPKEKICLPPSSDFGKMDCRWRWKCKKGGSG	Yount et al., 2009
<i>E. orbicularis</i> 2	TBD-1	YDLSKNCRLRGGICYIGKCPRRFFRSRSGSCSRGNVCCCLRFG	Stegemann et al., 2009
<i>O. hannah</i> 2	OH-CATH	KRFKFFFKLKNVKKRAKFFFKPRVIGVSIPF	Zhao et al., 2008
<i>G. gallus</i> 3	Галлинацин-1	GRKSDCFRKSFGCAFLKCPSTLISGKCSRFLCCKRIW	Harwig et al., 1994
	Галлинацин-1 α	GRKSDCFRKNFGCAFLKCPYTLISGKCSRFLCCKRIW	Harwig et al., 1994
	Галлинацин-2	LFCKGGSCHFGGCPSHLIKVGSCFGFRSCCKWPWNA	Harwig et al., 1994
	Фоулицидин 1	RVKRVWPLVIRTVIAGYNLYRAIKKK	Xiao et al., 2006
<i>C. caretta</i> 2	TEWP	QKKCPGRCTLKCGKHERPTLPYNCGKYICCVPVKVK	Chattopadhyay et al., 2006

Примечания: 1 – Земноводные; 2 – Рептилии; 3 – Птицы; NH₂: амидированный С-конец.

Таблица 1.4 – Антимикробные пептиды млекопитающих

Вид	АМП	Первичная аминокислотная последовательность	Ссылка
<i>B. taurus</i>	Додекапептид	RLCRIVVIRVCR	Romeo et al., 1988
	Индолицидин	ILPWKWPWWPWR-NH ₂	Selsted et al., 1992
	ТАР	NPVSCVRNKGICVPIRCPGSMKQIGTCVGRAVKCCRKK	Diamond et al., 1991
<i>C. porcellus</i>	GNCP-1	RRCICTTRTCRFPYRRLGTCIFQNRVYTFCC	Selsted, Harwig 1987
<i>H. sapiens</i>	Дермцидин	SSLLEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDLESVGKGAVHDVKD VLDSV	Schittek et al., 2001
	HBD-1	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYRGKAKCCK	Zhao et al., 1996
	HBD-3	GIINTLQKYYCRVRGGRCVLSCLPKEEQIGKCSTRGRKCCRK K	Harder et al., 2001
	HBD-4	FELDRICGYGTARCRKKCRSQEYRIGRCPNTYACCLRKWDESLL NRTKP	García et al., 2001
	HD-5	ATCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR	Schneider et al., 2005
	Гепсидин 20	ICIFCCGCCHRSKCGMCCKT	Park C.H et al., 2001
	HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	Selsted et al., 1985a
	LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTES	Agerberth et al., 1995
	TC-1	AELRCMCIKTTSGIHPKNIQSLEVIGKGTNCNQEVIATLKDGRKI CLDPDAPRIKKIVQKKLAGDES	Yeaman et al., 1997
<i>M. mulatta</i>	RTD-1	<i>cyclic</i> (GFCRCLCRRGVCRICTR)	Tang et al., 1999
<i>M. musculus</i>	Криптин-1	LRDLVCYCRTRGCKRRERMNGTCRKGHLMYTLCCR	Ouellette et al., 1994
<i>S. scrofa</i>	PG1	RGGRLCYCRRRFCVGVGR	Kokryakov et al., 1993

1.2.1 Антимикробные пептиды бактерий

Необходимо отметить, что у бактерий АМП производятся по большей части не рибосомально, а например, как в случае грамицидинов А, В и С, продуцируемых *Bacillus brevis* (табл. 1.1) с помощью мультиферментного комплекса [Kelkar, Chattopadhyay, 2007].

Полимиксин В (табл. 1.1) представляет собой циклический АМП, выделенный из *Paenibacillus polymyxa*. Он содержит остатки диаминомасляной кислоты (Dab) и D-фенилаланина, отвечающие за структуру планарного кольца [Orwa et al., 2001].

Полимиксин В активен против широкого спектра грамотрицательных бактерий в силу высокого сродства к липолисахаридам (ЛПС) – важного структурного компонента клеточной стенки этих бактериальных клеток. Полимиксин Е (Колистин) представляет собой циклический АМП, аналогичный полимиксину В, получен из *P. polymyxa* var. *colistinus*. Колистин использовался в качестве лекарственного препарата в Японии и Европе с 1950-х годов, а в Соединенных Штатах – с 1960-х годов, но в 1980 году он был запрещен из-за его высокой нефротоксичности. Тем не менее, в настоящее время он является частью арсенала антибиотиков последней линии против резистентных к нескольким препаратам грамотрицательных бактерий [Roberts et al., 2015].

Низин, продуцируемый *Lactococcus lactis*, является наиболее заметным членом семейства лантибиотиков, группой синтезированных на рибосомах полициклических АМП, характеризующихся наличием необычных аминокислот, таких как аминокислота (Abu), дидегидроаланин (Dha) и дидегидроаминомасляная кислота (Dhb) (табл. 1.1) [Bierbaum, Sahl, 2009]. Это соединение является единственным антимикробным пептидом, одобренным Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) в качестве пищевого консерванта.

1.2.2 Антимикробные пептиды грибов и растений

Пептиды пептоиболы представляют собой большое семейство АМП грибов, характеризующихся наличием необычных аминокислот, таких как α -аминоизомасляная кислота (AiB). Аламетицин (табл. 1.1), продуцируемый *Trichoderma viride* обладает широким спектром действия, действующим на клетки бактерий, грибов, животных и

насекомых [Leitgeb et al., 2007]. Плектазин (Plectasin) (табл. 1.1) содержит 40 аминокислотных остатков (ао) – первый дефенсин, выделенный из грибов, а именно из *Pseudoplectania nigrella* (он гомологичен дефенсину мидии и дефенсинам насекомых) [Mygind et al., 2005].

Наиболее распространенными АМП растений являются пуротионины и γ -тионины. Пуротионины (табл. 1.1) представляют собой катионные АМП, присутствующие в эндосперме пшеницы (*Triticum aestivum*) и других видов злаков [Fernandez de Caley et al., 1972]. γ -Тионины, в частности Ct-AMP1 из *Clitoria ternatea* (табл. 1.1), представляют собой катионные пептиды [Osborn et al., 1995] в основном с противогрибковой активностью.

В растениях также содержатся циклотиды (Cyclotides) – семейство АМП с циклической основой «голова-хвост», схожей с θ -дефенсином. К ним относится, в частности, калата В1 из *Oldenlandia affinis* [Tam et al., 1999].

1.2.3 Антимикробные пептиды кишечнорастворимых, моллюсков и членистоногих

Аурелин (табл. 1.2) – антимикробный пептид из тела медузы *Aurelia aurita* выделен и охарактеризован в отделе общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" совместно с исследователями из Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, руководимыми профессором Т.В. Овчинниковой. Пептид активен против как грамотрицательных, так грамположительных бактерий. Аурелин имеет 3 дисульфидные связи и на 40% гомологичен токсинам из актиний, блокирующим калиевые каналы [Ovchinnikova et al., 2006].

Из морских моллюсков были выделены несколько обогащенных цистеином АМП. В частности, из мидии (*Mytilus* sp.) [Charlet et al., 1996] выделены 2 дефенсина, 5 митилинов, 2 митицина и митимицин. Дефенсины мидий (табл. 1.2) структурно подобны дефенсинам, продуцируемым членистоногими.

Тахиплезины и полифемузины – это представители семейства АМП, выделенных из гемоцитов мечехвостов (*Tachypleus tridentatus* и *Limulus polyphemus*). Тахиплезин I (табл. 1.2) представляет собой АМП с положительным зарядом и структурой, содержащий классическую β -шпильку (два антипараллельных β -тяжа,

стабилизированных двумя дисульфидными связями) [Jain et al., 2014]. Тахиплезин I активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и вирусов [Bulet et al., 2004].

Цекропины (табл. 1.2) – положительно заряженные линейные АМП. Цекропины А и В были первоначально выделены группой Бомана из гемолимфы гигантского шелкопряда (*Hyalophora cecropia*) [Steiner et al., 1981]. Грамотрицательные бактерии более чувствительны к этим АМП, чем грамположительные [Hancock, 2001].

Мелиттин (табл. 1.2) представляет собой амфипатический α -спиральный АМП, выделенный из яда европейской медоносной пчелы (*Apis mellifera*). Этот АМП очень активен против грамотрицательных и грамположительных бактерий, включая несколько устойчивых к антибиотикам штаммов *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *S. enterica* [Fennell et al., 1968].

1.2.4 Антимикробные пептиды рыб и земноводных

Спектр АМП рыб достаточно широк. Они представлены, в частности, кателицидинами и β -дефенсинами.

Кателицидин богатый глицином codCath (табл. 1.2) был выделен из атлантической трески (*Gadus morhua*). Этот АМП обладает литической активностью против грамположительных бактерий и его активность зависит от концентрации соли в среде [Broekman et al., 2011a].

Обнаружено несколько генов β -дефенсинов у рыб, но все тестируемые до сих пор β -дефенсина показали низкую антимикробную эффективность, за исключением β -дефенсина трески (табл. 1.2), который в значительной степени активен против патогена рыб *Planococcus citreus* [Ruangsri et al., 2013].

Из лейкоцитов крови представителей подкласса костных рыб (хрящевых ганоидов) – русского осетра и севрюги сотрудниками отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" совместно с сотрудниками института Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова были выделены и охарактеризованы антимикробные пептиды – аципенсины (табл. 1.2), первичная структура которых может быть отнесена к N-концевым фрагментам гистонов H2A [Shamova et al., 2014].

Кожа земноводных является хорошим источником АМП, продуцируемых их кожными железами [Xiao et al., 2011]. Бомбинины относятся к семейству АМП, полученных из кожных выделений жаб, принадлежащих к роду *Bombina* [Simmaco et al., 2009] и представляют собой глицин-обогащенные АМП с гемолитической активностью. Бомбинин (табл. 1.3) из жабы *Bombina variegata* может ингибировать рост *S. aureus* и *E. coli* [Simmaco et al., 2009]. Буфорин I и II (табл. 1.3) являются АМП, выделенными из желудка *Bufo gargarizans* [Park et al., 1996]. Эти катионные пептиды обладают антибактериальной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Буфорин II более активен, чем Буфорин I, но оба имеют общий домен, содержащий фрагмент гистона H2A.

Магейнины (табл. 1.3) представляют собой семейство α -спиральных АМП, выделенных из кожи африканской шпорцевой лягушки *X. laevis*. Магейнины 1 и 2 активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Zasloff, 1987].

1.2.5 Антимикробные пептиды рептилий и птиц

Как и в случае с другими позвоночными, наиболее известные АМП, присутствующие у рептилий и птиц, относятся к семействам кателицидинов и дефенсинов [van Hoesk, 2014; Zhang, Sunkara, 2014]. На основе анализа геномов были найдены предполагаемые последовательности 50 кателицидинов и 34 β -дефенсинов у рептилий и 44 последовательности кателицидинов и 714 β -дефенсинов у птиц [van Hoesk, 2014; Cheng et al., 2015]. Однако до сих пор изучалась и тестировалась лишь часть этих АМП.

1.2.5.1 Кателицидины рептилий и птиц

Кателицидины были идентифицированы у нескольких элапидных змей, таких как *Ophiophagus hannah* и *Bungarus fasciatus*. Кателицидин, вырабатываемый королевской коброй (*O. hannah*), ОН-САТН (табл. 1.3) активен против грамотрицательных бактерий [Zhao et al., 2008].

Фоулицидины (табл. 1.3) представляют собой кателицидины кур с антимикробной активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Xiao et al., 2006].

1.2.5.2 β -Дефенсины рептилий и птиц

Первый β -дефенсин рептилий был открыт и охарактеризован в отделе общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" совместно с немецкими исследователями из университета г. Лейпцига [Stegemann et al., 2009]. TBD-1 (**T**urtle **B**eta-**D**efensin) выделен из лейкоцитов европейской болотной черепахи *Emys orbicularis* (табл. 1.3). TBD-1 является высокоактивным при низких концентрациях соли против *E.coli* и *L. monocytogenes*.

Несколько дефенсин-подобных АМП были выделены ранее, но их паттерн дисульфидных связей обычно отличается от таковой канонических β -дефенсинов. Кротамин (42 ао, табл. 1.3) представляет собой токсин, обнаруженный в яде южноамериканской гремучей змеи (*Crotalus durissus terrificus*). Это соединение гомологично β -дефенсинам, поскольку оно разделяет с ними такие характеристики, как наличие 3 дисульфидных связей и положительный заряд молекулы. Кротамин эффективен против грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий, но также токсичен для эукариотических клеток [Yount et al., 2009]. TEWP (**T**urtle **e**gg-**w**hite **p**rotein) (табл. 1.3) представляет собой дефенсино-подобный пептид, выделенный из яичного белка черепахи Красного моря (*Caretta caretta*), с 6 цистеинами, образующими 3 дисульфидные связи. Однако TEWP не разделяет структурную гомологию с каноническими β -дефенсинами [Chattopadhyay et al., 2006].

Первые β -дефенсины птиц галлинацины 1 и 2 (Gal-1, Gal-1 α и Gal 2) из гетерофилов кур *Gallus gallus* (табл. 1.3) также были выделены и охарактеризованы в отделе общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" совместно с американскими исследователями группы Р. Лерера [Harwig et al., 1994]. Галлинацин-3 (AvBD3) [Zhao et al., 2001] и сфенисцины [Sphe-1 (AvBD103a) и Sphe-2 (AvBD103b)] [Thouzeau et al., 2003], обнаруженные у королевского пингвина (*Aptenodytes patagonicus*), представляют собой β -дефенсины, продуцируемые эпителиальными клетками. Другими примерами описанных птичьих β -

дефенсинов являются АМП гетерофилов индейки THP1, THP2 и THP3 [Evans et al., 1994], страуса (OSP-1-4) [Sugiarto, Yu, 2006] и утки [van Dijk et al., 2008]. Несмотря на их различное происхождение, β -дефенсины птиц имеют значительную гомологию, поэтому было предложено стандартизировать номенклатуру 14 типов β -дефенсинов птиц [van Dijk et al., 2008], известных в настоящее время.

1.2.6 Антимикробные пептиды млекопитающих

Большинство АМП млекопитающих принадлежат к семействам кателицидинов и дефенсинов, но существуют такие АМПБ, как антимикробные белки тромбоцитов (PMPs), гепцидины, гистатины и дермицидины, которые не относятся к этим двум семействам.

1.2.6.1 Кателицидины млекопитающих

Особая заслуга в исследовании кателицидинов принадлежит итальянским исследователям, которые первыми объединили различные в структурном отношении антимикробные пептиды в одно семейство [Zanetti et al., 1995]. Они также выделили и охарактеризовали кателицидины из нейтрофилов крупного рогатого скота бактеницины – додекапептид (табл. 1.4) [Romeo et al., 1988], Bac5 и Bac7 [Gennaro et al., 1989].

Индолицидин (табл. 1.4), также выделенный из нейтрофилов крупного рогатого скота кателицидин представляет собой короткий (13 ао) триптофан-богатый катионный АМП. Это соединение обладает широким спектром действия и активно против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Selsted et al., 1992].

Пептиды, близкие по структуре бактенецинам Bac5 и Bac7, были выделены сотрудниками отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" из лейкоцитов овцы – OaBAC5 и козы – ChBAC5 [Shamova et al., 1999], ChBAC3.4 [Shamova et al., 2009]. Бактенецины проявляют антибиотическую активность против широкого спектра микроорганизмов, при низкой цитотоксичности в отношении эукариотических клеток [Shamova et al., 2016].

Поиск антимикробных пептидов в нейтрофильных гранулоцитах свиньи показал, что в них нет дефенсинов, но они содержат большое количество кателицидинов. Сотрудниками отдела общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины" из нейтрофилов свиньи были выделены и охарактеризованы совместно с американскими исследователями группы Р. Лерера АМП, относящиеся к семейству кателицидинов – протегрины [Kokryakov et al., 1993.] и профенины [Harwig et al., 1995].

Протегрины (PG-1 – PG-5) представляют собой небольшие (16-18 а.а.) катионные цистеин-богатые пептиды. Их вторичная структура характеризуется наличием амфипатической β -шпильки, состоящей из двух антипараллельных тяжей, стабилизированных двумя внутримолекулярными дисульфидными мостиками. Протегрин-1 (PG-1, таблица 1.4) активен против *E.coli*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* и *S. aureus* (включая штаммы MRSA) [Steinberg et al., 1997].

Профенины (PF-1, PF-2) содержат 79 остатков аминокислот, в том числе 42 остатка пролина (53,2%) и 15 – фенилаланина (19%), что отражается в названии пептидов (профенин = **про**лин + **фени**лаланин), их N-концевая последовательность состоит из шести почти полностью совпадающих повторов пролин-богатого декамера: FPPPNFPGPR (рис. 1.4). Первые пять декамеров идентичны за исключением консервативной замены в Декамере I (Va₇) и Декамере V (Pro₅₁).

Декамер	Первичная последовательность и номера остатков										
I	A ₁	F	P	P	P ₅	N	V	P	G	P ₁₀	R
II		F	P	P	P ₁₅	N	F	P	G	P ₂₀	R
III		F	P	P	P ₂₅	N	F	P	G	P ₃₀	R
IV		F	P	P	P ₃₅	N	F	P	G	P ₄₀	R
V		F	P	P	P ₄₅	N	F	P	G	P ₅₀	P
VI		F	P	P	P ₅₅	I	F	P	G	P ₆₀	W
«ХВОСТ»		F	P	P	P ₆₅	P	P	F	R	P ₇₀	P
		P	F	G	P ₇₅	P	R	F ₇₈	P ₇₉		

Рисунок 1.4 – Первичная аминокислотная последовательность профенина-1.

Профенин активен против грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), но большинство грамположительных бактерий к нему резистентны.

В нейтрофилах свиней идентифицирован также кателицидин PR-39 [Shi et al., 1994]. Название отражает структурные особенности пептида – он содержит 39 аминокислотных остатков, из которых 19 остатков пролина (P) и 10 – аргинина (R):

PR-39 RRRPRPPYLP RPRPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPPRF

PR-39 проявляет высокую антибиотическую активность против широкого спектра микроорганизмов – грамположительных и грамотрицательных бактерий и высших грибов.

Катионный АМП LL-37 (37 ао, также известный как hCAP-18, FALL-39 или CAMP, табл. 1.4) является единственным кателицидином, обнаруженным у людей [Agerberth et al., 1995]. Пептиды гомологичные LL-37 обнаружены также у обезьяны макак-резуса, мыши, крысы и морской свинки [Kosciuczuk et al., 2012]. LL-37 активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Dürr et al., 2006]. LL-37 представляет собой амфипатический АМП с неупорядоченной вторичной структурой в растворе, но при взаимодействии с клеточными мембранами он приобретает α -спиральную структуру. LL-37 был предложен в качестве вспомогательного препарата в лечении инфицированных ран [Duplantier, van Hoek, 2013] из-за его способности предотвращать образование бактериальной биопленки в концентрациях ниже ее минимальной ингибирующей концентрации (МИК) [Overhage et al., 2008].

Изначально кателицидины млекопитающих были выделены из нейтрофильных гранулоцитов, где они локализованы в виде неактивных предшественников в специфических гранулах. Впоследствии было показано, что они экспрессируются и продуцируются не только в миелоидных клетках, но и в других тканях, в частности, показано, что экспрессия гена LL-37 детектируется в слизистой оболочке носослезных протоков [Paulsen et al., 2001], верхних дыхательных путей [Тырнова и др., 2014а], носоглотки человека [Тырнова и др., 2014б.]

1.2.6.2 Дефенсины млекопитающих

Как уже упоминалось выше, дефенсины имеют шесть остатков цистеина и делятся на 3 подсемейства, α -дефенсины, β -дефенсины и θ -дефенсины в соответствии с паттерном образования их дисульфидных мостиков.

1.2.6.2.1 α -Дефенсины млекопитающих

α -Дефенсины (29-35 ао) представляют собой катионные АМП с трехтяжевой антипараллельной структурой β -листа, продуцируемой промиелоцитами, клетками-предшественниками нейтрофилов [Lehrer, Lu, 2012] и клетками Панета кишечника [Ayabe et al., 2000]. Они также как и кателицидины синтезируются в виде неактивных предшественников, но в отличие от кателицидинов, их процессинг проходит еще на стадии промиелоцита и дефенсины "упаковываются" в азурофильные гранулы уже в виде активных молекул в комплексе с гликозоаминогликанами [Valore, Ganz, 1992], хотя есть данные, что непроцессированные молекулы-предшественницы могут быть найдены в специфических гранулах, которые формируются на стадии миелоцита [Faurichou et al., 2005].

α -Дефенсины содержатся в нейтрофильных гранулоцитах человека [Ganz et al., 1985], морской свинки [Selsted, Harwig, 1987], кролика [Selsted et al., 1985b], крысы [Eisenhauer et al., 1989], хомяка [Mak et al., 1996], обезьяны макак-резус [Tang et al., 1999a].

У людей α -дефенсины (HNP-1-4) составляют от 5 до 7% от общего содержания белка нейтрофилов [Schneider et al., 2005]. HNP-1 (табл. 1.4) является одним из наиболее изученных α -дефенсинов человека. Он активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Selsted et al., 1985a]. Более основные α -дефенсины, такие как NP-1 кролика или RatNP-1 крысы, в пять-десять раз более активны *in vitro*, чем HNP-1 [Lehrer et al., 1993].

α -Дефенсины клеток Панета, получившие название криптдины, были первоначально выделены из клеток кишечника мыши [Ouellette et al., 1994]. Они также обнаружены у крыс (последовательность криптдина-1 изображена в таблице 1.4) [Condon et al., 1999], лошади (DEFA1) [Bruhn et al., 2009], макак-резуса (от RED-1 до

RED-6), [Tanabe et al., 2004] и человека (HD-5 и HD-6, табл. 1.4) [Schneider et al., 2005]. α -Дефенсины клеток Панета секретуются внеклеточно в ответ на присутствие бактерий или их компонентов с локальной концентрацией в криптах тонкой кишки между 25 и 100 мг/мл в момент высвобождения [Ayabe et al., 2000] и активны против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Было высказано предположение, что уровень этих соединений может влиять на состав микробиома кишечника [Ouellette, 2011].

1.2.6.2.2 β -Дефенсины млекопитающих

β -Дефенсины млекопитающих являются АМП, тесно связанными структурно-генетически с α -дефенсинами, оба имеют сходную трехмерную структуру, но, как уже указывалось ранее, локализация остатков цистеина и распределение дисульфидных мостиков в их молекулах различны. Тот факт, что более древние группы позвоночных животных, такие как рыбы, рептилии и птицы, имеют только β -дефенсины, но не α -дефенсины, указывает, что как α -, так и β -семейства эволюционировали скорее всего из общегоанцестрального гена β -дефенсинов [Semple et al., 2003].

Как и в случае α -дефенсинов, β -дефенсины также содержатся в нейтрофилах и других лейкоцитах, однако в основном они продуцируются негранулярными эпителиальными клетками слизистой оболочки в дыхательных, желудочно-кишечных и мочеполовых трактах [Patil et al., 2005]. β -Дефенсины являются важной частью врожденной иммунной системы и были обнаружены у всех изученных на настоящий момент видов млекопитающих.

β -Дефенсины впервые были выделены из эпителиальных клеток слизистой трахеи крупного рогатого скота. Противомикробный пептид трахеи (ТАР, табл. 1.4) активен против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Diamond et al., 1991]. Нейтрофилы крупного рогатого скота содержат большое количество β -дефенсинов (BNBD-1-13) активных против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Selsted et al., 1996]. β -Дефенсины человека (HBD-1-4, табл. 1.4) обнаружены в эпителиальных клетках. HBD-1 был выделен первоначально из плазмы крови, но он экспрессируется кератиноцитами кожи, эпителиальными клетками молочной железы, репродуктивного, пищеварительного, мочевого и дыхательного путей, а также

астроцитами и роговицей, [Schneider et al., 2005; Pazgier et al., 2006]. HBD-1 продуцируется конститутивно, в отличие от HBD-2, -3 и -4, синтез которых носит индуцибельный характер [Zhao et al., 1996]. В отличие от дефенсина из нейтрофилов HNP-1 [Varkey, Nagaraj, 2005], HBD-1 более активен против грамположительных бактерий (*Bifidobacterium* и *Lactobacillus*) после восстановительного разрыва дисульфидных связей, в частности тиоредоксином [Schröder et al., 2011]. Шрёдер и коллеги предположили, что благодаря колокализации и конститутивной продукции HBD-1 и тиоредоксин могут вносить вклад в устойчивость организма против оппортунистических анаэробных патогенных или комменсальных бактерий [Schröder et al., 2011]. HBD-2 (табл. 1.4) экспрессируется в активированных кератиноцитах (первоначально он был выделен из кожи пораженной псориазом [Harder et al., 1997]) и других эпителиальных клетках (легких, кишечника, трахеи, тонкой кишки, мочеполовой системы, поджелудочной железы и аденоидов) [Schneider et al., 2005; Kaiser, Diamond, 2000]. HBD-2 в основном активен против грамотрицательных бактерий [Pazgier et al., 2006]. HBD-3 (табл. 1.4) [Harder et al., 2001] проявляет наибольшую антимикробную активность среди β -дефенсинов человека в условиях *in vitro*, он обладает широким спектром действия при низких концентрациях [Joly et al., 2004]. HBD-4 (табл. 1.4) экспрессируется в яичках, антруме желудка, щитовидной железе, легком и почках. Активность этого АМП ниже, чем у других β -дефенсинов человека, однако он очень активен против *Streptomyces carnosus* и *P. aeruginosa* [García et al., 2001].

Патил и коллеги [Patil et al., 2005] опубликовали всестороннее исследование полных структур β -дефенсинов у людей, шимпанзе, мышей, крыс и собак на основе анализа геномов. Так они выявили 42 гена и псевдогена β -дефенсинов у крыс, 43 – у собак, 52 – у мышей, 39 – у человека и 37 – у шимпанзе, причем гены шимпанзе были на 91-100% идентичны соответствующим им генам-ортологам человека. Но пока выделена и исследована только незначительная часть из этих потенциальных АМП, в частности, у человека – 4 пептида, у мыши – 6.

1.2.6.2.3 θ -Дефенсины

θ -Дефенсины, единственные макроциклические пептиды животного происхождения, были выделены из лейкоцитов обезьян макак-резусов и павианов. Их

биогеиз необычен, потому что каждый пептид представляет собой структурную химеру, состоящую из двух нонапептидов, образованных из двух отдельных молекул-предшественниц. θ -Дефенсины имеют несколько аргининов и три дисульфидных мостика, соединяющих два антипараллельных β -тяжа.[Lehrer et al., 2012b].

Лучше всего изучен θ -дефенсин RTD-1 из лейкоцитов макак-резуса, впервые полученный в лаборатории доктора М. Селстеда (США) [Tang et al., 1999]. Авторы выделили пептиды из экстракта лейкоцитов макак-резуса антимикробный пептид с молекулярной массой 2082 Да. Исследования показали, что этот пептид состоит из 18 остатков аминокислот и имеет макроциклическую структуру, образованную слиянием двух нанопептидных фрагментов. Каждый из его исходных мономеров был продуктом мутированного гена α -дефенсина (гены *rtd1a* и *rtd1b*), содержащего преждевременный стоп-кодон (рис. 1.5, красная стрелка) в части последовательности ДНК, кодирующей зрелую молекулу дефенсина.

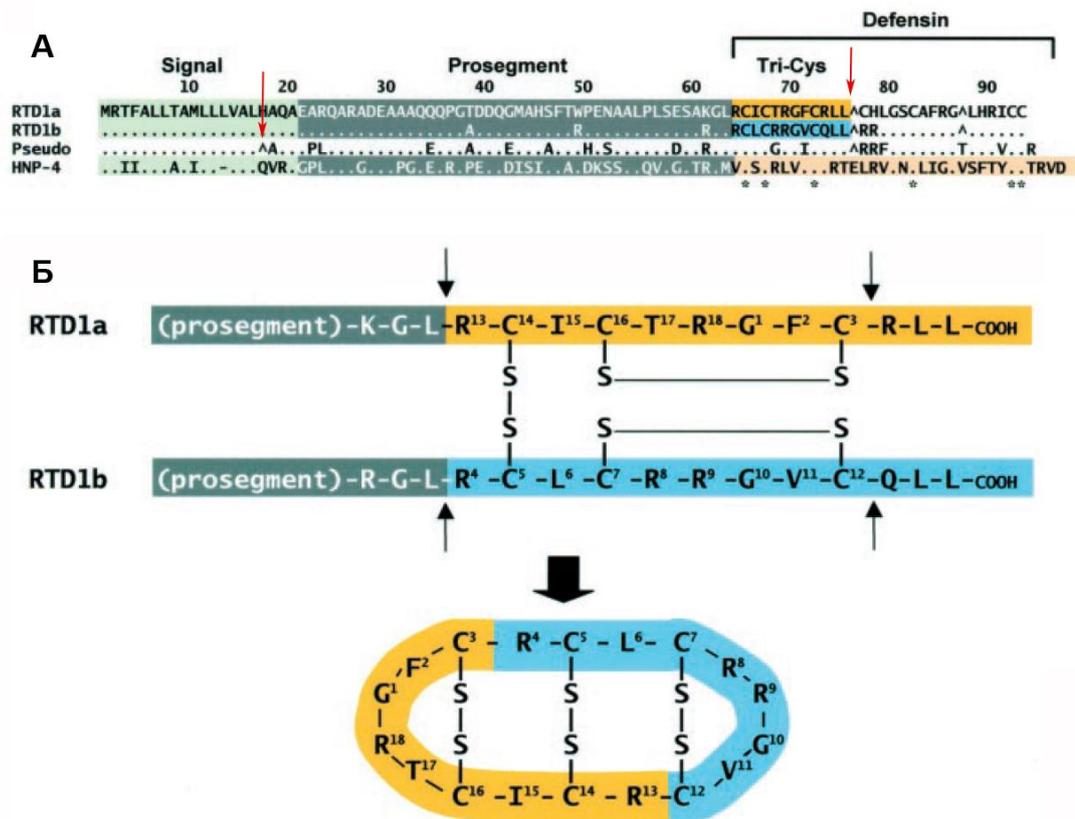


Рисунок 1.5 – А – Гены θ -дефенсинов макак-резуса *Macaca mulatta* (RTD1a и RTD1b), псевдогена θ -дефенсина человека (Pseudo) и α -дефенсина человека HNP-4, красными стрелками обозначены стоп-кодоны. Б – Схема образования тета-дефенсина RTD-1 обезьяны *Macaca mulatta* [Tang et al. 1999].

Из-за положения стоп-кодона исходные продукты молекулы дефенсина имели 12 остатков и требовалось протеолитическое удаление С-концевого трипептида для создания нонапептидного «строительного блока» с тремя цистеинами, включая один в С-концевой области. Два таких нонапептида превращались в θ -дефенсин с помощью двух пептидных связей, которые соединяли их способом «голова к хвосту».

У макака-резуса выявлено три гена θ -дефенсинов (DEFT), которые кодируют разные нонапептиды, их комбинация может привести к синтезу шести различных θ -дефенсинов. К настоящему времени установлено, что все шесть потенциальных θ -дефенсинов существуют в лейкоцитах макака-резуса [Tongaonkar et al., 2011], но их относительные количества сильно различаются, причем RTD-1 является наиболее распространенным.

У павиана *Papio anubis* было найдено четыре гена DEFT, которые могут продуцировать 10 различных пептидов. Пять из них были идентифицированы на уровне пептидов [Garcia et al., 2008].

Гены θ -дефенсина человека содержат стоп-кодон в последовательности мРНК, ответственной за синтез сигнального пептида (рис. 1.5, красная стрелка, ген Pseudo), который препятствует эффективной трансляции необходимых предшественников, следовательно, эти пептиды не присутствуют в лейкоцитах человека, но в костном мозге человека содержится мРНК, которая очень напоминает мРНК предшественников θ -дефенсина макака-резуса. Хотя эта мРНК казалась бесполезной для продукции θ -дефенсина *in vivo*, она предоставила информацию о последовательности, которая позволила исследователям воссоздать утраченный θ -дефенсин путем твердофазного пептидного синтеза. Этот пептид был назван «ретроциклин-1» от «ретро», означающего «назад во времени», и «циклин», что относится к его циклическому остову [Cole et al., 2004].

Ретроциклин-1 (RC-1) и RTD-1 убивали кишечную палочку точно так же, как α -дефенсины человека [Tran et al., 2008], проникая через ее мембраны. RTD-1 убивал *E. coli* ML-35 в среде с физиологическими концентрациями NaCl, Ca²⁺ или Mg²⁺, которые ингибировали активность α -дефенсинов. Такая же активность установлена и для кателицидина свиньи PG-1, но PG-1 проявляет значительные цитотоксические и гемолитические свойства, RTD проявляли незначительную цитотоксичность в

отношении эукариотических клеток и даже при 100 мкг/мл не лизовали эритроциты человека.

Характеристика θ -дефенсинов из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*, относящегося к роду павианов, является одним из объектов исследования настоящей диссертационной работы

1.2.6.3 Антимикробные пептиды из тромбоцитов, потовых желез и печени

Тромбоциты, хотя и менее изучены как источник АМП, чем другие клетки крови, имеют гранулы, содержащие катионные белки и пептиды с антимикробной активностью [Yeaman, 1997]. Некоторые из них, как уже указывалось ранее, видимо, являются протеолитическими фрагментами тромбоцитарных белков, в частности, тромбоцитарного фактора IV [Yeaman, 2010].

Микробицидные белки тромбоцитов (PMP – Platelet microbicidal proteins) являются термостабильными АМПБ активными против грамположительных и грамотрицательных бактерий [Ivanov, Gritsenko, 2009]. Одним из таких примеров являются тромбин-индуцированные PMP (tPMP-1), которые включают тромбоцидины ТС-1 человека (68 аа) и ТС-2 (83 аа) (табл. 1.4), которые очень эффективны против *B. subtilis* [Krijgsveld et al., 2000].

Гепцидины (20-25 аа) представляют собой богатые цистеином пептиды. Они выявляются в плазме [Krause et al., 2000] и моче [Park C.H. et al., 2001], но продуцируются в печени. Гепцидин 20 человека (табл. 1.4) имеет четыре дисульфидных мостика, которые поддерживают структуру β -листа и проявляют умеренную противомикробную активность против *E.coli* [Park C.H. et al., 2001]. Главной функцией гепцидина является регуляция уровня железа в организме [Knutson et al., 2005].

Дермцидин (табл. 1.4) представляет собой анионный АМП, конститутивно экспрессирующийся в потовых железах, но он также присутствует в гранулах нейтрофилов и других типах клеток человека и приматов [Schitteck, 2012]. Этот АМП протеолитически высщепляется из неактивного предшественника и проявляет активность независимо от рН и концентрации соли, а его концентрация в поту составляет 0,2-2,1 мкМ, что позволяет предполагать его важную роль в регуляции микробиоты кожи человека [Schitteck, 2012].

**1.2.7 Антимикробные пептиды, выделенные и охарактеризованные сотрудниками
Отдела общей патологии и патологической физиологии
ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины"**

Среди известных АМПБ есть и пептиды, открытые и охарактеризованные в отделе общей патологии и патологической физиологии Института экспериментальной медицины совместно с коллегами из других научных организаций.

Это антимикробные пептиды семейства кателицидинов из лейкоцитов свиньи – протегрины (PG-1, 2, 3) [Kokryakov et al., 1993] и профенины (1 и 2) [Harwig et al., 1995] (Совместно с американскими исследователями группы профессора Р. Лерера, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США).

Протегрины :

PG-1 RGGRLCYCRRRFCVCGR

PG-2 RGGRLCYCRRRFCICV

PG-3 RGGGLCYCRRRFCVCGR

Профенин-1:

¹ AFPPPNVPGP¹⁰

¹¹ RFPPNFPGP²⁰

²¹ RFPPNFPGP³⁰

³¹ RFPPNFPGP⁴⁰

⁴¹ RFPPNFPGP⁵⁰

⁵¹ PFPPPIFPGP⁶⁰

⁶¹ WFPPPPFRP⁷⁰

⁷¹ PPFGPPRF

Антимикробные пептиды с высоким содержанием пролина из лейкоцитов овцы и козы (различные бактенецины, относящиеся к семейству кателицидинов – OaBAC5, ChBAC5, ChBAC3.4) [Shamova et al., 1999, 2009] (Совместно с американскими исследователями группы профессора Р. Лерера, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США и немецкими исследователями группы профессора Р. Хоффманна из университета г. Лейпцига, ФРГ).

OaBAC5 ¹**RFRPPIRRPPIRPPFRPPFR**²⁰
 ²¹**PPVRPPIRPPFRPPFRPPIGPFP**⁴³

ChBAC5 ¹**RFRPPIRRPPIRPPFNPPFR**²⁰
 ²¹**PPVRPPFRPPFRPPFRPPIGPFP**⁴³

ChBAC3.4 **RFRLPFRRPPIRIHP-PPFYPPFRRFL**

Первые β-дефенсины, выделенные из лейкоцитов птиц (в данном случае из лейкоцитов кур) – галлинацины (Gal-1, Gal-1α, Gal-2) [Harwig et al., 1994] (Совместно с американскими исследователями группы профессора Р. Лерера, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США).

Gal-1 **GRKSDCFRKSGFCAFLKCPSLTLISGKCSRFYL-CCKRIW**

Gal-1α **GRKSDCFRKNGFCAFLKCPYLTLISGKCSRFHL-CCKRIW**

Gal-2 **LFC--KGGSCHFGGCPSHLIKVGSCFGFRS-CCKWPWNA**

Первый β-дефенсин, выделенный из лейкоцитов рептилий (болотной черепахи) – (TBD-1) [Stegemann et al., 2009] (Совместно с немецкими исследователями группы профессора Р. Хоффманна из университета г. Лейпцига, ФРГ).

TBD-1 **YDLSKNCLRLGGICYIGKCPRRFFR-SGSCSRGNV-CCLRFG**

Антимикробный пептид из тела медузы *Aurelia aurita* – аурелин [Ovchinnikova et al., 2006] (Совместно с исследователями из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, руководимыми профессором, д.х.н. Т.В. Овчинниковой).

Аурелин - **AACSDRAHGHICESFKSFCKDSGRNGVKLRANCKKTCGLC**

Антимикробные пептиды из лейкоцитов осетра – аципенсины (Ac1 и Ac2) [Shamova et al., 2014] (Совместно с исследователями из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, руководимыми профессором, д.х.н. Т.В. Овчинниковой).

Ac1 ¹SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLR³⁵
³⁶KGNYAQRVGAGAPVY
 Ac2 SGRGKTGGKARAKAKTRSSRAGLQFPVGRVHLLR

И пептиды, которые являются объектом данной диссертационной работы:

θ-Дефенсины из лейкоцитов обезьян *Macaca mulatta* (RTD-2, RTD-3) и *Papio hamadryas* (PhTD-1, PhTD-3) (Совместно с американскими исследователями группы профессора Р. Лерера, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США и немецкими исследователями группы профессора Р. Хоффманна из университета г. Лейпцига, ФРГ).

RTD-2 :	VCRCLCR G R R G RCLCRCV	RTD-3 :	FCRCICT G R R G TCICRCF
PhTD-1 :	FCRCVCR G R R G TCVCRCV	PhTD-3 :	FCRCVCT G R R G TCVCRCF

α-Дефенсины из лейкоцитов обезьяны *Papio hamadryas* (PHD1-3) (Совместно с американскими исследователями группы профессора Р. Лерера, Калифорнийский университет Лос-Анджелеса, США).

PHD1 **RRICRCRIG-RCLGLEVYFGVCFLLHGRL-ARRCCR**
 PHD2 **RICRCRIG-RCLGLEVYFGVCFLLHGRL-ARRCCR**
 PHD3 **RTCRCLG-RCSRRESYSGSCNINGRI-YSLCCR**

Пептиды из целоцитов морского червя пескожила (*Arenicola marina*) – асеницины (Совместно с исследователями из Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, руководимыми профессором, д.х.н. Т.В. Овчинниковой).

Асеницин-1 **RWCYAYVRIRGVLVRYRRCW**
 Асеницин-2 **RWCYAYVRVRGBVLVRYRRCW**

1.3 Механизмы антибактериального действия катионных антимикробных пептидов

Большинство бактерий потенциально восприимчивы к действию катионных антимикробных пептидов, за исключением некоторых устойчивых видов, таких как *Burkholderia* и большинство бактерий *Serratia* и *Proteus spp.* [Hancock, Patrzykat, 2002.]. Хотя в литературе есть много данных об антимикробной активности катионных пептидов, на самом деле механизм их действия интенсивно изучался и изучается только для нескольких избранных пептидов. По сравнению с конвенциональными антибиотиками, такими как бета-лактамы, которые имеют механизм антимикробного действия, сопряженным с одним целевым сайтом, катионные пептиды потенциально имеют множество мишеней из-за их амфифильной природы и катионного заряда. На протяжении многих лет считалось, что единственным механизмом действия катионных антимикробных пептидов против бактерий и грибов является взаимодействие с клеточной стенкой микроорганизмов и дальнейшее ее разрушение, которое вызывает утечку содержимого клетки и диссипацию мембранного потенциала ее плазмалеммы. Но в последнее время появляется все больше данных в пользу того, что существуют внутриклеточные мишени для действия антимикробных белков и некоторые исследователи делят пептиды на два функциональных класса – разрушающие мембраны и не разрушающие [Powers, Hancock, 2003], хотя такое разделение является довольно размытым, так как один и тот же пептид может по-разному воздействовать на мембраны разных видов бактерий и его действие будет зависеть от концентрации. Независимо от того, к какому из упомянутых классов относится пептид, он должен взаимодействовать с клеточной мембраной (или с двумя мембранами в случае грамотрицательных бактерий) независимо от того будет ли мембрана разрушена в результате этого взаимодействия.

Из-за структурных различий двух основных структурных групп бактерий (грамположительных и грамотрицательных) путь к цитоплазматической мембране, пройденный антимикробными пептидами, будет отличаться. Однако исходное взаимодействие катионного антимикробного пептида с бактериальной клеткой осуществляется с помощью одних и тех же механизмов. Положительно заряженные антимикробные пептиды электростатически притягиваются к полианионной

поверхности клетки благодаря связанным с клеточной стенкой тейхоевой и липотейхоевой кислотами у грамположительных и липополисахаридов (ЛПС) у грамотрицательных бактерий. О процессе взаимодействия катионных АМП с грамотрицательными клетками известно больше. После первоначального электростатического притяжения между катионными антимикробными пептидами и внешним листком наружной мембраны грамотрицательной клетки катионные пептиды инициируют собственный проход через внешнюю мембрану через механизм «самоподдерживаемого» поглощения [Hancock, 1997]. Эти пептиды имеют более высокое сродство к отрицательно заряженным ЛПС, чем нативные двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+} и Ca^{2+} [Jenssen et al., 2006], и, благодаря этому, способствуют образованию областей неустойчивости во внешней мембране, что позволяет осуществлять последующую транслокацию катионных антимикробных пептидов через бислой наружной мембраны.

1.3.1 Мембрано-дезорганизирующие катионные антимикробные пептиды

После прохождения через наружную мембрану катионные антимикробные пептиды могут присоединяться и взаимодействовать с внутренней мембраной (рис. 1.6А). Пока соотношение "пептид:липид" низкое, катионные антимикробные пептиды остаются связанными, параллельно плоскости мембраны [Brogden, 2005]. Однако по мере увеличения соотношения "пептид:липид" эти пептиды способны формировать олигомеры, которые переориентируются относительно плоскости мембраны и нарушают ее целостность, как описано в любой из четырех предложенных моделей: «сборка бочки», тороидальная, агрегатная модель и модель «ковра» (рис. 1.6). Каждая из этих моделей предложена в связи с конкретными воздействиями катионных АМП, но ни одна из них не является универсальной, хотя агрегатная модель объясняет то обстоятельство, что некоторые катионные АМП могут осуществлять умерщвление бактерии, имея в качестве мишени как мембрану, так и внутриклеточные структуры.

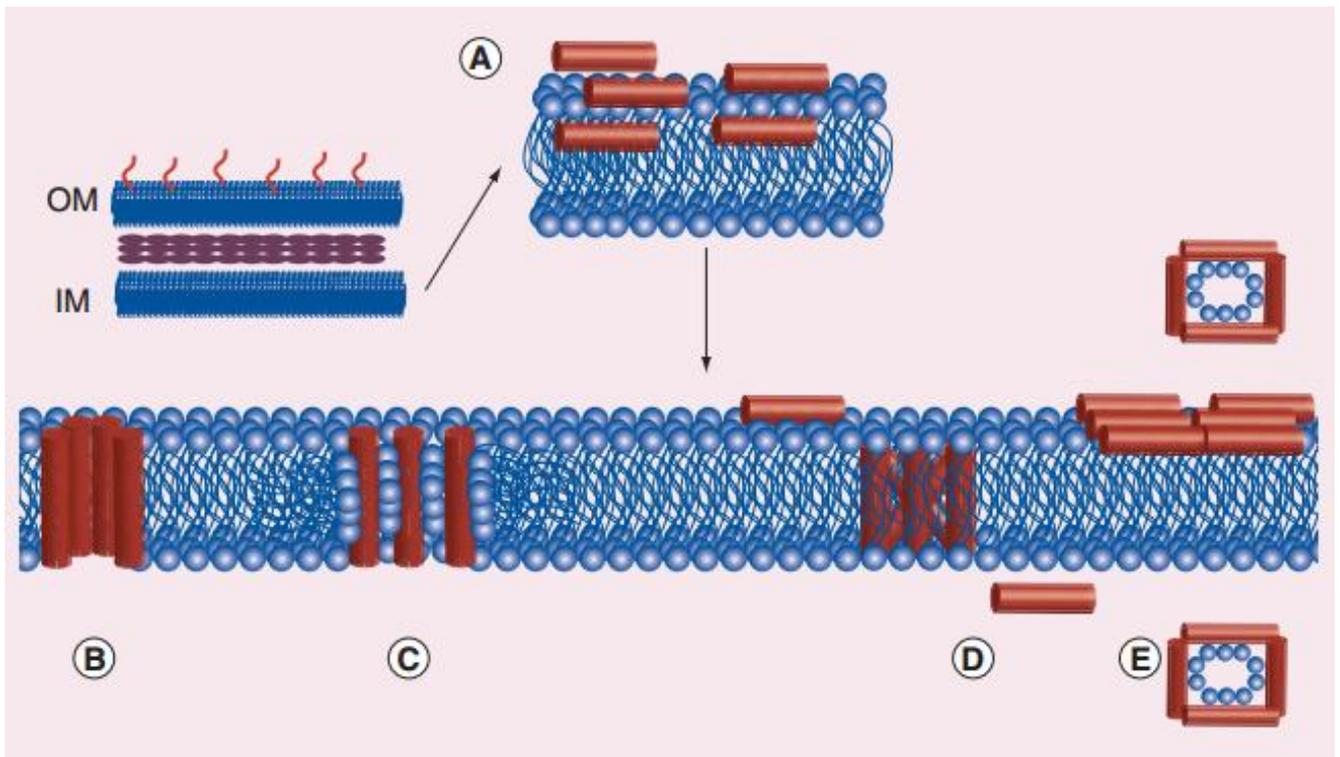


Рисунок 1.6 – Механизмы действия катионных антимикробных пептидов в грамотрицательных бактериях.

В – модель «сборки бочки»; С – модель тороидальной поры; D – агрегатная модель; E – модель ковра. Агрегатная модель позволяет прохождению АМП в цитоплазму. IM: Внутренняя мембрана; OM: Наружная мембрана.

[Hale, Hancock, 2007]

Модель «сборки бочки» – В случае модели «сборки бочки» после ассоциации с цитоплазматической мембраной и критического порогового соотношения "пептид:липид", пептиды переориентируются перпендикулярно и как предполагается пронизывают насквозь липидный бислой. Их ориентация такова, что гидрофобные боковые цепи аминокислот обращены к гидрофобному слою мембраны, а полярные боковые цепи создают гидрофильную пору, которая распространяется на всю толщину мембраны. Создание пор приводит к утечке содержимого клетки – низкомолекулярных фосфорорганических соединений и ионов калия. Однако эта модель не объясняет образование пор для большинства случаев, поскольку образующиеся каналы часто довольно нерегулярны по размеру и времени существования, а также слабо зависят от

основности пептида [Wu et al., 1999]. Такой механизм установлен для пептида аламетицина [Brogden, 2005].

Тороидальная модель – В модели тороидальной поры (также известной как модель червоточки, установленной, например, для магейнина 2 [Yang et al., 1998], пептиды связываются с мембраной и вызывают "искривление" липидов внутрь с образованием канала, "облицованного" фосфолипидными группами и связанными с ними пептидами на границе раздела мембраны, обеспечивая непрерывный канал между внутренним и внешним листками. Пептиды все время остаются связанными с фосфолипидными молекулами, в отличие от модели "сборки бочки", где пептиды только первоначально ассоциируются с фосфатными группами до взаимодействия с липидными хвостами жирных кислот. Образующиеся поры также приводят к утечке содержимого клеток [Matsuzaki et al., 1996].

Агрегатная модель – Агрегатная модель характерна, например, для индолидидина [Bechinger, Lohner, 2006]. После связывания с поверхностью мембраны при достаточных концентрациях пептиды переориентируются, образуя мицеллоподобные комплексы с липидами [Wu et al., 1999]. Эти трансмембранные случайные агрегаты липидов, катионных пептидов и воды могут образовывать канал для утечки ионов и содержимого цитоплазмы, или могут спонтанно распадаться, что приводит к транслокации катионных пептидов в цитоплазму, где они могут достигать внутриклеточных мишеней. Эта модель предлагает объяснение того, как катионные антимикробные пептиды могут нарушать целостность мембраны и допускает транслокацию пептида через мембрану к цитоплазме [Hancock, Patrzykat, 2002].

Модель ковра – В отличие от других моделей, в модели ковра катионные антимикробные пептиды не встраиваются в мембрану, а остаются связанными с межфазной областью внешнего листка цитоплазматической мембраны. В критической точке масса пептидов образует «ковер», который способен вызывать неустойчивость внутри бислоя, нарушая мембранный потенциал клетки, вызывая образование мицелл и разрушение мембраны. [Wu et al., 1999]. Такой механизм установлен для цекропина [Gazit et al., 1995].

1.3.2 Антимикробные пептиды, не разрушающие мембраны

Стоит отметить, что во многих исследованиях механизма антимикробного действия пептидов были использованы высокие концентрации пептидов (значительно выше МИК), что могло маскировать их внутриклеточное действие [Patrzykat et al., 2002.], выступать в качестве дополнительного киллерного фактора.

Действительно, можно говорить, что практически любой антимикробный пептид, при высоких концентрациях, то есть выше, чем физиологически релевантные концентрации, может вызвать пермеабиллизацию мембраны [Shai, 1995]. Например, в минимальной ингибирующей концентрации аналог плеуроцидина (pleurocidin) может быстро ингибировать синтез РНК и белка в клетках без какого-либо влияния на целостность мембраны, что свидетельствует о его внутриклеточной локализации и действии, а при увеличении концентрации пептида в десять раз клетки становились деполяризованными, что указывает на разрушение мембраны [Patrzykat et al., 2002].

Данные свидетельствуют о том, что для ряда катионных антимикробных пептидов действие на внутриклеточные мишени может быть либо основным механизмом антимикробного действия после их транслокации через мембрану, либо выступать как аддитивный эффект, в сочетании с (часто неполным) разрушением мембраны [Peschel, Sahl, 2006]. Предполагается, что катионные антимикробные пептиды имеют «многоцелевой» механизм действия [Powers, Hancock, 2003], благодаря чему они могут взаимодействовать с несколькими анионными мишенями, включая нуклеиновые кислоты и клеточные ферменты.

Например, несмотря на то, что цекропин и магейнин 2, как правило, считаются примерами пептидов разрушающих мембрану, было показано, что цекропин оказывает влияние на транскрипцию многих генов *Escherichia coli* в минимальной ингибирующей концентрации [Hong et al., 2003], что указывает на возможное внутриклеточное действие, а для магейнина была продемонстрирована его транслокация в клетку [Haukland et al., 2001]. Также показано, что LL-37 может влиять на экспрессию многих генов *Pseudomonas aeruginosa* при концентрациях, существенно ниже МИК [Hale, Hancock, 2007], хотя многие данные указывают на то, что этот пептид действует через разрушение мембраны.

1.3.2.1 Антимикробные пептиды, реализующие свое действие посредством связывания с нуклеиновыми кислотами

Было показано, что многие катионные антимикробные пептиды взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК). В частности, было установлено, что буфорин II может транслоцироваться через липидные бислои липосом [Hong et al., 2003], а буфорин II меченый фторизотиоцианатом (FITC) в низкой концентрации проникает в цитоплазматическую мембрану *E.coli* и накапливается внутри, не вызывая нарушения мембраны или лизиса клеток [Park et al., 1998]. Также было продемонстрировано, что буфорин II может связываться с ДНК [Park et al., 1998], что не удивительно, учитывая, что буфорин II является производным пептида буфорин I, который в свою очередь разделяет 37 из 39 аминокислот гомологии с N-концевой областью ядерного белка гистона H2A [Park et al., 1996].

Интересно, что буфорин образует α -спираль с пролиновым "шарниром" (очень распространенный мотив среди антимикробных пептидов), и когда этот остаток пролина удаляли, пептид не мог проникать в клетки, вместо этого локализуясь на поверхности клетки и проникая в клеточную мембрану, что указывает на то, что небольшие изменения в первичной структуре могут существенно повлиять на активность пептидов [Park et al., 2000].

Другим примером пептида, связывающегося с нуклеиновыми кислотами, является индолицидин, который представляет собой богатый триптофаном (39%) кателицидин, состоящий из 13 аминокислотных остатков. Изначально считалось, что его механизм действия заключается в мембранной пермеабилитации, но в одном из исследований было обнаружено, что при добавлении индолицидина происходит филаментация клеток *E.coli*, свидетельствующая об ингибировании деления клеток, что коррелирует с отсутствием включения тимидина в клетку [Subbalakshmi, Sitaram, 1998]. Дальнейшие исследования также показали, что индолицидин может связываться с ДНК. Установлено, что этот пептид влияет на активность ДНК-связывающего фермента человека топоизомеразу 1, которая участвует в "разворачивании" суперспиральной ДНК [Marchand et al. 2006].

1.3.2.2 Антимикробные пептиды, осуществляющие свое действие через влияние на синтез белка

Было показано, что PR-39 ингибирует синтез белка в *E.coli*. В результате прекращения синтеза белка синтез ДНК также прекращается из-за деградации ферментов репликации ДНК [Voman et al., 1993]. Другие катионные антимикробные пептиды, которые, как было продемонстрировано действуют на синтез белка, включают в себя альфа-спиральные пептиды – дермасептин и плеуроцидин (pleurocidin), а также пептид с бета-структурой – дефенсин нейтрофилов человека HNP-1 [Jenssen et al., 2006].

1.3.3 Синергическая активность антимикробных пептидов

Синергия возникает, когда два противомикробных препарата работают сообща, в результате чего уменьшается индивидуальная концентрация каждой молекулы, необходимая для уничтожения микроорганизма. Возможно, что это возникло естественным образом у многих высших организмов, поскольку практически все они продуцируют более одного пептида в большинстве клеточно-тканевых структурах организма (например, на коже человека [Chen et al. 2005]). Однако, несмотря на многие исследования, посвященные синергизму между катионными антимикробными пептидами, можно считать, что действительно в качестве синергизма можно рассматривать только те варианты, при исследовании которых использовали стандартизованные методы, такие как метод титрования принципом шахматной доски [Yan, Hancock, 2001]. С помощью этих методов было показано, что несколько антимикробных пептидов демонстрируют синергию, например, протегрин 1 с индолицидином, бактенецином или LL37 [Yan, Hancock, 2001]. В этом же исследовании индолицидин и бактенецин, которые естественно сосуществуют у коров, также демонстрировали синергизм. Другое исследование показало, что два из трех галлинацинов проявляют усиленную активность против *Salmonella enteritidis* [Milona et al., 2007]. HVD-3 проявляет синергическое действие с LL-37 [Abou Alaiwa et al., 2014].

Объединенный эффект двух противомикробных препаратов, работающих в разных компартментах бактерий, может обеспечить более эффективное умерщвление. Показано, что АМП проявляют синергизм антимикробного действия с

конвенциональными антибиотиками. Преимущественно наблюдается проявление синергизма с антибиотиками, влияющими на внутриклеточный синтез биомолекул. Одним из механизмов синергических эффектов может быть облегчение проникновения антибиотика в клетку, а также влияние с его стороны на динамику взаимодействия АМП с бактериальными мембранами [Жаркова, 2014].

1.4 Биологические функции антимикробных пептидов отличные от антибиотических

1.4.1 Антимикробные пептиды как хемоаттрактанты

Представления об АМП только как об антибиотических агентах, связывающихся с клеточными мембранами исключительно благодаря амфипатической структуре, не предполагали возможных лиганд-рецепторных взаимодействий. Об относительной неспецифичности связывания говорили и эксперименты по изучению пептидов, синтезированных из D-энантиомеров аминокислот, которые не теряли своей антимикробной активности по сравнению с природными пептидами, состоящими из L-аминокислот [Cho Y. et al., 1998].

В то же время уже в 1989 году было показано, что α -дефенсин из нейтрофилов человека HNP-1 проявляет *in vitro* хемотаксическую активность в отношении моноцитов [Territo et al., 1989]. В дальнейшем это свойство было выявлено и для других АМП. Не только в экспериментах *in vitro* [Ichinose et al., 1996], но в опытах *in vivo* было показано, что α - и β -дефенсины мобилизуют моноциты, незрелые дендритные клетки, нейтрофилы, макрофаги, CD4 + Т-клетки (CD45 RA+) и CD8 + Т-клетки [Chertov et al., 1996; Yang et al., 1999, 2000a]

Для пептидов кателицинового семейства также установлено, что, в частности, PR-39 стимулирует миграцию нейтрофилов даже при концентрациях 0,5 мкг/мл, но не вызывает миграцию мононуклеарных лейкоцитов, таких как моноциты, и альвеолярные макрофаги [Huang et al., 1997]. Более широкую хемотаксическую активность проявляет кателицидин человека LL-37. Было показано, что он привлекает различные лейкоциты, такие как нейтрофилы, эозинофилы [Tjabringa et al., 2006], моноциты и CD4⁺Т-клетки

через рецептор FPRL1 [Yang et al., 2000b], а тучные клетки через рецепторы MrgX2 [Subramanian et al., 2011].

Примечательно, что LL-37 может индуцировать хемотаксис разных типов клеток с помощью двух разных рецепторов, MrgX2 и FPRL1 (хотя оба относятся к рецепторам, сопряженным с G-белками). Следовательно, можно задаться вопросом, могут ли LL-37 или другие АМП вызывать миграцию через другие рецепторы, которые еще не исследованы. Кроме того, возможно, что некоторые хемотаксические эффекты LL-37 еще не были обнаружены из-за использования клеточных линий в таких экспериментах, а не свежесыведенных лейкоцитов. Например, исследователи наблюдали LL-37-индуцированную миграцию моноцитов крови, полученных из крови, но не моноцитов линии клеток THP-1 [Yang et al., 2000b, Bowdish et al., 2005].

Способность изоформ β -дефенсинов человека HBD-2 и мыши mBD-2 выступать в роли эндогенных хемоаттрактантов для незрелых дендритных клеток [Yang et al., 2002] представляет особый интерес в связи с тем, что в рассматриваемом случае выявлен рецептор дефенсиновых молекул, представляющий собой CCR6 молекулу, ранее описанную как рецептор эндогенного хемокина MIP-3 α для незрелых дендритных клеток. Группа американских исследователей во главе с профессором Дж. Оппенгеймом предполагает, что именно с хемотаксической активностью для незрелых дендритных клеток некоторых изоформ дефенсинов связана их способность выступать в роли эндогенных адьювантов – соединений, усиливающих реакции приобретенного (адаптивного) иммунитета. Было показано, что взаимодействие HBD-2 с незрелыми дендритными клетками способствует дифференцировке последних в зрелые формы, являющиеся эффективными антигенпредставляющими клетками. Это свойство дефенсинов было подтверждено в опытах на мышах с целью создания у них эффективного противоопухолевого иммунитета [Yang et al., 2002].

1.4.2 Антимикробные пептиды как дегрануляторы тучных клеток

Показано, что α -дефенсины из нейтрофильных гранулоцитов морской свинки, человека, крысы и кролика вызывают дегрануляцию тучных клеток [Vefus et al., 1999], также как и β -дефенсины и LL-37 человека [Niyonsaba et al., 2001] с высвобождением гистамина и простагландинов, инициирующих локальный воспалительный процесс.

Повышение активности ГТФазы в мембранах тучных клеток указывало на сходство механизмов действия дефенсинов и субстанции Р (нейропептида широкого спектра действия), действующей, как и большинство нейропептидов, через рецепторы, сопряженные с G-белками. В пользу этого также свидетельствуют эксперименты, показывающие ингибирование высвобождения гистамина из тучных клеток под действием дефенсинов коклюшным токсином – ингибитором рецепторов, сопряженных с G-белками [Befus et al., 1999].

В настоящее время установлено, что LL-37 стимулирует дегрануляцию тучных клеток через рецептор MrgX2 (относящийся к рецепторам, сопряженным с G-белком) [Yu et al., 2017]. Это приводит к высвобождению гистамина и простагландина D2, которые в свою очередь стимулируют хемотаксис, диапедез лейкоцитов и воспаление [Subramanian et al., 2011]. Дегрануляция тучных клеток может быть вызвана LL-37 в концентрации 10 мкг/мл, которая может иметь место в очагах воспаления во время инфекций [Yu et al., 2017]. Однако LL-37-индуцированная дегрануляция линии тучных клеток LAD2 человека может быть ингибирована одновременным введением лигандов Toll-подобного рецептора TLR-2 [Zhang Y. et al., 2016], что вызывает сомнения в том, будет ли такая дегрануляция иметь место в условиях реального инфекционного процесса.

1.4.3 Антимикробные пептиды модулируют продукцию хемокинов и цитокинов

Показано, что АМП могут непосредственно влиять на продукцию хемокинов и цитокинов иммунными клетками. Причем в зависимости от концентрации АМП, наличия провоспалительного агониста или временного порядка воздействия на клетки реакция клеток может отличаться кардинальным образом [Harvey et al., 2013].

Как правило, клетки, подвергшиеся воздействию АМП в довольно высокой концентрации от 10 до 100 мкг/мл, продуцируют значимые количества хемокинов и провоспалительных цитокинов дозозависимым образом. Кератиноциты, обработанные бета-дефенсинами человека HBD2, HBD3 или HBD4 в концентрации 30 мкг/мл, продуцируют повышенные количества ИЛ-6, MCP-1, MIP-3 α и RANTES [Niyonsaba et al., 2007]. Моноциты и макрофаги, обработанные 20 мкг/мл HBD3 или 20 мкг/мл LL-37, продуцируют MCP-1, MIP-1, MIP-1 и VEGF [Petrov et al., 2013].

Кателицидин свињи PR-39 в концентрации 80 мкг/мл усиливает выработку ФНО α в клеточной линии макрофагов свињи 3D4/31 [Veldhuizen et al., 2014].

АМП стимулируют процессинг и выход ИЛ-1 из моноцитов и макрофагов. Показано, что обработка моноцитов кателицидином человека LL-37 в концентрации 40-80 мкг/мл (или 10-20 мкМ) усиливает процессинг и выход ИЛ-1 β из клеток в условиях *in vitro*, причем действие осуществляется через рецептор P2X $_7$, который является рецептором внеклеточной АТФ [Elssner et al., 2004]. Установлено, что альфа-дефенсин человека HNP-1 в концентрации 100 мкг/мл стимулирует процессинг и выход ИЛ-1 из моноцитов крови человека в экспериментах *in vitro* [Perregaux et al., 2002]. Кателицидины свињи протегрины в тех же условиях вызывают максимальный процессинг ИЛ-1 в концентрации 10 мкг/мл, который снижается при повышении концентрации, а другой кателицидин свињи PR-39 такого действия не оказывал. Причем ингибиторы рецептора P2X $_7$ не влияют на активность протегрина, в отличие от ингибиторов каспаз [Perregaux et al., 2002].

Необходимо отметить, что эффективность процессинга и выхода ИЛ-1 из моноцитов человека под действием АМП зависела от состава инкубационной среды, наличия или отсутствия ионов калия, кальция, магния и т.п. [Perregaux et al., 2002]. Остается неясным, происходит ли индукция продукции цитокинов под действием АМП в условиях целого организма, и являются ли повышенные уровни этих цитокинов биологически значимыми.

1.4.4 Антимикробные пептиды как стимуляторы фагоцитоза

АМП стимулируют поглощение патогенных микроорганизмов фагоцитами. α -Дефенсины усиливают фагоцитоз макрофагов у различных видов животных, выступая в качестве опсоинов [Fleischmann et al., 1985].

LL-37 связывается с бактериями и может одновременно связываться с рецептором комплемента MAC-1 на моноцитах и макрофагах, тем самым опсонизируя бактерии [Lishko et al., 2016]. Кроме того, LL-37 и mCRAMP могут опосредованно стимулировать фагоцитоз у макрофагов человека посредством активации рецептора FPRL1, что приводит в свою очередь к активации Fc γ -рецепторов CD32 и CD64, TLR4, и ко-рецептора TLR4 – CD14 [Wan et al., 2014].

Дополнительной и хорошо известной функцией является способность антимикробных пептидов, особенно дефенсинов, регулировать активацию комплемента. Причем, дефенсины, в зависимости от различных условий могут, как активировать классический путь активации комплемента [Prohaszka et al., 1997], так и ингибировать его [van den Berg et al., 1998]. Показано, что ареницин – АМП из пескожила, также модулирует активацию комплемента, при низких концентрациях активирует, а при относительно высоких – ингибирует [Umnyakova et al., 2018].

1.4.5 ДНК- и РНК-опосредованная активация TLR антимикробными пептидами

Показано, что LL-37 стимулирует поглощение CpG-ДНК и активацию TLR9 в В-клетках и плазматических дендритных клетках (pDCs), но не в Т-лимфоцитах, в присутствии сыворотки [Hurtado, Peh, 2010]. Это свидетельствует о том, что LL-37 может стимулировать поглощение ДНК при физиологических условиях, что может быть одним из ведущих факторов при аутоиммунных заболеваниях, таких как псориаз, где LL-37 образует комплекс с собственной ДНК человека и активирует pDCs [Lande et al., 2007].

ДНК- и РНК-опосредованная активация TLR в pDCs и макрофагах является общей особенностью кателицидинов и была продемонстрирована среди прочих для VMAP-27, VMAP-28, VMAP-34, Vac-1, PMAP-23, PMAP -36 и PR-39 [Baumann et al., 2014, Baumann et al., 2017].

1.4.6 Ингибирование антимикробными пептидами агонист-опосредованной активации TLR

Компоненты бактериальных оболочек, такие как ЛПС, липотейхоевая кислота и флагеллин, являются активаторами TLR4, TLR2 и TLR5 соответственно [Akira S., 2001]. Системная иммунная активация эндотоксинами может быть фатальной, поэтому ингибирование воспалительных реакций во время сепсиса необходимо для защиты хозяина от чрезмерной иммунной активации.

Как уже указывалось в разделе 1.3, АМП имеют повышенное сродство к компонентам бактериальной клеточной стенки и можно предположить, что, связывая

ЛПС или липотейхоевую кислоту в растворе, АМП могут нейтрализовать их действие на паттерн-распознающие рецепторы иммунных клеток. Такие эффекты показаны, прежде всего, на культурах клеток или на выделенных клетках. Среди АМП эти свойства были лучше исследованы у кателицидинов.

Показано, что кателицидины LL-37 человека, mCRAMP мыши, K9CATN собаки, PMAP-36 свиньи, chCATN-1-3 кур, BMAP-28 и индолицидин крупного рогатого скота, ингибируют ЛПС-индуцированную продукцию TNF- α различными лейкоцитами, такими как макрофаги, моноциты и дендритные клетки [Coorens et al., 2017, Giacometti et al., 2004b, Bowdish et al., 2005, Mookherjee et al., 2006b]. Причем, индолицидин, BMAP-27 и LL-37 ингибируют ЛПС-индуцированную продукцию ФНО α даже при введении через 1 ч после воздействия ЛПС, но в меньшей степени, чем совместное введение [Scott et al., 2002, Bowdish et al., 2005, Mookherjee et al., 2006b]. Таким образом, можно предположить, что ингибирование ЛПС-опосредованной активации TLR4 происходит не только в результате прямого связывания кателицидинов с ЛПС.

LL-37 и BMAP-27 могут ингибировать индуцированную эндотоксином транслокацию NF κ B в ядра моноцитов [Mookherjee et al., 2006a]. BMAP-28 ингибирует не только активацию TLR4, но и уменьшает вызванную LPS интернализацию поверхностного TLR4, необходимую для инициации сигнального пути TRAM/TRIF, что обеспечивает механизм ингибирующего действия пептида на TLR4/TRAM/TRIF. путь [D'Este et al., 2012].

Аналогично, дефенсины ослабляют вызванную агонистами паттерн-распознающих рецепторов продукцию хемокинов и цитокинов. α -Дефенсины человека HNP-1-3 ослабляют продукцию ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-6 и ИЛ-1 β , вызванную грамотрицательной бактерией *P. aeruginosa*, в макрофагах, полученных из моноцитов человека [Miles et al., 2009] α -Дефенсины человека HNP-1 и HNP-3, так же как и бета-дефенсины человека HBD1, HBD2, HBD3 и DEFB104A снижают ЛПС-индуцированную продукцию ИЛ-1, ИЛ-8 и ICAM-1 в моноцитах человека линии THP-1 при предварительной инкубации АМП и ЛПС [Lee S. et al., 2010]. β -Дефенсины человека также снижают ЛПС-стимулированную продукцию ФНО α в мышинных макрофагах линии RAW264.7 [Motzkus et al., 2006].

Наконец, θ -дефенсин из лейкоцитов макак-резуса RTD-1 ингибирует продукцию ФНО α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β лейкоцитами

периферической крови человека, индуцируемую агонистами рецепторов TLR2, 4 и 5 [Schaal et al., 2012].

1.4.7 Участие антимикробных пептидов в реализации защитных функций организма *in vivo*

Системные противовоспалительные эффекты АМП продемонстрированы на моделях инфекции *in vivo*. Бычий ВМАР-28 (2 мг/кг) снижает летальность от сепсиса у мышей при внутривенном введении *S. aureus* в той же степени, что и антибиотик имипенем (7 мг/кг) [Giacometti et al, 2004b]. Внутривентральное введение бычьего Вас7 (1 мг/кг) и овечьего sМАР-29 также снижало смертность у крыс, вызванную внутривентральным введением живых *E. coli*, до тех же уровней, что и антибиотик полимиксин В (1 мг/кг), [Giacometti et al., 2004a]. Введение мышам θ -дефенсинов защищает их от бактериального сепсиса, вызванного *E.coli* [Schaal et al., 2012] и снижают летальность при инфицировании вирусом гриппа [Prantner et al., 2017].

Исследования на мышах, дефицитных по матрилизину показали значимость α -дефенсина клеток Панета для защиты организма от сальмонеллезной инфекции [Wilson et al., 1999]. Кишечные α -дефенсины секретируются в виде неактивной формы и активируются путем расщепления предшественника матрилизином ММП-7. Матрилизин-дефицитные мыши, которые не способны активировать кишечные α -дефенсины в клетках Панета, в значительной степени подвержены летальной инфекции *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). Кроме этого, трансгенные мыши, которые дополнительно экспрессировали α -дефенсин человека HD-5, продемонстрировали повышенную устойчивость к летальной дозе бактерий *S. typhimurium*, кроме того, микробиота кишечника этих мышей трансгенных по HD5 значительно изменилась, что указывает на то, что кишечные альфа-дефенсины могут влиять на микробную экологию в кишечнике [Salzman et al., 2003].

Кроме того, была описана недостаточная экспрессия α -дефенсинов HD-5 и HD-6 в клетках Панета у пациентов с болезнью Крона подвздошной кишки [Ouellette, 2004; Wehkamp et al., 2007]. Эти данные подтверждают один из вариантов этиологии рассматриваемой болезни, который постулирует, что она может начаться с кишечной бактериальной инфекции, которая приводит к самоподдерживаемой воспалительной

реакции в слизистой оболочке у генетически восприимчивых людей. Дефект в продукции α -дефензинов при болезни Крона подвздошной кишки был обнаружен у пациентов с мутациями в гене белка внутриклеточного рецептора NOD2, и особенно у пациентов со сниженной экспрессией транскрипционного фактора TCF4 [Wehkamp et al., 2007].

Нокаут по гену mCRAMP (единственный пептид семейства кателицидинов у мышей) сделал мышей более восприимчивыми к тяжелой стрептококковой инфекции группы A [Nizet et al., 2001]. Такие мыши также показали более тяжелые реакции на контактный дерматит, чем контрольные мыши [Di Nardo et al., 2007].

Продемонстрированы возможные негативные последствия избыточной продукции АМП, в частности β -дефенсина. Были созданы трансгенные мыши со сверхэкспрессией mBD-6 под контролем промотора β -актина цыпленка. Мыши с высокой экспрессией mBD-6, как правило, не доживали до года, одной из характерных черт у таких мышей была тяжелая потеря массы тела и тяжелый кифоз, указывающий на функциональное нарушение скелетных мышц [Yamaguchi et al., 2007].

Трансгенные мыши, которые содержали α -дефенсин человека в нейтрофилах, показали более выраженную проницаемость сосудов после интратрахеальной инстилляцией HCl по сравнению с мышами дикого типа, что указывает на то, что дефенсин нейтрофилов может вносить негативный вклад в развитие острого респираторного дистресс-синдрома, вызванного аспирацией кислотного содержимого [Bdeir et al., 2010].

Исследования количества копий генов дефензинов выявили интересную связь между их количеством и воспалительными заболеваниями. Количество копий нейтрофильных генов α -дефенсина у пациентов с тяжелым сепсисом было значительно выше, чем у здоровых людей [Chen et al., 2010]. Сравнение количества копий генов β -дефензинов между пациентами с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и здоровыми курильщиками показало, что наличие 5 или более копий β -дефенсина было связано с увеличением частоты ХОБЛ [Janssens et al., 2010]. Кроме того, высокая частота псориаза была в значительной степени связана с более высоким числом копий генов β -дефенсина [Hollox et al., 2008].

Противоречивые данные получены о вовлеченности дефензинов в патогенез атеросклероза. Они были обнаружены в атероматозных бляшках [Higazi et al., 1997;

Barnathan et al., 1997], хотя до сих пор не ясно, является ли их повышенная экспрессия полезной или вредной для сосудистой стенки. Дефенсины участвуют в деградации липопротеинов в эндотелии, и им приписывают антифибринолитическую активность [Nigazi et al., 2000; Nigazi et al., 1996]. С другой стороны, исследования на животных показали, что дефенсины нейтрофилов человека вызывают эндотелиальную дисфункцию в коронарных артериях свиньи, уменьшая эндотелий-зависимую вазодилатацию [Kougiyas et al., 2006].

1.4.8 Действие антимикробных пептидов на ангиогенез и заживление ран

Доказано, что АМП играют важную роль в заживлении ран и ангиогенезе.

В 1989 году сотрудниками Института экспериментальной медицины и МГУ им. М.В. Ломоносова было показано, что многократное внутримышечное введение крысам α -дефенсинов кролика приводит к увеличению плотности микрососудов в скелетной мышце, увеличению диаметра капилляров и артериол. Увеличение числа микрососудов к числу мышечных волокон свидетельствует о том, что хроническое введение дефенсина явилось стимулом ангиогенеза [Кудряшов и др., 1989].

LL-37 индуцирует миграцию кератиноцитов, необходимую для повторной эпителизации раны. LL-37 также является важным фактором в пролиферации и образовании сосудоподобных структур и индуцирует ангиогенез, важный для неоваскуляризации раны посредством прямой активации FPRL-1, экспрессируемого на эндотелиальных клетках [Koczulla et al., 2003]. Присутствие LL-37 было связано с антифиброзными эффектами, которые могли способствовать нормальному заживлению ран, путем ингибирования экспрессии коллагена на дермальных фибробластах [Lai Gallo, 2009]. В случае дефенсинов показано, что hBD-2 стимулирует миграцию, пролиферацию эндотелиальных клеток в ранах и образование ими трубок, что приводит к ускоренному закрытию раны [Baroni et al., 2009].

1.4.9 Кортикостатическое действие антимикробных пептидов

В 1988 году канадскими учёными было впервые обнаружено, что некоторые дефенсины, содержащиеся в гранулах псевдоэозинофилов гранулоцитов (и названные

кортикостатинами) подавляют продукцию кортикостерона клетками культуры ткани надпочечников [Zhu et al., 1988]. Среди них дефенсины из нейтрофилов морской свинки GPCR-1 и GPCR-2, кролика – NP-3a, NP-3b и NP-6, человека – HNP-4, крысы – RatNP-1.

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 экспериментальном стрессе и отменяет стресс-индуцированную иммуносупрессию у экспериментальных животных [Шамова и др., 1993; Шамова и др., 1995]. Эти результаты получили подтверждение в работах американских исследователей, показавших, что введение синтезированного кортикостатина-1 крысы (RatNP-1) снижает уровень кортикостерона в крови крыс при стрессе [Cervini, et al., 1995].

Исследователи из лаборатории доктора С. Соломона доказали, что дефенсины с кортикостатической активностью способны конкурентно связываться с рецепторами АКТГ – меланокортиновым рецептором 2 (MkP2) на клетках коркового слоя надпочечников *in vitro* и подавлять в них продукцию кортикостерона. Это кортикостатическое действие по предположению авторов было обусловлено наличием блока остатков аргинина вблизи N-конца молекулы пептида, похожий блок есть и у АКТГ [Solomon, 1993].

Также для другой формы дефенсинов – β -дефенсинов, было показано, что, они могут быть лигандами для других изоформ меланокортиновых рецепторов. Так установлено, что пигментация у собак связан с мутацией в гене β -дефенсина собаки CBD103. Показано, что этот дефенсин конкурирует с α -меланоцитстимулирующим гормоном за связывание с меланокортиновым рецептором 1 (MkP1), а у мышей трансгенных по этому гену изменяется не только цвет шерсти, но и вес. Продемонстрировано, что по крайней мере, два β -дефенсина человека (hBD1 и hBD3) являются лигандами для MkP1 человека. А изоформа β -дефенсина собаки CBD103 связывается не только с MkP1 собаки, но и с MkP4 человека [Kaelin et al., 2008].

Весь этот объем данных позволяет говорить о том, что антимикробные пептиды являются не только эффекторными молекулами врожденного иммунитета, чьи функции ограничены прямым антимикробным действием. Они вовлечены в регуляцию и реализацию более широкого круга защитных и физиологических реакций организма.

1.5 Современные представления о системе нейтрофильных гранулоцитов

Система нейтрофильных гранулоцитов (НГ) традиционно рассматривается как одна из первых линий защиты макроорганизма от вторгающихся в его тело микробов [Мечников, 1903; Пигаревский, 1978; Klebanoff, Clark, 1978; Маянский, Маянский, 1983]. В классических морфофизиологических исследованиях И.И.Мечникова и его учеников изучена феноменология фагоцитарного процесса, осуществляемого НГ (микрофагами, псевдоэозинофилами, гетерофилами), доказана его незаменимая роль во врожденном иммунитете животных к инфекционным агентам различной биологической природы. Именно И.И. Мечников прозорливо подчеркнул важное значение «цитаз» – внутриклеточных микробоцидных веществ – в обеспечении завершеного фагоцитоза. В его работах функции фагоцитов (микро- и макрофагов) рассматривались со сравнительно-эволюционных позиций, что позволило показать их ключевую роль в формировании врожденного иммунитета [Мечников, 1903].

Современные исследования показали, что пациенты с врожденной нарушенной функцией нейтрофилов (нейтропении, нарушения адгезии, дефицит гранул), как правило, подвержены инфицированию бактериями (преимущественно *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*) и грибами (например, *Aspergillus* и *Candida*), но не вирусами и паразитами. Входные ворота инфекции включают кожу, слизистые оболочки и легкие, но может быть затронут любой участок организма, и абсцессы являются распространенным явлением [Shah et al., 2017].

1.5.1 Морфология нейтрофильных гранулоцитов

Нейтрофилы являются одной из самых многочисленных разновидностей лейкоцитов, а для человека самой многочисленной. До 60% гематопэтической активности костного мозга может быть направлено на выработку нейтрофилов. Ежедневно в кровь поступает 10^{11} этих клеток. Развитие нейтрофилов в костном мозге занимает около 14 дней, начиная с гемопоэтических стволовых клеток [Klebanoff, Clark, 1978].

Механизмы, регулирующие дифференцировку нейтрофилов, остаются не полностью понятыми, однако, установлена роль определенного набора факторов

транскрипции и цитокинов, которые, по-видимому, направляют стволовые клетки и клетки-предшественницы к дифференцировке в направлении нейтрофилов. Основным среди цитокинов, регулирующих гранулопоэз, является гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF). Эффекты G-CSF включают индукцию миелоидной дифференцировки, пролиферацию предшественников гранулоцитов и высвобождение зрелых нейтрофилов из костного мозга [Lord et al., 1989].

Стволовые клетки, которым суждено стать нейтрофилами, сначала дифференцируются в миелобласты, которые сохраняют способность развиваться в эозинофилы, базофилы и нейтрофилы. Последующая дифференцировка приводит к нейтрофильному промиелоциту, предшественнику нейтрофилов, и далее проходит стадии нейтрофильных миелоцитов, метамиелоцитов, палочкоядерных нейтрофилов и зрелых сегментоядерных нейтрофилов. На стадии метамиелоцитов нейтрофильный митоз прекращается, тогда как развитие нейтрофилов и формирование гранул продолжают.

Интенсивный гранулогенез начинается на стадии промиелоцита, когда на уровне аппарата Гольджи формируются лизосомоподобные инициальные вакуоли, сливающиеся в цитоплазме с образованием первичных, или азурофильных, гранул [Bainton et al., 1971].

В азурофильных гранулах содержатся антимикробные катионные пептиды дефенсины, кислые гидролазы (β -глицерофосфатаза, N-ацетил- β -гликозаминидаза, β -глюкуронидаза, α -маннозидаза, катепсин D, катепсин B), нейтрально-щелочные протеазы (эластаза, катепсин G), лизоцим и миелопероксидаза (МПО) [Faurischou, Borregaard, 2003] (табл. 1.5). Наличие кислых гидролаз делает их схожими с лизосомами, но на уровне мембран они отличаются от настоящих лизосом отсутствием мембранных белков, ассоциированных с лизосомами (LAMP)-1 и -2, и системы маннозо-6-фосфатных рецепторов [Nauseef et al., 1992].

Методом электронной гистохимии МПО выявляется во всех элементах секреторного аппарата промиелоцитов: в каналах эндоплазматического ретикулума, во внутренних цистернах аппарата Гольджи, в инициальных вакуолях и зрелых азурофильных гранулах [Bainton, Farquhar, 1966]. Поскольку этот фермент синтезируется только на стадии промиелоцита, его можно признать биохимическим и

цитохимическим маркером промиелоцитарной стадии дифференцировки НГ человека и млекопитающих [Bainton et al., 1971].

Необходимо отметить, что часть азурофильных гранул начинает функционировать вскоре после своего образования. Одна из таких функций – их участие в физиологической деструкции митохондрий путем аутофагоцитоза во время миелоцитарной стадии созревания [Пигаревский, 1982].

На этом этапе начинается формирование вторичных гранул. Вторичные гранулы нейтрофилов составляют популяцию, уникальную для нейтрофилов, что отражено в их другом названии – специфические. Специфические гранулы обладают обширным набором мембранно-ассоциированных белков, включая цитохромы, сигнальные молекулы и рецепторы (табл. 1.5). Эти гранулы представляют собой резервуар белков, предназначенных для локализации на внешних поверхностях фагоцитарных вакуолей и плазматической мембраны [Vorregaard et al., 1993]. Одним из важных семейств протеиназ, обнаруживаемых в специфических гранулах, являются матриксные металлопротеиназы (ММП), ММП хранятся в виде неактивных проферментов и активируются путем протеолиза при взаимодействии с содержимым азурофильных гранул после слияния гранул с фагоцитарной вакуолью. ММП разрушают мембранные компоненты фагоцитированных бактерий. Однако функция ММП нейтрофилов не ограничивается уничтожением бактерий. Например, ММП также важны для экстравазации нейтрофилов и диапедеза [Owen, Campbell, 1999].

Набор антимикробных белков и пептидов также отличается у азурофильных и специфических гранул. Общим белком является только лизоцим. Важное место в специфических гранулах занимает железо-связывающий белок лактоферрин, являющийся маркером специфических гранул, и антимикробные пептиды кателицидины, которые, как и ММП, хранятся в специфических гранулах виде неактивных пропептидов.

Содержимое гранул может изменяться, как в ходе постнатального развития организма, так и в результате постмитотического развития самих клеток. Например, установлено, что в костном мозге новорожденных кроликов 90-95 % всей популяции гранул нейтрофильных промиелоцитов дают отрицательную реакцию на пероксидазу, хотя и содержат другие катионные белки. Пероксидаза появляется в нейтрофильных промиелоцитах кролика в первые недели постнатального развития и становится

специфическим маркером гранул этих клеток только спустя определенное время после рождения [Пигаревский, 1982].

На стадиях метамиелоцитов и палочкоядерных клеток образуются гранулы с высоким содержанием желатиназы, после чего образование гранул прекращается, секреторные везикулы образуются путем эндоцитоза [Borregaard et al., 2007]. Секреторные везикулы заслуживают внимания благодаря обширному набору мембраносвязанных белков, включая рецепторы плазматической мембраны. Эти и другие данные свидетельствуют о том, что секреторная везикула является резервуаром белков плазматической мембраны нейтрофилов и других мембранных белков [Shah et al., 2017].

Зрелый НГ содержит сегментированное ядро, цитоплазматические гранулы, запас гликогена в виде большого количества немембранных округлых телец, хорошо развитый цитоскелет, состоящий из микротрубочек и микрофиламентов. Другие клеточные органеллы практически редуцированы: аппарат Гольджи и шероховатый эндоплазматический ретикулум значительно уменьшены, мало свободных рибосом, единичные митохондрии. Все эти морфологические признаки говорят о том, что НГ представляет собой специализированную клетку на конечной стадии морфобиохимической дифференцировки, не способную к клеточному делению [Klebanoff, Clark, 1978].

Таблица 1.5 – Содержимое гранул и секреторных везикул нейтрофилов человека

Азурофильные гранулы	Специфические гранулы	Желатиназные гранулы	Секреторные везикулы
<i>Мембрана</i>			
CD63	CD11b/CD18	CD11b/CD18	Щелочная фосфатаза
CD68	CD15	Цитохром <i>b</i> ₅₅₈	CD10
Презенилин 1	CD66	Диацилглицерол деацетилирующий фермент	CD11b/CD18
Стоматин	CD67	fMLP-R	CD13
V-H+-АТФаза	Цитохром <i>b</i> ₅₅₈	Лейколизин	CD14
	Рецептор к fMLP	VAMP-2	CD16
	Рецептор к фибронектину	V-H+-АТФаза	CD45
	α -субъединица G-белка	SNAP-23, -25	CR1
	Рецептор к ламинину	CD87	Рецептор к C1q
	Лейколизин		Цитохром <i>b</i> ₅₅₈
	Специфичный антиген нейтрофилов NB1		CD55
	Белок 19-кДа		Рецептор к fMLP
	Белок 155-кДа		Лейколизин
	ГТФазы Rap1 и Rap2		VAMP-2
	Рецептор к витронектину		V-H+-АТФаза
	SNAP-23, -25		
	Стоматин		
	Рецептор к тромбоспондину		
	Рецептор к TNF		
	CD87		
	VAMP-2		

Продолжение таблицы 1.5			
Азурофильные гранулы	Специфические гранулы	Желатиназные гранулы	Секреторные везикулы
<i>Матрикс</i>			
Кислая β -глицерофосфатаза	β 2-микроглобулин	Ацетилтрансфераза	Белки плазмы
Кислые мукополисахариды	Коллагеназа	β 2-микроглобулин	
α 1-Антитрипсин	CRISP-3	CRISP-3	
α -Маннозидаза	Желатиназа	Желатиназа	
Азуроцидин	hCAP-18	Лизоцим	
Белок увеличивающий проницаемость мембран	Гистаминаза		
β -Глицеролфосфатаза	Гепараназа		
β -Глюкуронидаза	Лактоферрин		
Катепсины	Лизоцим		
Дефенсины	липокалин 2 (NGAL)		
Эластаза	Активатор плазминогена урокиназного типа		
Лизоцим	Нейраминидаза		
МПО	Транскобаламин-I		
N-ацетил- β -глюкозаминидаза	Стромелизин-1		
Протеиназа- 3	Лейколизин		
Нейраминидаза	Кателицидины		

VAMP – везикуло-ассоциированный мембранный белок (Синаптобrevин)

SNAP – ассоциированный с синаптосомами белок

CRISP – цистеин-богатый секреторный белок

[Fauschou, Borregaard, 2003]

1.5.2 Миграция нейтрофильных гранулоцитов

После созревания нейтрофилы выходят из костного мозга через плотно прилегающие поры синусоидального эндотелия и попадают в кровообращение, [Weiss, 1970]. Нейтрофилы, высвобождаемые из костного мозга, имеют период полувыведения из кровотока приблизительно 6 часов, а период полужизни в тканях несколько дольше. Периоды жизни нейтрофилов могут модулироваться растворимыми сигналами. При воздействии таких стимулов, как фактор некроза опухоли (ФНО α) и лиганд Fas (CD95), нейтрофилы подвергаются апоптозу или запрограммированной гибели клеток [Murray et al., 1997.; Tortorella et al., 1998]. Большое количество нейтрофилов и их короткий период полужизни подразумевают, что должны существовать специальные механизмы удаления нейтрофилов. Показано, что сигнальная система, включающая стромальный фактор 1 (SDF-1) и СХС-рецептор хемокинов 4 (CXCR4), вовлечена в клиренс нейтрофилов. CXCR4, связанный с G-белком рецептор, экспрессируется на низких уровнях в зрелом нейтрофиле. С возрастом нейтрофилы изменяют свой фенотип и активируют CXCR4.

Это изменение поддерживает возвращение нейтрофилов в костный мозг через хемоаттрактант SDF-1 (также известный как CXCL12). Вернувшись в костный мозг, нейтрофилы фагоцитируются стромальными макрофагами [Martin et al., 2003]. Общепринятым является мнение, что стареющие или апоптотические нейтрофилы кровотока также удаляются макрофагами печени и селезеночными макрофагами (то есть ретикулоэндотелиальной системой). Однако стоит отметить, что эти данные были получены на основании радиоактивной маркировки выделенных, а затем снова введенных нейтрофилов [Uchida et al., 1979], но прижизненная визуализация не выявила, что нейтрофилы поглощаются макрофагами в любом из этих органов [Kubes, 2018]. Приблизительно 30000 нейтрофилов мигрируют в ротовую полость каждую минуту в условиях нормы, это составляет только <1% нейтрофилов, производимых каждый день [Landzberg et al., 2015], тем не менее, если это будет иметь место по всему желудочно-кишечному тракту, это наверняка приведет к значительной элиминации нейтрофилов. Недавние работы показали, что нейтрофилы и в свободных от патогенов условиях проникают во многие ткани, в том числе и в кишечник [Casanova-Acebes et al., 2018], что подтверждает результаты более раннего исследования по ишемии-

реперфузии в кишечнике, в котором нейтрофилы обнаруживались в интерстиции кишечника [Kubes et al., 1992].

Чтобы попасть в место проникновения микроорганизмов, нейтрофилы должны пересекать сосудистую стенку. Пересечение происходит в основном в посткапиллярных венах. Здесь стенка сосуда довольно тонкая, а диаметр сосуда достаточно мал, чтобы нейтрофилы могли вступать в контакт со стенкой сосуда, но достаточно велик, чтобы не быть заблокированным нейтрофилами после их контакта с эндотелием [Vorregaard, 2010]. Начальное прикрепление нейтрофилов к эндотелию определяется эндотелиальными клетками, реагирующими на такие стимулы, как ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-17, которые генерируются во время инфекции или воспаления. Такая стимуляция приводит к экспрессии P-селектина, E-селектина, а также членов суперсемейства интегринов (ICAM и VCAM) на внутренней эндотелиальной поверхности сосудов. Селектины связывают PSGL-1 (P-селектин-лиганд 1) и L-селектин, которые экспрессируются конститутивно на кончиках нейтрофильных микроворсинок [Bruehl et al., 1997, Steegmaier et al., 1997, Buscher et al., 2010]. Эти связи образуются и отсоединяются последовательно, обеспечивая эффект роллинга нейтрофилов по поверхности сосуда.

После установления прочной адгезии трансэндотелиальная миграция может осуществляться двумя путями: трансклеточным, посредством которого нейтрофилы проникают в отдельные эндотелиальные клетки, или параклеточным, посредством которого нейтрофилы проходят между эндотелиальными клетками. Ключевыми игроками, участвующими в направлении к параклеточной или трансклеточной миграции, вновь являются основные нейтрофильные β 2-интегрины LFA-1 и Mac-1 и их лиганды ICAM-1 и ICAM-2.

1.5.3 Фагоцитоз и дегрануляция

Нейтрофил является профессиональным фагоцитом, а фагоцитоз одной из его основных функций. После опсонизации микроба и взаимодействия с соответствующими рецепторами, такими как рецепторы Fc γ , лектины C-типа или рецепторы комплемента, инициируется стадия поглощения. Псевдоподии охватывают фагоцитируемый объект, происходит инвагинация мембраны и микроб погружается внутрь фагоцита в

образуемую фагоцитарную вакуоль [Dale et al., 2008]. Это опосредуется сложным путем активации внутриклеточных сигнальных каскадов вместе с перестройками цитоскелета. Во время этого процесса азурофильные и специфические гранулы сливаются с фагосомой и высвобождают в нее свое антимикробное содержимое. В то же время никотинамидадениндинуклеотидфосфат оксидаза (НАДФН-оксидаза) собирается из группы мембраносвязанных флавоцитохромов (цитохрома b_{558} , состоящего из субъединиц $gp91^{phox}$ и $p22^{phox}$) и цитоплазматических компонентов ($p47^{phox}$, $p67^{phox}$, $p40^{phox}$, Rac) [Kruger et al., 2015; Segal AW., 2005]. Активность НАДФН-оксидазы приводит к образованию кислородных радикалов и продуктов их реакции. Эти продукты все вместе известны как активные формы кислорода (АФК). АФК (включая супероксидный радикал – O_2^- , гидроксильный радикал – HO^\bullet , пероксид водорода – H_2O_2) поступают в фагоцитарную вакуоль, где они способствуют уничтожению микробов [Segal AW., 2005]. НАДФН-оксидаза имеет решающее значение для уничтожения микробов, так как отсутствие или нарушение функции этого фермента приводит к хронической гранулематозной болезни (ХГБ), которая характеризуется значительной предрасположенностью к бактериальной и грибковой инфекциям [Buvelot et al., 2017].

Необходимо отметить, что дегрануляция инициируется уже в момент контакта НГ с фагоцитируемым объектом, часть гранул, расположенных вблизи наружной клеточной мембраны разрывается, их мембраны сливаются с клеточной мембраной, а содержимое высвобождается во внеклеточное пространство [Пигаревский и др., 1982]. Но, что характерно, дегрануляция во внеклеточное пространство и в фаголизосому регулируется дифференцированно. Первый тип дегрануляции определяет последовательность мобилизации, в которой в первую очередь в ответ на стимулы дегранулируют более легкие гранулы (секреторные везикулы > желатиновые гранулы > специфические гранулы > азурофильные гранулы). При последнем типе дегрануляции (образование фаголизосом) имеет место преимущественное слияние с фагоцитарной вакуолью азурофильных и специфических гранул [Shah et al., 2017], что позволяет сразу доставлять в фагосому максимально полный набор антибиотических соединений и обеспечивать функционирование НАДФН-оксидазы.

Говоря о регуляции процесса фагоцитоза, следует отметить, что в ходе фагоцитоза усиливается экспрессия 305 генов и снижается – 297, в течение 6 часов

[Kobayashi et al., 2003a]. В соответствии с представлением о нейтрофилах как первой линии защиты эти исследования показали усиление экспрессии различных провоспалительных медиаторов в нейтрофилах вскоре после начала процесса фагоцитоза. Среди таких генов были гены, кодирующие хемокины и цитокины, необходимые для привлечения макрофагов, Т-клеток и нейтрофилов, и для модуляции их воспалительного ответа (моноцитарный хемотаксический белок (MCP-1, также известный как CCL2), макрофагальный ингибиторный белок MIP-1 α (CCL3), MIP-2 α (CXCL2), MIP-2 β (CXCL2), MIP-3 α (CCL20), онкостатин М и ИЛ-1 β [Kobayashi et al., 2003a; Kobayashi et al., 2003b]. Следом за ранним провоспалительным ответом, нейтрофилы инициируют дальнейший транскрипционный ответ, способствующий апоптозу и дальнейшему поглощению и перевариванию макрофагами. На этом этапе усиливается экспрессия генов, кодирующих проапоптотические белки, включая медиаторы и рецепторы внешнего апоптотического пути (ФНО α , TRAIL, TNFR-1 и TRAILR), каспазы 1 и BAX (белка Bcl-2-семейства), а также членов TLR2 пути проведения сигнала (TLR2, киназы-1, ассоциированная с рецептором ИЛ-1 β , каспазы-8, ИЛ-1 β , антагониста рецептора ИЛ-1 β и легкой цепи NF κ B – NF κ B1) [Kobayashi et al., 2003a]. Важно, что фагоцитоз-индуцированный апоптоз отменяется ингибированием белкового синтеза, что определенно указывает на регуляцию апоптоза нейтрофилов на трансляционном уровне [Kobayashi, DeLeo, 2004].

Даже гибель НГ в очагах воспаления можно рассматривать как защитную реакцию макроорганизма. Установлено, например, что инактивация псевдотуберкулезных бактерий осуществляется не столько за счет фагоцитарных реакций, сколько в результате гибели НГ с накоплением в очагах воспаления продуктов распада ядер [Пигаревский, 1981].

1.5.4 Нейтрофильные внеклеточные ловушки

В последние несколько лет интерес к «внеклеточному» функционированию нейтрофилов резко возрос благодаря обнаружению так называемых «нейтрофильных внеклеточных ловушек» – NET (neutrophil extracellular trap) – внеклеточные нити ДНК, связанные с пептидами и белками [Долгушин и др. 2009].

Со времени первого описания феномена NET [Brinkmann et al. 2004.], это считается альтернативой гибели нейтрофилов либо в результате апоптоза, либо в результате пироптоза. Механизмы, лежащие в основе «NETosis» (как назвали этот путь клеточной гибели), были частично определены *in vitro*, как правило, путем анализа нейтрофилов, стимулированных в течение 1-3 часов с помощью форбол-12-мирикат-13-ацетата в бессывороточных условиях или с очень низкими концентрациями сывороточных белков [Fuchs et al. 2007]. NETosis в таких экспериментальных условиях зависит от присутствия основной нейтрофильной сериновой протеазы эластазы [Papaannopoulos et al., 2010], МПО [Metzler et al. 2011] и активной НАДФН-оксидазы [Nakkim et al. 2011]. Следовательно, NETosis не следует ожидать у пациентов с дефицитом МПО, относительно распространенным наследственным заболеванием, или с ХГБ которая является более тяжелым иммунодефицитом, характеризующимся неспособностью нейтрофилов продуцировать активные формы кислорода [Bianchi, et al. 2009]. Учитывая то, что дефицит МПО не приводит к тяжелым клиническим проявлениям, можно предположить, что NETosis, как определено выше, играет незначительную (если таковая имеется) роль в иммунной защите. Аналогичным образом, пациенты с синдромом Папийона-Лефевра, нейтрофилы которых не имеют ни эластазы, ни других сериновых протеаз и, следовательно, не могут поддерживать NETosis [Nauseef, Borregaard, 2014], не имеют повышенной восприимчивости к системным инфекциям и, как правило, страдают только тяжелыми заболеваниями пародонта [Haneke, 1979]. Было показано, что NET захватывают бактерии [McDonald, et al., 2012], грибы [Urban, et al., 2006] и даже вирусы [Jenne et al. 2013] и могут обеспечивать частичную защиту Т-клеток от заражения вирусом иммунодефицита человека [Saitoh et al. 2012]. Есть исследования, которые ставят под сомнение первоначальное наблюдение о том, что сети уничтожают захваченные бактерии [Menegazzi et al., 2012]. Тем не менее, можно предположить, что улавливание жизнеспособных бактерий будет сдерживать микробы и, таким образом, будет предотвращать распространение инфекции.

По некоторым данным NET, по-видимому, способствуют патогенезу некоторых аутоиммунных заболеваний, при которых целевые антигены часто являются составляющими NET, включая ДНК, а также МПО и протеиназу 3, как это наблюдается при системной красной волчанке и гранулематозе Вегенера [Sangaletti et al. 2012].

1.5.5 Нейтрофильные гранулоциты и системные воспалительные заболевания

Во время системных инфекций, приводящих к сепсису, тонко настроенные механизмы, которые регулируют последовательное рекрутирование нейтрофилов и моноцитов, становятся нерегулируемыми [Reddy, Standiford, 2010]. Клинически, сепсис определяется инфекцией, сопровождающейся несколькими из следующих симптомов: лихорадка, увеличение или уменьшение количества лейкоцитов, тахипноэ, отек, гемодинамические изменения и высокие концентрации хемокинов и С-реактивного белка в сыворотке [Козлов, 2008; Van der Poll et al., 2017].

По мере обострения сепсиса развивается септический шок, приводящий к полиорганной недостаточности [Гусев и др., 2007; Черешнев, Гусев, 2012; Van der Poll et al., 2017]. Кроме того, любая задержка иммунного ответа увеличивает смертность, а септический шок имеет самые высокие показатели смертности среди всех болезненных состояний инфекционной природы [Daviaud et al., 2015]). Хотя рекрутирование нейтрофилов является ключевым для защиты хозяина от инфекции, их избыточная мобилизация может привести к повреждению тканей организма.

В моделях эндотоксемии на людях и сепсиса на мышах высокие концентрации цитокинов и хемокинов, обнаруживаемых циркулирующими в плазме крови, нарушают процесс хемотаксиса нейтрофилов, активируя одновременно как нейтрофилы, так и эндотелий. Это также может привести к длительной иммуносупрессивной фазе. Например, действие высоких концентраций хемокинов плазмы на нейтрофилы приводит к пониженной активности хемокиновых рецепторов у пациентов с тяжелой септической патологией [Cummings et al, 1999].

Хотя и у людей, и у мышей наблюдаются сходные симптомы сепсиса, а механизмы, которые были объяснены на мышах, полезны для понимания сепсиса у людей, между экспериментальным и клиническим сепсисом есть заметные различия. Во-первых, концентрации бактерий и бактериальных компонентов в кровообращении, а также их роль в прогрессировании заболевания отличаются у мышей и людей, поскольку грызуны проявляют гораздо более высокую устойчивость к инфекциям по сравнению с людьми [Fink, 2014]. Кроме того, есть мнение, что критический компонент тяжелого сепсиса у людей – полиорганная недостаточность, не может наблюдаться у

грызунов в полном объеме, потому что мыши, которые получают высокие дозы ЛПС, умирают до того, как у них могут развиваться эти осложнения [Liew et al., 2019].

1.5.6 Пластичность нейтрофильных гранулоцитов

Все больше данных свидетельствуют о наличии различных функциональных подгрупп нейтрофилов, которые ответственны за различные роли в защитно-приспособительных реакциях организма во время инфекций, воспалений и рака [Нестерова и др., 2015, 2018; Kamp et al., 2012; Pillay et al., 2010.; Tsuda et al., 2004]. У мышей, инфицированных *Staphylococcus aureus*, устойчивой к метициллину (MRSA), наблюдали три отдельные популяции нейтрофилов [Tsuda et al., 2004]. Каждая из этих популяций имела уникальные спектры продукции цитокинов и хемокинов, а также экспрессию поверхностных TLR и CD49d/CD11b. Как правило, нейтрофилы мышей с умеренным проявлением системной воспалительной реакции (SIRS) имели провоспалительный фенотип (IL-12⁺CCL3⁺), в то время как нейтрофилы мышей с тяжелой формой SIRS были противовоспалительными (IL-10⁺CCL2⁺) [Tsuda et al., 2004]. Эти «провоспалительные» и «противовоспалительные» нейтрофилы могут регулировать направление иммунологического ответа к инфекции путем поляризации макрофагов M1 или M2 соответственно [Sica, Mantovani, 2012]. Подобные фенотипы нейтрофилов наблюдались у мышей с опухолями [Fridlender et al., 2009]. У добровольцев, которым вводили ЛПС, также идентифицировались разные популяции нейтрофилов по сравнению с людьми, не получавшими ЛПС [Kamp et al., 2012; Pillay et al., 2012].

Однако в описанных выше случаях нельзя исключить, что нейтрофилы корректировали свои фенотипы в соответствии с инфекцией или стрессором и не были отдельными линиями. Действительно, нейтрофилы довольно пластичны и способны демонстрировать фенотипические изменения. При хроническом воспалении нейтрофилы обнаруживают различный набор молекул адгезии и хемокиновых рецепторов [Johnston et al., 1999]. Патогены также способны вызывать фенотипические изменения нейтрофилов. Например, при инфицировании мышей *Trypanosoma cruzi* нейтрофилы принимают противовоспалительный фенотип с продукцией IL-10, одновременно ингибируя продукцию интерферона (IFN)- γ и пролиферацию Т-клеток [Tosello Boari et al., 2012.]. При взаимодействии нейтрофилов с инвариантными

натуральными киллерами (iNKT) CD1d-зависимым образом нейтрофильный противовоспалительный фенотип переходил в провоспалительный фенотип [De Santo et al., 2010], что особенно интересно, поскольку клетки iNKT могут распознавать аутоантигены и бактериальные антигены и продуцировать соответственно различные цитокины [Lee et al., 2010; Liew et al., 2017].

1.5.7 Нейтрофильные гранулоциты и адаптивный иммунитет

Нейтрофилы также модулируют важные компоненты адаптивного иммунного ответа и могут регулировать активность В- и Т-клеток [Долгушин, 1989]. Нейтрофилы являются продуцентами активирующего фактора В-клеток (BAFF, также известного как стимулятор лимфоцитов В) и лиганда, индуцирующего пролиферацию (APRIL), которые необходимы для выживания В-клеток и их активации [Scapini et al., 2008]. В селезенке активация нейтрофилов с помощью ЛПС приводит к образованию BAFF, APRIL и IL-21, которые воздействуют на В-клетки маргинальной зоны, ответственные за продукцию антител к Т-независимым антигенам [Puga et al., 2012].

Нейтрофилы могут служить в качестве иммуносупрессоров, ингибируя пролиферацию и активацию Т-клеток, вероятно, благодаря значительному количеству аргиназы 1, присутствующей в нейтрофильных азурофильных гранулах, и продукции активных форм кислорода [Pillay et al., 2012; Liew et al., 2019]. С другой стороны, нейтрофилы могут также функционировать как антигенпрезентирующие клетки. Во время стимуляции интерфероном- γ в нейтрофилах повышается уровень экспрессии белков основного комплекса гистосовместимости II класса вместе с костимулирующими молекулами [Abi Abdallah et al., 2011]. В результате нейтрофилы могут способствовать дифференцировке Th1 и Th17.

Таким образом, нейтрофилы можно рассматривать не только как профессиональные фагоциты, но как клетки, способные выполнять значительный набор специализированных функций [Долгушин и др., 2019]. Они вовлечены как участники и регуляторы многих процессов, таких как острое повреждение и репарация, рак [Treffers et al., 2016], аутоиммунитет и хроническое воспаление [Soehnlein et al., 2017]. Нейтрофилы также способствуют адаптивному иммунитету, облегчая развитие

специфических адаптивных иммунных ответов или направляя последующий адаптивный иммунный ответ.

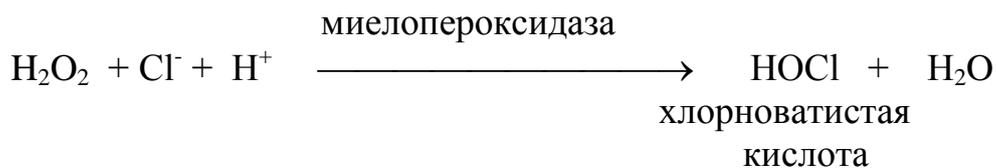
Показано, что активированные нейтрофилы способны продуцировать цитокины, хемокины и другие биологически активные соединения. Конечно, из-за значительной редукции трансляционного аппарата уровень такой продукции очень низкий, однако, если учесть в каком количестве нейтрофилы скапливаются в очагах воспаления, не исключено, что такой синтез может иметь биологическое значение, но главным «оружием» нейтрофилов являются соединения, синтезированные в процессе гранулоцитогенеза в костном мозге. Гранулы НГ содержат широкий спектр биологически активных веществ (дефенсины, кателицидины, протеазы, лактоферрин, миелопероксидаза и др.), которые являются не только антимикробными соединениями, но и проявляют различные иммунорегуляторные свойства. Особый интерес представляют маркер азурофильных гранул – миелопероксидаза, по наличию и активности которой в тканях и биологических жидкостях судят о вовлеченности нейтрофилов в происходящие процессы, и лактоферрин – белок специфических гранул, который является одним из самых многофункциональных белков в организме млекопитающих.

1.6 Миелопероксидаза

Миелопероксидаза (МПО) является одним из важнейших компонентов антимикробной системы НГ. Она синтезируется на промиелоцитарной стадии гранулоцитогенеза и является биохимическим маркером азурофильных гранул. МПО относится к семейству гемпротеиновых оксидоредуктаз, основная функция которых заключается в окислении различных по своей природе соединений пероксидом водорода. Как правило, МПО окисляет субстраты не непосредственно, а путем предварительного окисления кофакторов и является составной частью миелопероксидазной системы. Под миелопероксидазной системой (МПО-системой) принято понимать совокупность следующих взаимодействующих веществ: фермента – МПО, окислителя – пероксида водорода и кофактора (I^- , Cl^- , Br^- , CNS^-). МПО-система подавляет жизнедеятельность бактерий [Klebanoff, 1967], грибов [Lehrer, 1969], вирусов [Belding et al., 1970] и микоплазм [Jacobs et al., 1972].

Наиболее эффективным из изученных кофакторов является йодид [Klebanoff, 1968]. В организме источником йодида и(или) йода для МПО-системы служат тироидные гормоны тироксин и трийодотиронин [Klebanoff, 1967]. Тироидные гормоны могут связываться как с интактными лейкоцитами, так и с микроорганизмами и попадать таким путем в фаголизосому, где они разрушаются с высвобождением неорганического иодида [Klebanoff, Hamon, 1972]. В одном из первых выдвинутых и доказанных механизмов антимикробного действия МПО-системы галогенирования белков микроорганизмов рассматривается в качестве основного результата ее функционирования [Klebanoff, 1967]. Такой механизм антимикробного действия МПО-системы не является единственным

Согласно одной из предложенных схем [Zgliczynski et al., 1971], миелопероксидаза окисляет сначала анион хлора до катиона в составе гипохлоритного иона (OCl^-):



Образовавшаяся хлорноватистая кислота без участия фермента взаимодействует в кислой среде с аминокислотами (аспарагиновой, аланином, серином, лизином) с образованием соответствующих хлораминов, которые окисляют компоненты микроба, усиливая в них первоначальные структурные нарушения, вызванные дефенсинами и кателицидинами [Ашмарин и др., 1972, 1977].

Антибиотическое действие МПО показано не только в условиях *in vitro*, но и в экспериментах *in vivo* на модели почечного кандидоза у мышей, вызванного внутривенным введением бластоспор *Candida albicans* [Wright, Nelson, 1985]. Внутривентральное одноразовое введение МПО человека на следующий день после инфицирования заметно повышало выживаемость мышей. Через 2 месяца в этой группе выживало 80% животных, в то время как в контрольной только 25%. О возможном прямом действии МПО на *Candida albicans* в этом эксперименте и необходимости связывания фермента с клетками микроорганизма говорит тот факт, одновременное с

МПО введение компонентов клеточной стенки гриба (маннанов) снижает микробоцидный эффект миелопероксидазной системы.

Однако стоит отметить, что люди с дефицитом МПО обычно не имеют серьезных проблем со здоровьем, но они могут страдать от серьезных и необычных инфекций, особенно если другие элементы иммунитета скомпрометированы, как это происходит при диабете [Klebanoff et al., 2013].

Кроме прямого антибиотического действия МПО может оказывать влияние на процессы фагоцитоза и воспаления и другим образом. В частности, при инкубации тромбоцитов с МПО-системой происходит выброс серотонина из клеток [Clark, Klebanoff, 1979], что можно рассматривать как возможное провоспалительное действие МПО. С другой стороны, миелопероксидазная система вызывает транзиторное (на 24 часа) снижение функциональной активности естественных киллеров (NK-клеток) [El-Nag, Clark, 1987] в культуре клеток.

Хлорамины, продукты функционирования МПО-системы, способны модулировать генерацию провоспалительных медиаторов макрофагами, ингибируя продукцию ими простагландина E_2 , интерлейкина 6 [Marcinkiewicz et al., 1995]. Гипохлоритный ион также может быть вовлечен в регуляцию продукции провоспалительных соединений. На культуре эпителиальных клеток роговицы (corneal) показано, что гипохлорит окисляет $I\kappa B\alpha$ по метиониновому остатку, блокируя таким образом диссоциацию $I\kappa B\alpha$ и $NF\kappa B$ и освобождение транскрипционного фактора, ответственного за продукцию целого ряда провоспалительных соединений [Mohri et al., 2002]. В данном случае мишенью действия биологически активных продуктов МПО-системы являются внутриклеточные структуры, но они могут также воздействовать на различные рецепторы в составе поверхностных мембранных комплексов. В экспериментах *in vitro*, проводимых на нейтрофильных гранулоцитах, показано, что активные формы кислорода, вырабатываемые нейтрофилами, в том числе при участии МПО, могут служить вторичными мессенджерами трансдукции сигнала ИЛ-1 β , воздействуя на комплекс ИЛ-1 β -рецептор–G-белок–фосфолипаза-(D/C), причем разные формы кислорода разным образом влияют на экспрессию рецепторов ИЛ-1 β , ингибирующей или стимулирующей субъединицы G-белка и активности фосфолипаз D и C. Добавление экзогенной гомологичной МПО в систему снижало активность фосфолипаз [Derevianko et al., 1998]. В то же время существуют исследования,

показывающие стимулирующее действие МПО на ДНК-связывающую активность NFκB на культурах человеческих альвеолярных клеток (A549) и моноцитов (THP1) [Nys et al., 2005].

Пока нет данных, что эти функциональные проявления, показанные в витральных экспериментах, имеют место на уровне целого организма. Ферментативная активность миелопероксидазы в полной мере проявляющаяся в фаголизосоме, во внеклеточных условиях может быть блокирована. При высвобождении МПО из нейтрофилов, фермент быстро связывается с другими молекулами, в частности, в плазме крови с церулоплазмином [Park Y et al., 2000] и с фибронектином [Янковский и др., 1996]. Для комплекса МПО-церулоплазмин показана инактивация ферментативной активности МПО, в других случаях она может сохраняться. На модели экспериментального инфаркта миокарда у мышей, лейкоциты которых не содержат МПО, продемонстрировано, что именно ферментативная активность МПО опосредует образование в поврежденных тканях миокарда цитотоксичных альдегидов, хотя степень некротизации тканей после инфаркта не зависит от наличия МПО [Vasilyev et al., 2005].

Таким образом, в месте воспаления может присутствовать как энзиматически активный фермент, так и неактивный. Биологические свойства неактивной МПО изучены не так хорошо, как МПО-системы. Показано, что инактивированная МПО лучше, чем активный фермент, стимулирует секрецию (индукцию) цитокинов (ФНОα, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8 и ГМ-КСФ) макрофагами и эпителиальными клетками [Lefkowitz et al., 2000]. Также установлено, что ферментативная активность МПО в плазме крови пациентов с сахарным диабетом 2 типа повышена и не коррелирует с концентрацией МПО, измеренной с помощью ИФА, в отличие от здоровых доноров [Горудко и др. 2012].

Предполагается, что МПО может опосредовать свои иммуномодулирующие воздействия через маннозный макрофагальный рецептор (ММР). Показано, что МПО может поглощаться макрофагами через этот рецептор [Shepherd, Hoidal, 1990]. Маннозный рецептор макрофагов является трансмембранным белком 1 типа, N-концевая часть которого локализована внеклеточно, с коротким (45 аминокислотных остатков) цитоплазматическим фрагментом. Внеклеточная часть рецептора, участвующая в детекции остатков терминально локализованных манноз, состоит из восьми доменов, характерных для лектинов С-типа, короткого N-концевого фрагмента,

обогащенного цистеином, и фибронектинового повтора II типа [Stahl, Ezekowitz, 1998]. Этот рецептор характерен для дендритных клеток и некоторых субпопуляций макрофагов. Возможно, что связывание МПО с ММР происходит не через углевод-распознающие домены, а через фибронектиновый повтор, так как показано, что МПО может взаимодействовать с фибронектином плазмы крови с высокой аффинностью [Янковский и др., 1996].

Особо следует заметить, что МПО может оказывать свое действие на иммунокомпетентные клетки уже на уровне костного мозга. Показано, что в процессе синтеза и созревания МПО в промиелоцитах, некоторые энзиматически активные молекулы-предшественники МПО «избегают» упаковки в гранулы и секретируют во внеклеточную среду [Hansson et al., 2006].

Специализированных рецепторов для МПО пока не обнаружено, но не исключено, что благодаря ее способности связываться с другими белками в силу высокой катионности, МПО может осуществлять свои биологические функции в составе белок-белковых комплексов и использовать в такой ситуации «чужие» рецепторы. Сложные комплексы, состоящие одновременно из МПО, ЛФ и церулоплазмينا найдены в биологических жидкостях, полученных от пациентов с воспалительными заболеваниями [Sokolov et al. 2007]. Также были обнаружены комплексы церулоплазмينا с МПО и липопротеином низкой плотности апоВ-100, которые могут играть определенную роль в реакциях развития атеросклероза [Sokolov et al. 2010, 2014a]. Такие предположения имеют смысл в свете увеличивающегося количества исследований, указывающих на достоверное повышение уровня МПО у пациентов с различными сердечно-сосудистыми заболеваниями по сравнению со здоровыми донорами [Kimak et al., 2018].

1.7 Лактоферрин

Само название белка «лактоферрин» говорит о том, что он содержится в молоке и имеет в своем составе железо. Впервые лактоферрин был обнаружен в коровьем молоке в 1939 году [Sorensen, Sorensen, 1939] и обратил на себя внимание благодаря своему красному цвету. К настоящему времени ЛФ выделен из молока человека, коровы [Groves, 1960; Johanson, 1960], морской свинки [Masson, 1970], овцы [Baer et al.,

1979], козы [Oram, Reiter, 1968], свиньи [Roberts, Bournsnel, 1975], кобылы [Jolles et al., 1984], мыши [Kinkade et al., 1976] и собаки [Берлов и др., 2007]. В молоке человека лактоферрин (ЛФ) является одним из основных белков молока неказеиновой природы, его содержание составляет около 2 мг/мл [Masson, Heremans, 1971]. Стоит отметить, что в молоке мыши, морской свинки, коровы, козы присутствует также трансферрин в количестве, эквивалентном ЛФ, а в молоке крысы и кролика основным железосвязывающим белком является трансферрин [Masson, Heremans, 1971.]

К 1966 году ЛФ выявили почти во всех внешних секретах человека: в слезах, слюне, носовых и бронхиальных смывах, желудочно-кишечном соке, желчи, моче, семенной жидкости, слизи шейки матки [Masson et al., 1966].

В 1969 году ЛФ впервые был идентифицирован как один из главных белков, присутствующих в нейтрофильных гранулоцитах (НГ) человека и морской свинки [Masson et al., 1969]. В более поздних работах было установлено, что ЛФ локализован в специфических гранулах и не содержится в азурофильных [Bretz, Baggiolini, 1974].

Молекулярные массы ЛФ из различных источников очень близки и составляют 80–84 кДа. Показано, что ЛФ представляют собой гликопротеины, состоящие из одной полипептидной цепи, третичная структура которых образует две доли (N и C), каждая из них содержит сайт для связывания железа, расположенный между доменами N1 и N2 и C1 и C2 соответственно [Anderson et al., 1989; Baker, Baker, 2005] (рис. 1.7).

При связывании ионов железа (Fe^{3+}) образуется комплекс красного цвета с максимумом поглощения в видимой области при $\lambda=460\text{--}470$ нм. Лактоферрин связывает также ионы других металлов переменной валентности, в частности, его комплекс с ионами меди (Cu^{2+}) имеет максимум поглощения при 430–440 нм (белок желтого цвета) [Masson, 1970], а комплексы ЛФ с ионами хрома, марганца и кобальта окрашены в серо-зеленый, коричневый и желтый цвета соответственно [Ainscough et al., 1979].

Лактоферрин рассматривается в настоящее время в качестве классического полифункционального белка. В течение более чем 40 лет исследований для ЛФ было выявлено множество функциональных свойств (Рис. 1.8).

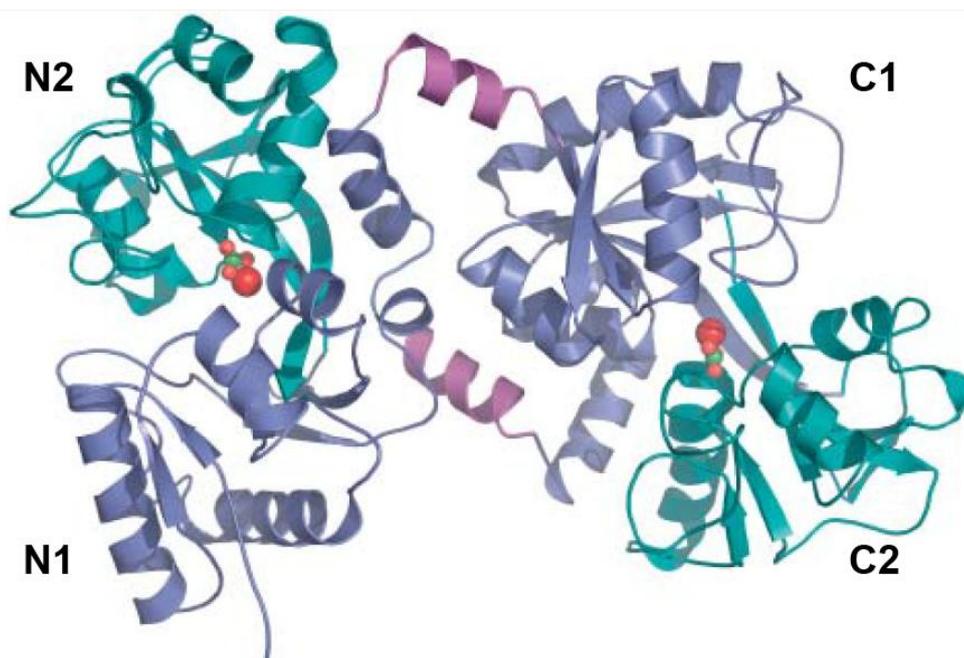


Рисунок 1.7 – Ленточная диаграмма лактоферрина человека.

Связанные ионы Fe^{3+} и CO_3^{2-} (показаны в виде сферических атомов) расположены между двумя доменами, N1 (темно-синий) и N2 (бирюзовый). Аналогично, для С-доли (справа) домены C1 и C2 окрашены в темно-синий и бирюзовый цвета, соответственно, между ними находятся ионы Fe^{3+} и CO_3^{2-} . Две доли соединены трехвитковыми спиралями (пурпурный цвет) [Baker, Baker, 2005].



Рисунок 1.8 – Функциональные свойства лактоферрина [Brock, 2002].

Первоначальные исследования функций ЛФ были обусловлены тем, что он очень напоминал трансферрин, железосвязывающий белок, ключевая роль которого по обеспечению железом развивающихся эритроцитов уже была известна. Таким образом, ранние исследования ЛФ были сосредоточены на изучении функций, аналогичных функциям трансферрина, то есть в качестве белка-переносчика железа в кишечнике, участвующего в поглощении железа, и в качестве регулятора роста микробов в тканях слизистой оболочки кишечника путем истощения среды железом и другими металлами переменной валентности.

Благодаря своей способности связывать железо и медь ЛФ, по-видимому, может играть определенную роль в их метаболизме в организме. В процессе эволюции организмы приобрели специальные белки, которые принимают участие в транспорте и хранении железа и меди. Основным белком, с помощью которого осуществляется хранение железа у большинства организмов, является ферритин. Главным транспортным белком для железа служит трансферрин, а для меди — церулоплазмин. В плазме крови их концентрации составляют около 2,5 мг/мл и 500 мкг/мл соответственно. Лактоферрин содержится в плазме крови в очень малом количестве (около 1 мкг/мл), источником его, по всей вероятности, являются нейтрофилы [Hansen et al., 1975], и он не может конкурировать с трансферрином и церулоплазмином в транспорте металлов.

Однако хелатирующая способность ЛФ несомненно имеет большое значение. Железо представляет собой исключительно важный элемент для развития не только макроорганизма, но и микроорганизмов. С этой точки зрения соединения, способные связывать железо из окружающей среды, должны обладать бактериостатическим свойством. Такое свойство и присуще ЛФ, ненасыщенному железом [Oram, Reiter, 1968].

Лактоферрин оказывает и прямое бактерицидное действие на некоторые микроорганизмы (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mutior*, *S. pneumoniae* ATCC 6303, *Vibrio cholerae* 5698, *Pseudomonas aeruginosa* и др.), и, хотя это действие наблюдается только у ненасыщенного белка, механизм его, видимо, более сложен, чем простое обеднение железом окружающей среды, и зависит от вида бактерий. Необходим прямой контакт ЛФ с микробом, показано, что связывание N-концевой области ЛФ с бактериальной стенкой приводит к нарушению целостности мембран бактерий и низших грибов [Bellamy et al., 1992; Wakabayashi et al., 1996].

Необходимо отметить, что бактерицидный эффект отмечается при довольно высоких концентрациях ЛФ – от 1,2 до 50 мкМ (100 мкг/мл — 4 мг/мл). В молоке и нейтрофильных гранулоцитах некоторых видов млекопитающих содержания ЛФ достаточно для проявления антимикробного действия. Если же рассматривать возможность такого действия ЛФ в НГ в процессе фагоцитоза, то в силу малого свободного объема фаголизосомы концентрация ЛФ в ней может быть даже выше требуемой. Известно также, что в молоке и НГ ЛФ содержится преимущественно в ненасыщенном железом состоянии [Masson, 1970; Van Snick et al., 1974].

Следует отметить, что при фагоцитозе ЛФ действует в кооперации с другими антибиотическими соединениями и имеет место синергическое антибактериальное действие, которое показано, в частности, для совместного действия ЛФ и лизоцима [Singh et al., 2000] и миелопероксидазной системы и ЛФ [Кокряков, Ротова, 1985].

Лактоферрин присутствует на всех слизистых оболочках и эпителии, где благодаря своему противомикробному действию вместе с секретируемым IgA и дефенсинами может влиять на состояние сикриобиома [Embleton et al., 2013]. Кроме этого при активации НГ, которая начинается с первых шагов адгезии к активированному эндотелию, ЛФ поступает в кровь, где его концентрация может повышаться до 200 мкг/л (от примерно 1 мкг/мл в нормальных условиях), особенно в воспаленных тканях [Maacks, Wood, 1989; Суркова и др., 2004; Pawlica-Gosiewska et al., 2017]. Кроме того, микроглиальные клетки, которые действуют как резидентные макрофаги в головном мозге, также синтезируют ЛФ при воспалении [Fillebeen et al., 2001].

Выявленная распространенность ЛФ в организме позволяет говорить о его возможной роли в противоинфекционном иммунитете. Соответственно, подавляющее число исследований, посвященных ЛФ, относятся к изучению его роли как молекулярного фактора врожденного иммунитета.

Показано, что он проявляет антибактериальную, противогрибковую, противовирусную и противопаразитарную, противовоспалительную и иммуномодулирующую активности [Valenti, Antonini, 2005; Puddu et al., 2009, 2011].

Бактерицидные свойства характерны и для коротких N-концевых фрагментов ЛФ, образующихся путем ограниченного протеолиза. В процессе кислотного гидролиза ЛФ крупного рогатого скота формируется пептид, представляющий собой фрагмент N-концевой части молекулы (первые 54 аминокислотных остатка) – лактоферрицин А:

¹APRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRFALEECIRAIAEKKA⁵⁴ [Saito et al., 1991], а при обработке пепсином более короткий участок – лактоферрицин В [Bellamy et al., 1992]: ¹⁷FKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF⁴¹. Образующиеся пептиды обладают гораздо более широким спектром микробоцидного действия при меньшей концентрации [Di Biase et al., 2004]. В ходе протеолиза ЛФ человека образуется пептид – лактоферрицин Н, обладающий свойствами, аналогичными пептиду из ЛФ крупного рогатого скота [Tomita et al., 1994]. Установлено наличие дисульфидной связи в лактоферрицине В [Hwang et al., 1998], а в его функциональном гомологе из ЛФ молока человека – лактоферрицине Н (¹GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPIQCI⁴⁷) — два S-S-мостика [Hunter et al., 2005].

Интересно, что пептид идентичный лактоферрицину В выделили из содержимого желудка человека уже через 10 минут после перорального приема ЛФ крупного рогатого скота [Kuwata et al., 1998]. Аналогичный результат был получен в экспериментах на крысах [Kuwata et al., 2001]. Механизм антимикробного действия лактоферрицинов, по-видимому, сходен с механизмом действия дефенсинов, протегринов, бактеницина и других антимикробных пептидов животного происхождения.

Независимо от способности связывать железо ЛФ ингибирует бактериальную и вирусную адгезию к клеткам макроорганизма через его конкурентное связывание с клетками-хозяевами и/или с компонентами вирусных частиц или мембран микроорганизмов [Sessa et al., 2017; Valenti, Antonini, 2005].

Действие ЛФ против вируса лейкемии Френда (FVC), вызывающего эритролейкемию у мышей, связано, по-видимому, со способностью ЛФ влиять на процесс миелопоэза в костном мозге, так как вирулентность FVC жестко привязана к фазе синтеза ДНК клеточного цикла клеток-мишеней [Lu et al., 1987; Broxmeyer et al., 1987]. В связи с этим следует отметить, что ЛФ проявляет противоопухолевую активность не только против опухолей, вызываемых инфекционным агентом. Он ингибирует рост твердых (сóлидных) опухолей и развитие экспериментальных метастазов у мышей [Bezault et al., 1994]. В основе противоопухолевого действия ЛФ лежат, скорее всего, иммуномодулирующие свойства ЛФ [Hayes et al., 2006]. Другим возможным механизмом положительного действия ЛФ может быть способность лактоферрицина вызывать апоптоз опухолевых клеток через активацию киназ

JNK/SAPK [Sakai et al., 2005]. Противоопухолевое действие ЛФ может быть также опосредовано способностью этого белка активировать естественные киллерные клетки [Tsuda et al., 2002] и повышать цитотоксическую активность макрофагов и нейтрофилов [Gahr et al., 1991].

Если говорить о противовоспалительном действии ЛФ, то здесь могут быть задействованы различные механизмы. Один из возможных механизмов обусловлен способностью ЛФ связывать железо в сайтах воспаления и тем самым снижать интенсивность реакции Габера-Вайса, продуцирующей свободные радикалы, способствуя уменьшению окислительного стресса [Britigan et al., 1994].

Другой из наиболее часто рассматриваемых механизмов осуществляется за счет способности ЛФ связывать липополисахариды (ЛПС) [Appelmek et al., 1994] и влиять тем самым на процесс взаимодействия ЛПС с ЛПС-связывающим белком (ЛСБ) и дальнейшего образования комплекса ЛСБ–ЛПС–CD14, необходимого для индукции синтеза провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками [Elass-Rochard et al., 1998]. Еще одна из возможностей предотвратить образование комплекса ЛСБ–ЛПС–CD14 реализуется через взаимодействие ЛФ с растворимым CD14 [Baveye et al., 2000]. Эти данные позволяют предположить, что одним из моноцитарных рецепторов ЛФ является CD14. Работают ли эти механизмы в условиях целого организма, пока сказать трудно, стоит отметить, что в плазме крови человека значительная часть ЛФ уже находится в комплексе с церулоплазмином [Sokolov et al., 2014b].

Было выявлено, что предварительное введение ЛФ снижает ЛПС-стимулированную продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО- α и ИЛ-6) в крови у экспериментальных животных [Zagulski et al., 1989]. Предложить однозначный механизм такого антиэндотоксического действия ЛФ сложно, особенно если принять во внимание сроки введения ЛФ по отношению к инъекции ЛПС. Показана эффективность только предварительного введения ЛФ за 24 часа до ЛПС, ни более раннее (48 часов), ни более позднее (12 часов) введение не влияет на летальный исход. В такой ситуации трудно считать прямое воздействие ЛФ на связывание ЛПС с моноцитами основным фактором предотвращения септического шока, особенно если учесть фармакокинетику внутривенно введенного ЛФ. Обмен ЛФ, меченного ^{125}I , был изучен у здоровых добровольцев [Bennett, Kokosinski, 1979]. После внутривенного введения он быстро покидает плазму (причем 99 % радиоизотопной метки выделяется с мочой в течение

первых 24 часов), захватывается печенью и селезенкой, где происходит его катаболизм. При внутривенном введении меченого человеческого ЛФ мыши 75 % белка поглощается печенью в течение первых 15 минут [Retegui et al., 1984].

В то же время было установлено, что ЛФ может активировать мышинные макрофаги через TLR4-зависимые и TLR4-независимые сигнальные пути [Curran et al., 2006]. Эта активация индуцирует экспрессию CD40 и секрецию ИЛ-6. Другое исследование *in vitro* продемонстрировало, что ЛФ индуцирует секрецию ИЛ-6 моноцитами через CD14 и TLR2, но не TLR4 [Puddu et al., 2011]. При этом в экспериментах *in vitro* было показано, что ЛФ подавляет секрецию ИЛ-6 в моноцитах посредством механизма, включающего эндоцитоз ЛФ, транслокацию его в ядро и ингибирование активации транскрипционного фактора NF-κB [Håversen et al., 2002].

С противовоспалительной активностью ЛФ связывают также и его положительное действие на регенерацию костной ткани [Yoshimaki et al., 2013].

Существует немало указаний на то, что ЛФ проявляет иммуномодулирующую активность. Если говорить о влиянии ЛФ на функционирование лимфоцитов, то можно отметить, что взаимодействие ЛФ с Т-клетками (на примере клеточной линии человеческой лимфобластомы) вызывает активизацию MAPK (митоген-активированной протеинкиназы) [Duthille et al., 1998], но нельзя однозначно утверждать, что ЛФ оказывает стимулирующее действие на пролиферацию лейкоцитов. В одной из работ показано, что ЛФ стимулирует конкавалин-А-индуцированную пролиферацию мышинных спленоцитов [Mikkelsen et al., 2005], но существуют данные, подтверждающие ингибирующее влияние ЛФ на пролиферативную активность лимфоцитов [Brock, 1995].

Кроме модулирующего действия ЛФ на пролиферацию лимфоцитов описано влияние ЛФ на созревание Т- и В-лимфоцитов в экспериментах *in vitro* и поддержание баланса между Th1 и Th2 в пользу Th2 [Zimecki et al., 1995, 1996]. В то же время, у мышей, трансгенных по человеческому ЛФ, при инфицировании их стафилококком наблюдалась Th1-поляризация иммунного ответа, стимуляция синтеза спленоцитами ФНОα и интерферона-γ и снижение продукции ИЛ-5 и ИЛ-10 [Guillen et al., 2002]. Аналогичный результат был получен при сочетанной вакцинации мышей ЛФ и БЦЖ. Показано, что ЛФ в этих условиях может выступать в качестве адъюванта, увеличивать пролиферативный ответ спленоцитов на введение прогретой вакцины БЦЖ и

стимулировать продукцию ИЛ-12(p40) с увеличением отношения ИЛ-12/ИЛ-10 [Hwang et al., 2005].

Можно отметить возможный вклад ЛФ в повышение устойчивости организма к гипоксии: при превентивном внутрибрюшинном введении этого белка мышам время жизни животных увеличивалась на 40% в условиях экспериментальной модели острой гипоксии с гиперкапнией [Zakharova et al., 2012]. Обнаружено, что введение апо-ЛФ вызывает синтез эритропоэтина в тканях экспериментальных животных, индуцируя транслокацию транскрипционного фактора Nrf2 в ядро, и оказывает нейропротективное действие в условиях экспериментальной ишемии мозга [Zakharova et al., 2018].

Важным этапом в исследованиях биологических свойств ЛФ стало установление факта, что ЛФ может влиять на процесс транскрипции генов непосредственно как транскрипционный фактор, и определение последовательности нуклеотидов специфического сайта связывания ЛФ и ДНК — 5'-GGCACTTGC-3' [He, Furmanski, 1995]. До этого было доказано, что ЛФ после связывания с мембраной эукариотической клетки проходит в цитоплазму, а затем и в ядро [Garre et al., 1992].

Необходимо отметить, что нуклеотидная последовательность сайта связывания ЛФ с ДНК присутствует в той части энхансера (промотора) гена ИЛ-1 β , которая важна для максимальной ЛПС-индуцированной активации гена этого цитокина. Не исключено, что ингибирующее действие ЛФ на ЛПС-индуцированный синтез цитокинов вызвано конкурентным связыванием ЛФ с этими участками ДНК. В то же время экспрессию гена ИЛ-1, вызванную форбол-12-миристат-13-ацетатом, ЛФ не только не уменьшает, а, напротив, резко усиливает, сам по себе ЛФ (без дополнительной индукции) также способен вызывать экспрессию гена ИЛ-1 [Son et al., 2002].

Как уже подчеркивалось, ЛФ – многофункциональный белок, а его функции модулятора в иммунитете означают, что он может воздействовать на многочисленные молекулярные и клеточные мишени и, следовательно, реализовать свои эффекты различными путями. Кроме того, предполагается, что ЛФ может оказывать противоположное действие на одну и ту же клеточную мишень.

Хотя было обнаружено несколько рецепторов ЛФ [Suzuki et al., 2005], до сих пор нет четких доказательств о существовании моноспецифического рецептора ЛФ того типа, который известен, например, для большинства цитокинов или для трансферрина. Кишечный рецептор лактоферрина, также известный как интелектин, является лектином

[Suzuki et al., 2005]; рецептор на Т-лимфоцитах представляет собой нуклеолин – белок, участвующий в переносе белков в ядро [Legrand et al., 2004]; третий тип рецептора гомологичен рецептору, связанному с липопротеином [Meilinger et al., 1995]. Помимо взаимодействия с этими квазиспецифическими рецепторами, ЛФ может связываться с широким диапазоном клеток через в значительной степени электростатическое взаимодействие из-за его высокого рI. Возможно, что простое связывание ЛФ с поверхностью клетки само по себе может модулировать биологические эффекты. Многие из них требуют взаимодействия лиганд–рецептор или клетка–клетка, а присутствие ЛФ на поверхности клетки может либо усилить, либо ингибировать такие взаимодействия, что приводит к модуляции биологической активности.

Фактически в организме баланс между положительным и отрицательным контролем ЛФ, вероятно, зависит от локальной концентрации ЛФ в тканях, от того, является ли он свободным или находится в комплексе с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, такими как ЛПС, и клеточного микроокружения. Все эти параметры пространственно и временно организованы, что делает фактические механизмы действия сложными для расшифровки. Это может объяснить, почему в литературе представлено множество результатов, которые указывают на кажущиеся противоречивыми эффекты ЛФ на иммунную систему, тогда как они, вероятно, не противоречат, а дополняют друг друга. [Legrand, 2012].

Стоит отметить, что, несмотря на широкую многофункциональность ЛФ и системный характер его действия, проводилось очень мало исследований по изучению влияния ЛФ на гормональный статус организма или возможностей модулирования его активности гормонами, не считая влияния половых гормонов на синтез ЛФ, в том числе и на стресс-индуцированные изменения гормонального и иммунного статуса, а также поведенческие реакции. Возможно, именно в этом направлении – исследовании роли ЛФ в нейроэндокриноиммунных взаимодействиях – следует искать те механизмы, которые помогут соединить противоречивые факты в целостную картину.

Среди наиболее существенных работ такого рода можно отметить исследования, демонстрирующие, что эффекты действия ЛФ, в частности по влиянию на миелопоэз, различаются для нормальных и адреналэктомированных животных [Zimecki et al., 2009]. Показано, что ЛФ может защищать дофаминовые нейроны от дегенерации [Rousseau et al., 2013].

Установлено, что ЛФ отменяет индуцированное иммобилизационным стрессом снижение антителообразующих клеток в селезенке крыс и нормализует характер реакции гиперчувствительности замедленного типа [Zimecki et al., 2005]. Кроме этого, внутрибрюшинное введение ЛФ изменяет поведенческие реакции у крыс в тесте «замирания», вызванного страхом [Kamemori et al., 2004], а пероральное введение ЛФ при постнатальном развитии у крыс улучшает их когнитивные способности при выполнении задач в условиях стресса [Shumake et al., 2014].

Показано, что включение в диету лактоферрина может уменьшать депрессивно-подобные симптомы у мышей, вызванные повторным плавательным стрессом [Takeuchi et al., 2017], а пероральный прием лактоферрина может смягчать последствия психологического стресса у людей, в частности влиять на изменения сердечного ритма [Shinjo et al., 2018]. Также добавление ЛФ в диету с высоким содержанием жира способствовало снижению уровня лептина и кортикостерона в крови экспериментальных животных и повышало экспрессию группы генов гипоталамуса, ответственных за функционирование гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [McManus et al., 2015].

Таким образом, можно говорить о том, что ЛФ является не только эндогенным антимикробным и хелатирующим соединением. Кроме противоинфекционной защиты ЛФ вовлечен в более широкий круг защитных механизмов.

* * *

Все эти данные в совокупности определяют необходимость всестороннего и углубленного изучения структурных и функциональных свойств антимикробных веществ нейтрофилов – пептидов и белков – и их роли в качестве эффекторных и регуляторных молекул, вовлеченных в реализацию и регуляцию защитных функций организма

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1 Экспериментальные животные

Работа проведена на самцах крыс линии Wistar весом 180-200 грамм, полученных из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург). Крысы содержались в пластиковых клетках по 6-10 животных при постоянной температуре ($21 \pm 2^\circ\text{C}$), 12-и часовом световом дне и имели неограниченный доступ к воде и пище. Содержание и работу с животными, а также их эвтаназию, осуществляли в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных» от 12.08.1977 [<https://www.msu.ru/bioetika/doc/prikaz-sssr1977.doc>] и Европейской Конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях [<https://www.coe.int/ru/web/conventions/full-list/-/conventions/rms/090000168007a67b>].

2.2 Выделение и очистка антимикробных пептидов и белков

В работе использовали антимикробные пептиды и белки, выделенные по ранее применявшимся методикам из лейкоцитов свиньи – профенин-1 [Harwig et al., 1995], протегрин-1 [Kokryakov et al., 1993], PR39 [Shi et al., 1994], человека – дефенсин HNP-1 [Ganz et al., 1985], лактоферрин [Кокряков и др. 1988], МПО [Кокряков и др. 1982], крысы – дефенсины RatNP-1 – RatNP-4 [Eisenhauer et al., 1989].

Выделение пептидов из лейкоцитов обезьян макак-резуса (*Macaca mulatta*) и гамадрила (*Papio hamadryas*), целомоцитов пескожила (*Arenicola marina*) проводили по схеме, традиционно применяемой для выделения АМП, в том числе и из лейкоцитов человека, крысы и свиньи, включающей экстракцию пептидов в кислой среде, их разделение методами ультрафильтрации и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии [Kokryakov et al., 1993; Harwig et al., 1993].

Для получения лейкоцитов из цельной крови проводили лизис эритроцитов четырехкратным объемом 0,84% раствора хлорида аммония (экспозиция составляла 15 мин), кровь центрифугировали при 400 g в течение 5 минут. Осадок, представляющий

лейкоцитарную массу, гомогенизировали в 10% уксусной кислоте. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 45 мин. Пептиды из полученного экстракта выделяли по представленной схеме.

Схема выделения и очистки антимикробных пептидов из лейкоцитов и целоцитов



Экстракцию АМП из клеток костного мозга макак-резуса проводили с помощью TRI реагента и 5н уксусной кислоты. К аликвотам свежего костного мозга (по 0.5 мл каждая) было добавлено по 3,75 мл TRI реагента (применяемого для выделения нуклеиновых кислот) и 0,35 мл 5н уксусной кислоты, содержимое пробирок было быстро перемешано и заморожено. Перед процедурой получения нуклеиновых кислот и пептидов смесь размораживали и белковую фракцию осаждали добавлением изопропанола к фенол-этанольному супернатанту в отношении 2:1, центрифугировали при 12000 г в течение 10 минут и трижды промывали осадок 95% этанолом с 0,3 М гуанидин хлоридом. В конце осадок промывали 100% этанолом и высушивали на воздухе.

2.2.1 Выделение лактоферрина и миелопероксидазы из лейкоцитов человека

Выделение МПО из лейкоцитов человека осуществляли по модифицированному методу Р. Дессера [Desser et al., 1972], который позволяет получить из лейкоцитов также и ЛФ [Кокряков и др. 1988]. Экстракцию белков из лейкоцитов осуществляли гомогенизированием клеток в 0,3% растворе бромистого цетилтриметиламмония (ЦТАБ) в 0,02 М Na-ацетатном буфере pH 4,5. Полученный ЦТАБ-экстракт наносили на колонку КМ-целлюлозы CM-32 ("Whatman", Англия), уравновешенную 0,02 М Na-ацетатным буфером pH 4,5. Фракцию, обогащенную ЛФ, элюировали буфером с 0,2 М NaCl, концентрировали и проводили гель-фильтрацию на колонке сефадекса G-100 ("Pharmacia", Швеция) для получения чистого ЛФ. Белки, оставшиеся на колонке КМ-целлюлозы элюировали градиентом концентрации NaCl от 0,2 М до 1,2 М. Фракции, содержащие пероксидазную активность, объединяли, диализовали против 0,2 М раствора NaCl в 0,05 М трис-HCl буфере pH 8,7, наносили на колонку колонке КМ-целлюлозы CM-32 забуференной этим же раствором. Элюцию проводили раствором NaCl с линейно возрастающей концентрацией от 0,2 М до 0,6 М в 0,05 М трис-HCl буфере pH 8,7. Окончательную очистку МПО осуществляли гель-фильтрацией на колонке сефадекса G-200. Показатель чистоты МПО $RZ=A_{430}/A_{280}$ составил 0,75-0,8, что говорит о высокой степени очистки.

2.2.2 Синтез θ -дефенсинов RTD-1, RTD-2 и RTD-3

Синтез осуществлен с помощью синтезатора ABI 431 A в Калифорнийской университете Лос-Анджелеса (США). Синтезированные пептиды были восстановлены добавлением избытка дитиотреитола в атмосфере азота при 50°C в 6 М гуанидин-НСl, 0,2 М трис-НСl и 0,2 мМ ЭДТА (рН 8,2). После добавления уксусной кислоты восстановленные пептиды хранились в атмосфере азота до очистки методом ОФ-ВЭЖХ. Последующее образование дисульфидных мостиков проводили в растворе аммиака (рН 7,4). Циклизацию окисленных пептидов осуществляли, инкубируя их в смеси этилендиаминкарбодиимида и безводного N-гидроксibenзотриазола (3:1). Конечным этапом очистки являлась ОФ-ВЭЖХ.

2.3 Удаление примеси эндотоксина (липополисахарида)

Примеси бактериального липополисахарида (ЛПС) из проб белков и пептидов удаляли путем инкубации с гелем полимиксин В-Агарозы (Sigma, USA).

К промытому водой или буферным раствором гелю (0,15 мл) добавляли 0,3 мл раствора белка или пептида, которые было необходимо очистить, и инкубировали 24 часа при постоянном перемешивании при 4°C.

2.4 Определение примеси эндотоксина в пробах и оценка ЛПС-связывающей активности пептидов

Содержание примесей эндотоксина в исследуемых пробах оценивали с помощью количественного хромогенного Лимулюс теста (LAL-теста) (QCL-1000 Limulus amoebocyte lysate kit, «Lonza Walkersville», США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

ЛПС-связывающую активность пептидов также определяли с помощью набора количественного хромогенного LAL-теста (QCL-1000 Limulus amoebocyte lysate kit, «Lonza Walkersville», США) согласно протоколу, прилагаемому к набору. Делали последовательные разведения тестируемых пептидов в воде, свободной от пирогенов, инкубировали с ЛПС в течение 1 часа при 37°C, определяли содержание свободного

ЛПС в пробах и вычисляли при какой концентрации пептидов происходит связывание 50% ЛПС.

2.5 Электрофоретические методы

2.5.1 Электрофорез в полиакриламидном геле в кислой буферной системе в присутствии мочевины

Спектр фракций катионных полипептидов в препаратах оценивали методом электрофореза в кислой буферной системе в присутствии мочевины (Panyim, Chalkley, 1969) в пластинах полиакриламидного геля (ПААГ) на приборе Hoefer (США). Метод позволяет разделять белки не только по молекулярной массе, но и по заряду.

Раствор для геля содержал 12,5% акриламида (Sigma, США), 0,35% N,N-метилен-бис-акриламида (Sigma, США), 0,025% N,N,N,N-тетраметилэтилендиамина (Sigma, США) и 0,025% персульфата аммония (Sigma, США) в 1,3 М уксусной кислоте (Sigma, США) с 3 М мочевиной (Sigma, США). Время полимеризации составляло около 1 часа.

Электродным буфером в использованном нами варианте электрофореза являлся 0,9 М раствор уксусной кислоты, (рН 2,2). Предварительный электрофорез проводили в течение 1 часа, а электрофорез – 1,5 часа при напряжении 20 вольт на 1 см длины пластины геля сечением 75 x 0,75 мм. На дорожку вносили 5 мкг белка в 10 мкл буфера, содержащего 3М уксусную кислоту и 3М мочевины. За ходом электрофореза следили по движению красителя Метиленовый зеленый, который вносили на дорожку одновременно с препаратом белка. Гели после электрофореза окрашивали в течение 15 минут в растворе красителя Кумасси G-250 (метанол – 25%, уксусная кислота – 7,0%, Кумасси G-250 – 0,1%). Не связавшийся краситель отмывали последовательной сменой 5% раствора уксусной кислоты.

2.5.2 Диск-электрофорез в полиакриламидном геле присутствии додецилсульфата натрия

Оценку полученных препаратов и приблизительное определение молекулярной массы проводили также с помощью диск-электрофореза в присутствии додецилсульфата

натрия (далее ДСН) (Schagger, von Jagow, 1987). Электрофорез проводили в том же приборе. Использовали следующие растворы:

- Раствор для приготовления разделяющего геля: 10% акриламида, 0,33% N,N -метилен-бис-акриламида, 0,1% ДСН (Sigma, США), 0,025% N,N,N,N -тетраметилэтилендиамина и 0,025% персульфата аммония в 0,75 М трис-НСl буфере, рН 8,8 и 4 г глицерина (Sigma, США). Время полимеризации геля составляло около 90 мин.

- Раствор для приготовления концентрирующего геля: 3% акриламида, 0,1% N,N-метилен-бис-акриламида, 0,1% ДСН, 0,25% N,N,N,N -тетраметилэтилендиамина и 0,035% персульфата аммония в 0,25 М трис-НСl буфере рН 6,8. Время полимеризации геля составляло около 20 мин.

Электрофорез проводили в пластинах при толщине геля 0,75 мм, высоте разделяющего геля 70 мм, концентрирующего – 8 мм. Катодным буфером служил 0,24 М глицин-0,025 М трис буфер рН 8,3 с 0,1% ДСН, а анодным – 0,2 М трис-НСl рН=8,9. Напряженность электрического поля при электрофорезе составляла 10 В/см. В каждый карман пластины вносили 5 мкг белка в растворе, содержащем 2% ДСН, 5% β-меркаптоэтанола и 0,001% бромфенолового синего в 0,075 М трис-НСl буфере рН 6,8. Перед электрофорезом белковые пробы прогревали в течение 5 минут на кипящей водяной бане. За ходом электрофореза следили по движению красителя бромфеноловый синий. Гели после электрофореза окрашивали в растворе красителя Кумасси G-250.

2.6 Определение дисульфидных связей

Наличие дисульфидных связей в катионных белках определяли, окисляя их надмуравьиной кислотой [Marchini D., et al 1993]. При окислительном расщеплении S-S групп в белках остатки цистеина и цистина с выходом более 90 % превращаются в цистеиновую кислоту. Надмуравьиновую кислоту готовили путем добавления 50 мкл 30 % раствора пероксида водорода к 450 мкл муравьиной кислоты. Полученный раствор оставляли стоять в закрытом сосуде при комнатной температуре в течение 1 часа. К этому времени содержание надмуравьиной кислоты в растворе достигало максимального значения. Предварительно высушивали две одинаковые пробы, содержащие по 3 мкг исследуемого пептида. В одну из двух проб добавляли 20 мкл надмуравьиной кислоты и ставили на ледяную баню на два часа, после чего пробу

высушивали, добавляли 200 мкл охлажденной воды и снова высушивали. О возможном наличии дисульфидных связей свидетельствовало изменение электрофоретической подвижности пептидов, обработанных надмуравьиной кислотой, по сравнению с контрольными пробами при проведении аналитического электрофореза в кислой буферной системе, как было описано выше, помещая обработанные и контрольные пробы на соседние дорожки.

2.7 Определение молекулярных масс пептидов

Молекулярные массы пептидов определяли методом масс-спектрометрии на установках: 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. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (г. Москва).

2.8 Определение аминокислотных последовательностей пептидов

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. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, α -дефенсинов павиана 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. В основе методики автоматического определения аминокислотной последовательности пептидов и белков по методу Эдмана лежит метод химической деградации полипептидной цепи, позволяющей последовательно отщеплять N-концевые аминокислотные остатки в виде фенилтиогидантоинов и идентифицировать отщепленные производные аминокислот методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Определение аминокислотной последовательности θ -дефенсинов PhTD-1 и PhTD-3 из лейкоцитов павиана было осуществлено методом масс-спектрометрии фрагментов, полученных энзиматическим гидролизом с помощью тандемного масс-спектрометра MALDI-TOF/TOF MS (4700 Proteomics Analyzer, Applied Biosystems) в ходе совместной работы с лабораторией профессора Р. Хоффманна института Биоаналитической химии Лейпцигского университета (Германия).

2.9 Определение структуры генов, кодирующих ареницины и θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3

2.9.1 Определение структуры генов, кодирующих ареницины

Анализ нуклеотидной последовательности ареницинов проводили на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) в институте Биоорганической химии им. академиков 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.

RACE-PCR представляет собой метод быстрой амплификации концевых последовательностей кДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод является быстрой и менее трудоемкой альтернативой скринингу кДНК-библиотек. SMART RACE обладает рядом преимуществ по сравнению с другими методиками, а именно: более высокий выход полноразмерных 5'-последовательностей кДНК, отсутствие необходимости синтеза второй цепи кДНК и лигирования адаптора.

Для амплификации использовалась TaqAdv II-полимераза, отличающаяся повышенной процессивностью, чувствительностью и точностью амплификации. Структура ген-специфических праймеров для амплификации была выбрана, исходя из известной аминокислотной последовательности каждого пептида. При выборе олигонуклеотидной последовательности учитывалась частота использования кодонов у *Arenicola marina* и филогенетически близких организмов. Электрофорез продуктов ПЦР, полученных с разными ген-специфическими праймерами, показал, что

преимущественно амплифицировался фрагмент размером около 600 н.п. Фрагмент элюировали из геля и использовали в лигазной реакции с плазмидным вектором для клонирования продуктов ПЦР. Трансформация клеток *Escherichia coli* с последующим скринингом на среде с карбенициллином и IPTG/X-Gal позволила получить ряд клонов, содержащих плазмиду со вставкой. Из них 6 были отобраны для выделения плазмидной ДНК и секвенирования.

В результате секвенирования по методу Сэнгера стала известна последовательность 3'-конца кДНК, на основании структуры которой были синтезированы праймеры для амплификации 5'-концевой области. Амплификация 5'-концевой области представляет собой более трудную задачу, поскольку обратная транскриптаза часто обрывает синтез, не доходя до конца матрицы, поэтому в реакции образуется смесь полноразмерных и укороченных цепей кДНК. Использование второго праймера, который играет роль продолжения РНК-матрицы, позволило получить полноразмерную кДНК. На следующем этапе специфически амплифицировались фрагменты только полноразмерных кДНК. Дальнейшая работа по клонированию и определению 5'-концевой последовательности проводилась по той же схеме, что и для 3'-концевой области.

2.9.2 Определение структуры генов, кодирующих θ -дефенсины RTD-2 и RTD-3

Определение нуклеотидной последовательности θ -дефенсинов RTD-2 и RTD-3 также было осуществлено методом RACE-анализа с использованием тотальной РНК, выделенной из костного мозга обезьяны макак-резус в Калифорнийском университете Лос-Анджелеса, США. Специфические праймеры были сконструированы на основе кДНК человеческих α -дефенсинов.

2.10 Оценка антимикробной активности выделенных пептидов

Антимикробная активность (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; дрожеподобный 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.

Микроорганизмы предварительно культивировали в Триптическом гидролизате сои (TSB) (Sigma, США) при 37°C. Тестовый агар, содержащий микроорганизм, готовили следующим образом:

Из ночной культуры микроорганизма отбирали 500 мкл. Добавляли 50 мл свежего TSB и инкубировали при 37°C 2,5 часа микроорганизмы при этом находились на стадии логарифмической фазы роста. *C. albicans* культивировали в течение 18,5 - 20,5 часов в среде, содержащей 3% водный раствор SBA (Sigma, США), при 37°C без пересаживания в свежую питательную среду.

50 мл культуры центрифугировали при 2000 об/мин в течении 10 мин, осадок дважды промывали в 10 mM Na-фосфатном буфере (pH=7,4), затем ресуспендировали в нем же. Измеряли оптическую плотность суспензии микроорганизма при длине волны 620 нм для бактериальных культур, для определения содержания клеток микроорганизма. Количество клеток *Candida albicans* подсчитывали в камере Горяева.

Для приготовления 10 мл тестового агара культуру, содержащую $4 \cdot 10^6$ клеток, помещали в стерильную пробирку, добавляли 10 мл стерильного 1% раствора агарозы в 9 mM Na-фосфатном буфере (pH=7,4) с температурой 43°C. Содержимое пробирки перемешивали встряхиванием на шейкере и выливали 7 мл в стерильную пластиковую чашку Петри диаметром 120 мм и давали застыть в стерильных условиях при 37°C.

В случае, когда оценивали антимикробную активность полипептидов, содержащихся в растворе, в агаре аппликатором делали отверстия диаметром 2 мм. В лунки вносили анализируемые образцы.

При определении антимикробной активности после проведения электрофореза фракций полипептидов в кислой буферной системе в присутствии мочевины гель промывали в 20 мл 10 mM Na-фосфатного буфера (pH=7,4) два раза по 15 минут на шейкере. Пластинку геля помещали на поверхность агара, содержащего микроорганизм. Инкубировали 3 часа при 37°C. В процессе инкубирования пептиды диффундировали из лунок или из полиакриламидного геля в агарозу.

Для обнаружения очагов гибели микроорганизмов на тестовый агар наносили раствор 1% агарозы со свежим TSB или содержащий 6 % SBA, если оценивали антибиотическое действие в отношении *Candida albicans*, и инкубировали 24 часа при 37°C. С целью количественной оценки антибиотического действия пептидов измеряли диаметр зоны лизиса вокруг лунок, принимая за 1 единицу 0,1 мм и вычитая из измеренного значения 20 единиц, соответствующих диаметру лунки

2.11 Исследование эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов

2.11.1 Модель для испытания эндотоксин-нейтрализующего действия антимикробных пептидов *in vitro*

Исследования проводили на клетках мононуклеарного ряда (моноцитах), выделенных из крови человека. К свежей крови добавляли 3 объема питательной среды RPMI-1640, наслаивали на среду для разделения клеток крови LYMPHOSEP (плотность=1,077 г/л), центрифугировали в течение 30 мин при 500 g, t=18°C. В результате эритроциты и гранулоциты оседали на дно, а обогащенная фракция лимфоцитов и моноцитов оставалась на границе раздела двух фаз: среды и смеси LYMPHOSEP. Мононуклеарные клетки собирали, отмывали от среды разделения, ресуспендировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% инактивированной фетальной сыворотки из расчета $1 \cdot 10^6$ клеток/мл, вносили по 0,2 мл в лунки пластикового планшета (фирма Nunc) и инкубировали 2 часа при 37°C в CO₂-инкубаторе (Flow laboratories, UK). В течение этого времени моноциты распластывались по пластиковой поверхности, а лимфоциты, как не прилипающие клетки, оставались в супернатанте и удалялись аспирацией. В лунки добавляли свежую среду RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки, препараты ЛПС (конечная концентрация 10 нг/мл) и антимикробных пептидов – дефенсин человека HNP-1, профенин-1, PR-39 (конечная концентрация 10 мкг/мл) и инкубировали еще 2 или 24 часа. После инкубации супернатант удаляли, в лунки добавляли по 0,1 мл раствора RNeasy и хранили при -20°C до использования. Эндотоксин-нейтрализующее действие АМП оценивали по

изменению ЛПС-индуцированной экспрессии гена провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в моноцитах.

2.11.2 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 физиологический раствор. Антимикробные пептиды и ЛПС вводили из расчета 100 мкг/кг веса и 25 мкг/кг (или 500 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 с использованием среды для разделения клеток крови Lymphosep (плотность=1,077 г/л). Выделенные клетки хранили в консервирующей среде RNeasy ("Ambion") при -20°C. Эндотоксин-нейтрализующее действие АМП оценивали по изменению ЛПС-индуцированной экспрессии гена провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в мононуклеарных лейкоцитах

2.12 Экспериментальные модели стресса

2.12.1 Электроболевого стресс

В качестве одной из моделей экспериментального стресса использовалось электроболевое раздражение и введение ЛПС. Крыс иммобилизовали в пластмассовых цилиндрических контейнерах, соответствующих размерам крысы, и к электродам, подсоединенным к обоим голеностопным суставам, в течение часа каждые 8-10 секунд подавали импульсы тока (10 мкА). Через 10 минут после воздействия крысам вводили ЛПС (25 мкг/кг веса) и/или дефенсин человека HNP-1 (100 мкг/кг веса) и еще через 2 часа производили забор крови и выделяли из нее фракцию мононуклеарных лейкоцитов. Из этих клеток выделяли тотальную РНК и методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции оценивали экспрессию генов цитокинов. Так как

иммобилизация представляет собой самостоятельное сильное стрессирующее воздействие, крысы проходили предварительную адаптацию к условиям эксперимента – в течение 6 дней на 1 час их сажали в контейнеры, лишаящие возможности двигаться, но электроболевому воздействию не подвергали.

2.12.2 Плавательный стресс

Также в качестве модели стресса использовали комбинированный эмоционально-физический стресс – принудительное плавание в холодной воде (2°- 4° С) в течение 2-х минут. Препараты RatNP-1, RatNP-3 и ЛФ разводили в воде для инъекций, удаляли примеси ЛПС инкубированием с полимиксин-В-агарозой и вводили животным внутрибрюшинно непосредственно перед стрессирующим воздействием из расчета 100 мкг/кг и 200 мкг/кг веса животного, соответственно, в объеме 500 мкл. Забор крови и селезенки осуществляли через 30 минут и 3 часа после окончания стрессирующего воздействия, после быстрой декапитации.

2.12.3 Модели холодового стресса

Кратковременное холодовое воздействие представляет собой содержание животных в холодной камере при -20°С в течение 10 минут.

Комбинированное холодовое стрессорное воздействие представляет собой содержание животных в холодной камере при -20°С в течение 30 минут с дополнительной иммобилизацией на спине за конечности.

2.13 Исследование экспрессии генов

2.13.1 Выделение РНК и получение кДНК

Сразу после выделения лейкоцитов и ткани селезенки образцы помещались в консервирующую среду RNAlater ("Ambion") и хранились при -20°С до использования.

Выделение РНК из лейкоцитов и клеток селезенки проводили с помощью коммерческого набора фирмы BioRad (USA) Aurum Total RNA Mini Kit и Gene Elute Mammalian total RNA kit (фирмы Sigma-Aldrich) по соответствующим протоколам.

Для получения кДНК использовали набор для синтеза кДНК фирмы BioRad (iScript cDNA Synthesis Kit). Процедуру проводили по протоколу, описанному в инструкции, приложенной к набору. Полученную кДНК хранили при -20°C .

2.13.2 Проведение полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) проводилась на приборе фирмы Bio Rad CFX96 Touch™ Real-time system в режиме реального времени. Использовали реактивы фирмы Thermo Scientific – смесь для ПЦР Maxima SYBR Green qPCR Master mix (2X).

В качестве гена сравнения в экспериментах с животными использовали ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), в экспериментах на моноцитах человека – ген β -2-микроглобулина.

Праймеры для ПЦР подбирали с использованием компьютерной программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) и литературных данных (Bartholomäus et al., 2009; Treacy et al., 2012).

Синтез праймеров осуществляла фирма «Бигль» (Санкт-Петербург).

Нуклеотидные последовательности праймеров для цитокинов крыс 5'-3':

ИЛ-1 β прямой – GACCTGTTCTTTGAGGCTGACA

ИЛ-1 β обратный – CTCATCTGGACAGCCCAAGTC

ИЛ-10 прямой – GCTGACAGATTCCTTACTGC

ИЛ-10 обратный – ATTCATGGCCTTGTAGACAC

ИЛ-4 прямой – CGGTGAACTGAGGAACTCTGTAGA

ИЛ-4 обратный – TCAGTGTTGTGTGAGCGTGGACTC

ИЛ-6 прямой – TCAACTCCATCTGCCCTTCAG

ИЛ-6 обратный – AAGGCAACTGGCTGGAAGTCT

TLR4 прямой – CCTGAAGATCTTAAGAAGCTAT

TLR4 обратный – CCTTGTCTTCAATTGTCTCAAT

ГАФД прямой – CCTGCACCACCAACTGCTTAGC

ГАФД обратный – GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC

ТФР-бета прямой -- AGGACCTGGGTTGGAAGTGG

ТФР-бета обратный – AGTTGGCATGGTAGCCCTTG

ФНО-альфа прямой – TCGAGTGACAAGCCCGTAGC

ФНО-альфа обратный – CTCAGCCACTCCAGCTGCTC

Нуклеотидные последовательности праймеров для кДНК человека 5'-3':

ИЛ-1 β прямой – GGATATGGAGCAACAAGTGG

ИЛ-1 β обратный – ATGTACCAGTTGGGGAAC TG

β -2-микроглобулин прямой – CCAGCAGAGAATGGAAAGTC

β -2-микроглобулин обратный – GATGCTGCTTACATGTCTCG

Протокол проведения ПЦР:

1. 95,0°C – 10 мин

2. 94,0°C – 15 сек

3. 60,0°C – 1 мин

4. 72,0°C – 1 сек (считывание уровня флюоресценции)

Шаги 2-4 повторяются в течение 40 циклов.

5. Кривая плавления от 60,0°C до 94,0°C, через 0,5°C.

6. 10,0°C – 10 мин

Специфичность продуктов реакции оценивали по кривым плавления.

Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения CFX Manager™ версия 2.1.

В некоторых случаях для оценки экспрессии генов методом ПЦР в режиме реального времени использовали набор фирмы BioRad (USA) «iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR Green», который позволяет проводить синтез и дальнейшую амплификацию кДНК в одной пробирке.

2.14 Исследование генерации супероксидного радикала

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

Метод основан на способности фагоцитирующих клеток в процессе инициации фагоцитоза поглощать растворимый в воде желтый нитросиний тетразолий и восстанавливать его за счет реакций, так называемого, «респираторного взрыва» в нерастворимый в воде формазан. В качестве активаторов использовали антимикробные пептиды (АМП) или форбол-12-миристан-13-ацетат (ФМА).

Ход определения:

1. К 1 мл цитратной крови добавляем 1 мл 0,01 М Na-фосфатного буфера с 0,14 М NaCl, pH 7,2-7,4 (далее ЗФР – забуференный "физиологический раствор").

2. Полученную смесь разделяем на 4 пробы по 0,5 мл.

3. В 2 пробы добавляем 0,1 мл раствора АМП (или ФМА) в ЗФР и 0,1 мл 2 мМ раствора НСТ. Конечная концентрация АМП в пробе – 4 мкг/мл.

4. В 2 оставшиеся пробы добавляем вместо АМП 0,1 мл ЗФР и 0,1 мл 2 мМ раствора НСТ. Эти пробы служат для оценки не стимулированного уровня генерации супероксидного радикала.

5. Для контроля в чистую пробирку добавляем 0,6 мл ЗФР и 0,1 мл раствора НСТ

6. Инкубируем все пробирки в течение 30 мин при 37°C.

7. Для удаления эритроцитов добавляем в пробирки по 10 мл H₂O, оставляем на 10 мин при комнатной температуре.

8. Центрифугируем 15 мин при 1000 g, супернатант сливаем.

9. Останавливаем реакцию, заливая осадок 10 мл 0,1 н HCl.

10. Центрифугируем 15 мин при 1000 g, супернатант сливаем.

11. Промываем осадок 10 мл H₂O.

12. Центрифугируем 15 мин при 1000 g, супернатант сливаем.

13. После последнего центрифугирования к осадку приливаем 1,2 мл 2 М КОН и 1,4 мл диметилсульфоксида, перемешиваем пипетированием и инкубируем в течение 10-15 минут 56°C до полного растворения формазана.

14. На спектрофотометре измеряем оптическую плотность при длине волны 620 нм.

Рассчитываем показатель НСТ-редукции (П-нст) по формуле:

$$\text{П-нст} = A_{620} / \text{Сф} \cdot \text{В}$$
, где Сф – количество фагоцитов в пробе, В – время контакта с НСТ в секундах, A_{620} – оптическая плотность диметилформамидного экстракта, измеряемая при длине волны 620 нм

2.15 Определение уровня диеновых конъюгатов в плазме

Принцип метода [Камышников, 2000] основывается на установлении содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов в крови по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра (233 нм).

Реактивы:

1. Смесь «гептан-изопропанол» (1:1 по объёму).
2. Раствор HCl, рН 2,0 (0,1 н HCl с рН 1,1 разводят водой 1:4)

Ход определения:

К 0,2 мл плазмы добавляют 4 мл смеси «гептан-изопропанол» (1:1) и встряхивают 10-15 минут на лабораторном встряхивателе (или, закрыв пробкой, руками). Далее в пробирку добавляют 1 мл раствора HCl (рН 2) и 2 мл гептана, интенсивно встряхивают и после отстаивания и расслоения смеси на фазы (на что уходит 20-25 мин) отбирают верхний, гептановый слой, который используют для определения в нём ацилгидроперекисей по степени поглощения при длине волны 233 нм (A_{233})

В качестве контрольной пробы используют образец, содержащий вместо плазмы 0,2 мл воды и подвергнутый всем вышеперечисленным видам обработки.

Расчёт содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов производят в относительных единицах по формуле:

$$A_{233} \text{ на 1 мл плазмы} = A_{233} * V_{\text{э}}/V_{\text{пл}} = (A_{233}*4)/0,2 = A_{233}*20,$$

где A_{233} – значение оптической плотности опытной пробы, измеряемой при длине волны 233 нм; $V_{\text{э}} = 4$ мл – конечный объём гептанового экстракта (в мл), $V_{\text{пл}} = 0,2$ мл – объём взятой плазмы крови.

2.16 Дегрануляция нейтрофилов форбол-12-мирилат-13-ацетатом

1. 1 мл цитратной крови разделяем на 2 аликвоты по 0,5 мл.
2. Одну аликвоту центрифугируем при 500 g в течение 5 минут для получения плазмы. Плазму отбираем в чистую микропробирку и используем для иммуноферментного анализа.

3. Во вторую аликвоту добавляем 2 мкл раствора ФМА (0,5 мг/ мл в диметилсульфоксиде), аккуратно перемешиваем и инкубируем 30 мин при 37°C, периодически перемешивая. После инкубации пробы быстро охлаждаем, помещая в лед, отделяем плазму центрифугированием, отбираем в чистую микропробирку и используем для иммуноферментного анализа.

2.17 Иммунохимические методы исследования

2.17.1 Получение антисывороток к лактоферрину, миелопероксидазе и дефенсинам

2.17.1.1 Конъюгирование дефенсинов крысы с овальбумином

1 мг дефенсина RatNP3 (или смеси дефенсинов) разводим в 0,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,0. Затем добавляем 5 мг овальбумина (ОА) фирмы «Sigma», разведенного в 0,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,0. К полученной смеси добавляем 1 мл свежеприготовленного 0,02% раствора глутаральдегида в 0,1 М Na-фосфатного буфера, pH 7,0. Смесь перемешиваем в течение 1 часа при комнатной температуре, добавляем 0,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера и из полученного конъюгата дефенсин-ОА удаляем глутаральдегид на колонке для гель-фильтрации PD-10 (фирма GE Healthcare) в соответствии с инструкцией производителя колонок.

2.17.1.2 Иммунизация кроликов лактоферрином, миелопероксидазой или конъюгатом дефенсинов с овальбумином

Иммунные сыворотки к ЛФ, МПО и дефенсину RatNP-3 получали иммунизированием кроликов по модифицированной схеме Призвански К. [Pryzwansky et al., 1978].

- первая иммунизация в подушечки задних лап: 0,2 мл ЛФ, МПО или конъюгата дефенсин-ОА концентрацией 1,4 мг/мл смешивали с 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда

- вторая иммунизация на 29-31 день после первой, подкожно вдоль линии позвоночника: 0,2 мл ЛФ, МПО или конъюгата дефенсин-ОА концентрацией 1,4 мг/мл смешивали с 0,25 мл неполного адьюванта Фрейнда

- третья иммунизация на 29-31 день после второй идентична второй иммунизации

Через 10 дней после третьей иммунизации из ушной вены производился забор крови. Кровь собирали в пробирку без антикоагулянта, после формирования сгустка его отделяли, в сыворотку добавляли мертиолат натрия до концентрации 0,01 %, и хранили при 4°C. При необходимости иммунизацию с последующим забором крови повторяли, но не ранее 14 дней с последней иммунизации.

2.17.2 Выделение антител к лактоферрину, миелопероксидазе и дефенсинам крысы из антисывороток

2.17.2.1 Связывание белков и пептидов с цианоген бромид-активированной агарозной матрицей

Для получения аффинных колонок было взято по 10 мг ЛФ и МПО и по 5 г цианоген бромид-активированной агарозной матрицы фирмы Sigma, 700 мкг суммарной фракции дефенсинов крысы и соответственно 0,5 г цианоген бромид-активированной агарозы. Связывание антигенов с матрицей проводили в соответствии с инструкцией производителя цианоген бромид-активированной агарозы.

После связывания матрицы уравнивали 1 М NaCl и хранили при 4°C.

2.17.2.2 Получение моноспецифических иммуноглобулинов

Фракцию иммуноглобулинов из иммунных сывороток получали высаливанием насыщенным раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. К 10 мл сыворотки добавляли 5 мл 4 М раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, осадок отделяли центрифугированием, растворяли в воде и повторяли процедуру высаливания. Полученную фракцию иммуноглобулинов использовали для дальнейшей аффинной очистки на колонках агарозы с пришитыми миелопероксидазой (МПО-агароза), ЛФ (ЛФ-агароза) или дефенсинами (дефенсин-агароза). Иммуноглобулины, диализованные против 0,01 М Na-фосфатного буфера, 0,14 М NaCl,

pH 7,4 наносили на аффинные колонки, уравновешенные тем же буфером, отмывали от несвязавшихся белков и элюировали антитела 0,1 М раствором глицин-HCl, 0,1 М NaCl, pH 3,0. Полученные анти-МПО, анти-ЛФ, анти-дефенсины диализовали против 0,01 М Na-фосфатного буфера, 0,14М NaCl, pH 7,4, добавляли тимерозал (мертиолят натрия) до конечной концентрации 0,01% и хранили при -20° С. Эти антитела использовали в качестве первичных антител в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА) и для получения конъюгатов антител с пероксидазой хрена.

2.17.3 Конъюгация антител с пероксидазой хрена

Конъюгаты антител с пероксидазой хрена (ПХ) получали периодатным методом (Кэтти, Райкундалиа, 1991). 0,8 мг пероксидазы хрена растворили в 0,1 мл воды, затем добавили 0,2 мл свежеприготовленного 0,1 М раствора NaIO_4 . Смесь перемешивали в течение 20 мин в стеклянном флаконе. С помощью фильтрующих колонок (Millipore Centrifugal Filter Units 10 000 MWGO) произвели замену раствора в смеси на 1 мМ Na-ацетатный буфер с pH 4,4. Довели pH смеси до 9-9,5 добавлением 2 мкл 0,2 М Na_2CO_3 , и сразу добавили 100 мкл раствора иммуноглобулинов в концентрации 10 мг/мл в 0,05 М карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,5. Смесь перемешивали 2 часа при комнатной температуре, затем добавили 10 мкл свежеприготовленного раствора боргидрида натрия (NaBH_4), в концентрации 4 мг/мл. Перемешивали 2 часа при температуре 4°С. Полученный конъюгат перевели в 0,1 М боратный буфер с pH 7,4 с помощью фильтрующих колонок (Millipore Centrifugal Filter Units 100 000 MWGO). К 50 мкл конъюгата добавили 20 мкл глицерина и полученные конъюгаты (анти-МПО-ПХ, анти-ЛФ-ПХ, анти-дефенсин-ПХ) хранили при температуре -20°С.

2.17.4 Иммуноцитохимический метод контроля сыворотки на наличие специфических антител

1) Мазки крови высушивали в течение 30 минут, фиксировали холодным ацетоном, промывали в трех сменах забуференного «физиологического» раствора (0,01 М Na-фосфатный буфер с 0,14 М NaCl, pH 7,2-7,4). Промывку производили после каждой инкубации.

2) Блокировали активность эндогенной пероксидазы, инкубируя в течение 20 мин в растворе метанол-пероксид (метанол : 30% пероксид водорода = 29:1).

3) На мазки наносили иммунные и неиммунные (в качестве контроля) сыворотки в разведении 1:4 или 1:8 и инкубировали во влажных камерах 40 мин при 37 °С.

4) Инкубировали мазки с конъюгатом антител с пероксидазой хрена (разведение 1:2000 или 1:4000) 40 мин при 37°С.

5) В качестве субстрата для пероксидазы использовали раствор диаминобензидина в 0,05 М трисНСl буфере, рН 7,6 с 0,01% пероксидом водорода, инкубировали 5 мин при комнатной температуре.

Результат наблюдали визуально под микроскопом.

2.17.5 Процедура иммуноферментного определения концентрации миелопероксидазы, лактоферрина, дефенсина RatNP-3 в биологических жидкостях

Концентрацию МПО, ЛФ, дефенсина RatNP-3 в биологических жидкостях определяли твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА), методом «сэндвича». В лунки планшета для ИФА вносили по 0,1 мл раствора антител в концентрации 10 мкг/мл в 0,1 М карбонат-бикарбонатном буфере рН 9,5 и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Затем планшеты промывали буфером для промывки (0,01М Na-фосфатный буфер рН 7,2, 0,15 М NaCl, 0,05% Tween-20). В лунки вносили исследуемые образцы в объеме 0,1 мл, разведенные до рабочих концентраций буфером для промывки с 0,1% бычьим сывороточным альбумином (БСА). Этим же буфером делали последовательные разведения стандартного раствора МПО или ЛФ для получения следующих концентраций: 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 нг/мл, для дефенсина RatNP-3 – 4,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25, 0,125 нг/мл. Планшеты инкубировали при 4°С в течение ночи, промывали буфером для промывки, вносили по 0,1 мл соответствующих конъюгатов (анти-МПО-ПХ, анти-ЛФ-ПХ, анти-дефенсин_ПХ) в разведении 1:2000 или 1:4000 (разводили буфером с 0,1% БСА) и инкубировали при 4°С в течение ночи. Затем после промывки вносили по 0,1 мл раствора субстрата для ПХ (0,2 мг/мл о-фенилендиамина в 0,02 М Na-цитратном буфере рН 5,0, содержащем 0,015% H₂O₂), реакцию останавливали добавлением 50 мкл 2,5 М H₂SO₄ измеряли экстинкцию на спектрофотометре Labsystems Multiskan MS при длине волны 492 нм. На основании

стандартных разведений строили калибровочную кривую и по ней определяли содержание МПО, ЛФ или дефенсина в исследуемых образцах.

2.18 Лизосомально-катионный тест

Внутриклеточное содержание катионных антимикробных белков и пептидов оценивали с помощью полуколичественного цитохимического лизосомально-катионного теста (ЛКТ) [Пигаревский, Мазинг, 1987]. Метод основан на способности красителя прочного зеленого избирательно связываться при определенном рН с катионными белками и пептидами. 0,1% раствор красителя готовят на трис-НСl буфере, содержащем метанол (50% метанол, 70 мМ трис-НСl, рН 8.1-8.2). В 50 мл метилового спирта растворяют 0,8 г сухого трис(оксиметил)аминометана и добавляют к полученному раствору 47,3 мл дистиллированной воды и 2,75 мл соляной кислоты. В приготовленном метаноловом трис-буфере растворяют 0,1 г сухого порошка прочного зеленого. Для окраски ядер клеток необходимо докрасить препараты ядерным красителем. Для этого лучше всего использовать 0,25% водный раствор азура А.

Мазки крови высушиваются на воздухе или фиксируются в смеси формалин-этанол и помещаются в спиртовой раствор (50% метанол, 70 мМ трис-НСl, рН 8,1-8,2) красителя прочного зеленого на 20 мин, отмывают в воде и докрашивают ядра азуром А. Препараты анализируют под микроскопом, увеличение 900х -1000х.

По интенсивности окраски прочным зеленым определяют (полуколичественно) внутриклеточное содержание катионных белков путем расчета среднего цитохимического коэффициента (СЦК) по модифицированной формуле Астальди и Верга. ЛКТ-тест проводили сотрудники отдела Общей патологии и патологической физиологии ФГБНУ «ИЭМ» к.б.н. Н.С. Новикова и С.В. Перекрест.

2.19 Иммуноферментное определение концентрации кортикостерона, адренокортикотропного гормона, норадреналина и цитокинов

Определение концентрации кортикостерона в плазме крови проводили с использованием коммерческого набора Corticosterone EIA-4164 фирмы DRG, согласно инструкции, приложенной к набору.

Определение концентрации адренкортикотропного гормона (АКТГ) проводили иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора АСТН EIA-3647 фирмы DRG, согласно инструкции, приложенной к набору.

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, согласно инструкции, приложенной к наборам.

2.20 Клинический материал

В работе использовали сыворотку крови больных туберкулезом, полученную из ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России и 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.

2.21 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

За достоверный принимали уровень значимости $p < 0,05$.

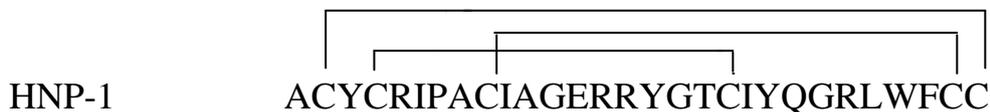
ГЛАВА 3. Результаты и обсуждение

3.1 Поиск и идентификация новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов макака-резуса *Macaca mulatta*

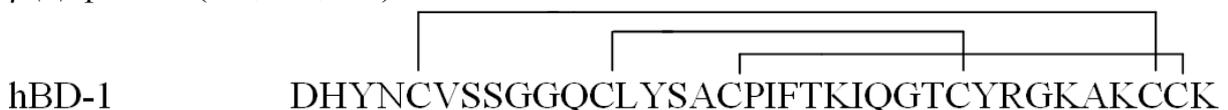
Среди антимикробных пептидов наиболее распространенным в эволюции семейством являются дефенсины (от англ. defence – защита, оборона) [Ganz et al., 1985; Кокряков, 1999]. В настоящее время дефенсины выделены и охарактеризованы по структурно-функциональным свойствам из различных клеточно-тканевых источников представителей многих видов членистоногих [Bulet et al., 1999], моллюсков [Charlet et al., 1996], птиц [Harwig et al., 1994] и млекопитающих, включая человека [Lehrer et al., 1993].

Дефенсины позвоночных представляют собой аргинин-лизин-богатые антимикробные пептиды с β -складчатой структурой, стабилизированной тремя внутримолекулярными дисульфидными связями. Дисульфидные связи придают молекулам полипептидов повышенную устойчивость к переваривающему действию многочисленных протеиназ лейкоцитарного и микробного происхождения, обеспечивая их пролонгированное функционирование в качестве антибиотических агентов при фагоцитозе и воспалении. По расположению остатков цистеина и конфигурации дисульфидных связей дефенсины млекопитающих до недавнего времени делились на два подсемейства – α - и β -дефенсины, гены которых имеют различную структуру, но по данным сравнительных молекулярно-генетических исследований происходят от одного предкового (анцестрального) гена [Liu et al., 1997]:

α -Дефенсин (1-6, 2-4, 3-5) человека:



β -Дефенсин (1-5, 2-4, 3-6) человека:



В 1999 году была открыта новая группа – θ -дефенсины, которые в отличие от дефенсинов других типов, относятся к макроциклическим пептидам, циклическая структура которых формируется только пептидными связями [Tang et al., 1999]. Первым описанным циклическим дефенсином стал RTD-1 (**R**hesus **T**heta-**D**efensin), полученный американскими исследователями из нейтрофилов крови обезьяны *Macaca mulatta* (Rhesus macaque) [Tang et al., 1999]. RTD-1 представляет собой антимикробный пептид, содержащий три дисульфидных связи, в котором пептидный остов молекулы естественным образом замкнут в макроцикл (кольцо). Авторы показали, что полипептидная цепь RTD-1 (18 аминокислот) транскрибируется с двух различных генов и зрелая молекула θ -дефенсина образуется путем сочетания процессинга с белковой рекомбинацией:



Особенностью антимикробного действия θ -дефенсина является способность умерщвлять микроорганизмы при повышенной ионной силе растворов (0,1 М), тогда как α - и β -дефенсины (за исключением hBD-3) в этих условиях резко снижают свою антибиотическую активность.

На этом их свойстве была основана наша стратегия поиска новых θ -дефенсинов.

Первые эксперименты были проведены на цельной крови обезьян. 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. После лизиса эритроцитов и экстракции белков и пептидов 10% уксусной кислотой очистку антимикробных пептидов проводили по схеме, описанной в главе "Материалы и методы", раздел 2.2, включающей отделение низкомолекулярной фракции с помощью ультрафильтрации через фильтр YM-10, разделение с помощью препаративного электрофореза и заключительную очистку обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ОФ ВЭЖХ).

В результате из 1,64 г лейкоцитов были получены два пептида (250 мкг и 120 мкг), сохраняющие свою антимикробную активность при повышенной ионной силе раствора. 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 модификацию N-концевой аминокислоты или ее отсутствие.

Дальнейшие эксперименты проводили на пептидах, выделенных из костного мозга обезьян. В работе с костным мозгом принимала участие Л.Е. Леонова – сотрудник лаборатории химии белка СПбГУ.

Костный мозг был получен от семи взрослых макак-резусов *Macaca mulatta*. Процедура экстракции белков и пептидов из клеток костного мозга описана в главе "Материалы и методы", раздел 2.2. Полученную смесь белков и пептидов растворяли в 10% уксусной кислоте, освобождались от нерастворимых компонентов центрифугированием и наносили на колонку полиакриламидного геля для разделения полученной смеси белков и пептидов препаративным электрофорезом [Harwig et al., 1993]. Все фракции были проанализированы методом аналитического электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, с целью оценки молекулярной массы элюируемых компонентов. Антимикробную активность содержимого фракций оценивали методом радиальной диффузии в геле агарозы, содержащем микроорганизмы [Lehrer et al., 1991]. Результаты разделения смеси препаративным электрофорезом представлены на рисунке 3.1.1.

Фракции, содержащие низкомолекулярные компоненты, обладающие антимикробной активностью при концентрации NaCl 100 мМ, подвергли хроматографическому разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ. В результате было получено три антибиотических пептида, физико-химические и антимикробные свойства которых позволяли предположить, что они представляют собой циклические дефенсины RTD-1, RTD-2 и RTD-3.

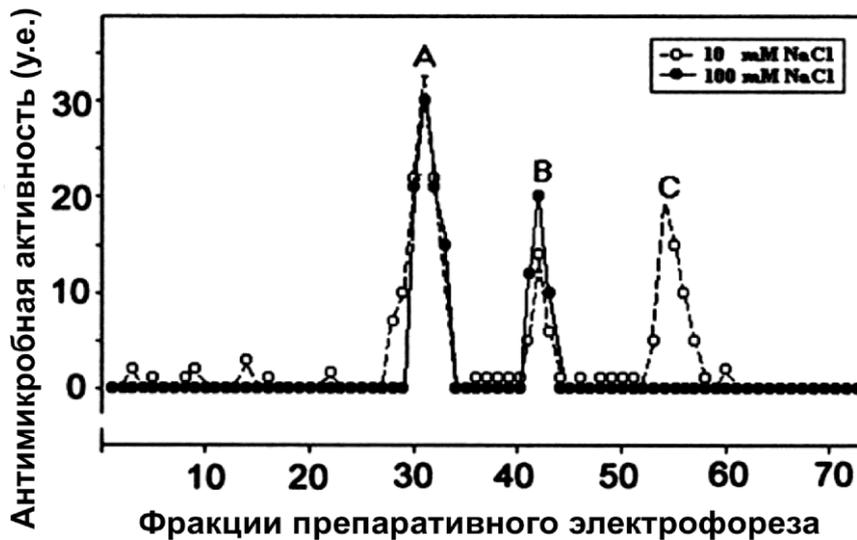


Рисунок 3.1.1 – Тестирование фракций препаративного электрофореза для выявления антибиотических компонентов методом радиальной диффузии в отношении грамотрицательной бактерии *E.coli* ML-35p в присутствии и отсутствии 100 мМ NaCl. Фракции пика С активны только в условиях низкой концентрации соли и содержат только α -дефенсины.

3.1.1 Аминокислотные последовательности выделенных дефенсинов

Так как установить аминокислотную последовательность полученных пептидов стандартным методом деградации по Эдману было невозможно, были предприняты попытки получить последовательности генов, кодирующих эти пептиды методом молекулярного клонирования. Это было осуществлено методом RACE-анализа с использованием тотальной РНК, выделенной из костного мозга макака-резуса. 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. Эти «половинки» получили по предложению профессора Лерера название "демидефенсины":

Демидефенсин-1	<i>MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD</i> 40 <i>QGMHSFTRPENAAALPLSESARGL</i> RCLCRRGVCQLL 76
Демидефенсин-2	<i>MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD</i> 40 <i>QGMHSFTRPENAAALPLSESAKGL</i> RCICTRGFCRLL 76
Демидефенсин-3	<i>MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD</i> 40 <i>QGMHSFTRPENAAALPLSESERGL</i> RCICVLGICRLL 76

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

Чтобы определить уровень экспрессии генов демидефенсинов у различных животных, были синтезированы соответствующие ПЦР-праймеры, которые были использованы для амплификации кДНК костного мозга четырех обезьян *Macaca mulatta*. Были проклонированы и секвенированы ~ 100 ПЦР-продуктов (Табл. 3.1.1). Клоны, кодирующие мРНК демидефенсина-1 составили около 75% всех клонов, а транскрипты демидефенсина-3 – 20%. Данные, представленные в таблице 3.1.1. позволяют говорить о существовании полиморфизма генов дефенсинов у этого вида обезьян.

На основании полученных данных были синтезированы циклические пептиды (глава «Материалы и методы», раздел 2.2.2), представляющие собой различные варианты комбинаций зрелых демидефенсинов 1 и 2 (Рис. 3.1.2):

Таблица 3.1.1 – Относительный уровень транскрипции генов демидефенсинов в костном мозге у различных макак-резусов.

Животное	Количество транскриптов различных демидефенсинов			Общее количество транскриптов
	1	2	3	
А	15	3	1	19
В	25	2	10	37
С	18	0	4	22
Д	18	0	6	24
Итого	76	5	21	102
% от общего количества	74,5%	4,9%	20,6%	100%

Демидефенсин-1	MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD	40
	QGMHSFTRPENAAALPLSESARGL RCLCRRGVC QLL	76
Демидефенсин-2	MRTFALLTAMLLLVALHAQAEA RQARADEAAAQQQPGADD	40
	QGMHSFTRPENAAALPLSESAKGL RCICTRGFC RLL	76

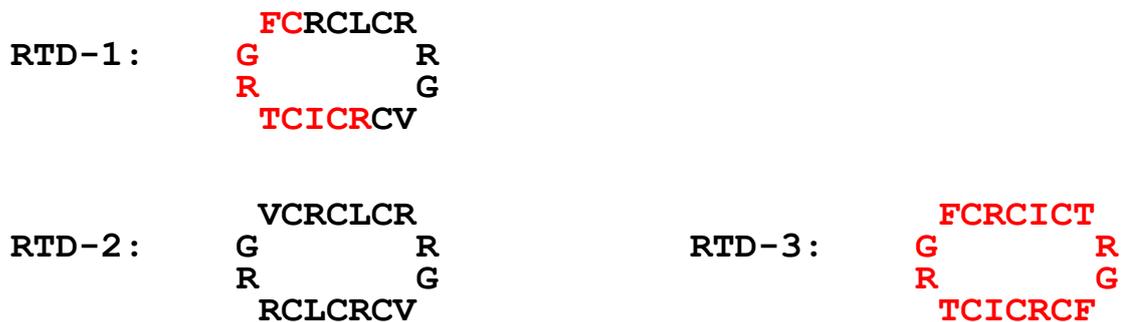


Рисунок 3.1.2 – Изоформы θ -дефенсинов RTD-1, RTD-2 и RTD-3 лейкоцитов крови обезьяны *Macaca mulatta*

3.1.2 Сравнительный анализ натуральных и синтетических дефенсинов

Чтобы идентифицировать полученные пептиды как циклические θ -дефенсины RTD-1, RTD-2 и RTD-3 было проведено их сравнение с синтетическими аналогами. Каждая исследуемая пара имела идентичное время элюции с ОФ-ВЭЖХ (Рис. 3.1.3.) и массу.

Природные и химически синтезированные пептиды подвергали протеолизу с помощью трипсина. Полученные протеолитические фрагменты для каждой пары пептидов имели идентичную молекулярную массу в пределах ошибки аналитического метода (Табл. 3.1.2).

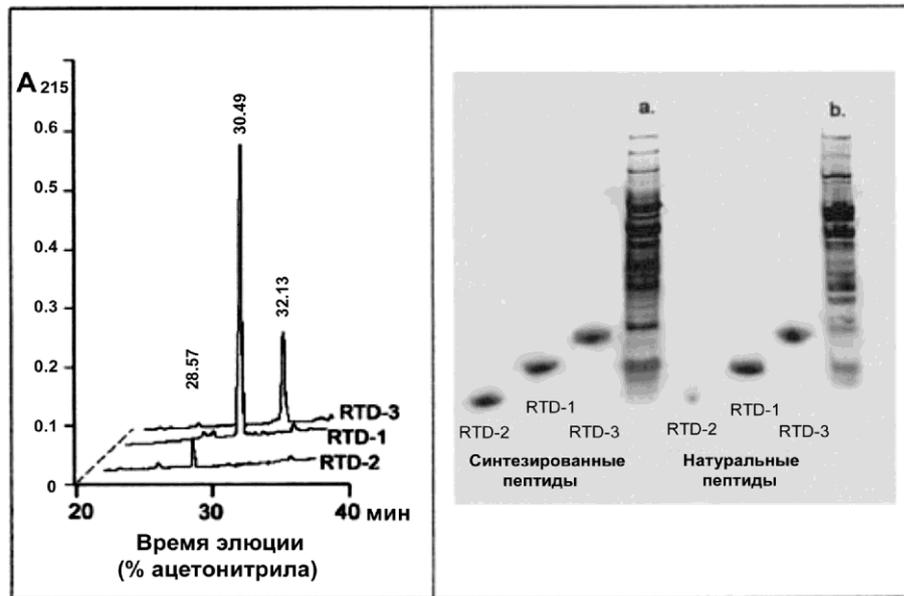


Рисунок 3.1.3 – Хроматографический и электрофоретический анализ полученных θ -дефенсинов. Слева показаны профили элюции полученных натуральных RTD-1, -2, -3 при ОФ ВЭЖХ. Их синтетические аналоги имели идентичные времена элюции. Справа показана идентичная электрофоретическая подвижность синтетических и натуральных пептидов. Дорожки а и б – исходная смесь белков костного мозга. Гели окрашены красителем Кумасси G-250.

На основании электрофоретического, хроматографического и масс-спектрометрического анализов можно утверждать, что клетки костного мозга макака-резуса продуцируют по крайней мере три циклических минидефенсина, которые кодируются двумя генами (демидефенсин-1 и демидефенсин-2). Необходимо отметить, что из костного мозга не были выделены циклические пептиды, содержащие фрагменты демидефенсина-3, возможно, что они присутствуют в очень малых количествах, и для их выделения не хватило чувствительности методов. Также нельзя исключить вероятность того, что, несмотря на присутствие в костном мозге мРНК демидефенсина-3, синтез соответствующих белков по какой-либо причине не происходит.

Таким образом, впервые показано, что циклические θ -дефенсины RTD-2, RTD-3 и RTD-1 представляют собой продукты посттрансляционной системы формирования разнообразия первичных структур антимикробных белково-пептидных соединений,

основанной на сочетании процессинга и пептидной рекомбинации. Необходимо подчеркнуть, что за образование трех изоформ θ -дефенсинов ответственны только два гена демидефенсинов.

Работа выполнялась совместно с лабораторией проф. Р. Лерера (Калифорнийский университет в Лос-Анджелесе, США).

Таблица 3.1.2 – Масс-спектрометрический анализ θ -дефенсинов

Пептиды	Масса пептидов (Да)		
	ожидаемая	натуральных	синтетических
RTD-1	2081,6 (+6,0)	2081,67 (+6,03)	2081,62 (+6,42)
RTD-2	2088,7 (+6,0)	2089,10 (+5,79)	2088,15 (+6,08)
RTD-3	2074,6 (+6,0)	2074,76 (+5,72)	2075,20 (+4,34)
RTD-1			
GFCR	480,6	481,8	482,0
CLCR	493,6	494,3	493,9
GVCR	432,5	434,0	434,2
CICTR	594,7	594,4	594,9
GFCR/CICTR	1073,3	1074,3	1074,8
CLCR/GVCR	924,2	924,8	925,3
RTD-2			
GVCR	432,5	434,1	433,9
CLCR	493,6	Не наблюдалось	493,8
GVCR/CLCR	924,2	925,8	925,5
RTD-3			
GFCR	480,6	481,9	481,9
CICTR	594,7	594,9	594,8
GFCR/CICTR	1073,3	1074,2	1074,4
GFCR/(CICTR) ₂	1665,1	1667,7	1667,9

3.2 Поиск и идентификация новых пептидов дефенсинового семейства из лейкоцитов гамадрила *Papio hamadryas*

В связи с необычайно разнообразным спектром АМП у макак-резуса и в целях более полного понимания их роли в механизмах врожденного иммунитета у приматов (в том числе и у человека), нами были осуществлены выделение и очистка АМП дефенсинового семейства из лейкоцитов крови обезьяны гамадрила (*Papio hamadryas*) – вида, систематически близкого макак-резусу (обезьяны семейства мартышковые).

От двух взрослых самок гамадрила было получено около 200 мл цельной крови. После проведения лизиса эритроцитов и осаждения лейкоцитов сырой вес лейкоцитарной массы составил 1,9 г. Подсчет форменных элементов в мазках лейкоцитарной фракции выявил около 70% нейтрофильных гранулоцитов, 5% эозинофилов и базофилов, остальное – моноциты и лимфоциты.

Пептиды экстрагировали 10% уксусной кислотой, как описано в разделе «Методы исследования». Электрофоретический анализ экстрактов в кислой буферной системе выявил наличие нескольких высокоосновных пептидных фракций, сравнительный анализ спектра АМП лейкоцитов человека, экстрагированных аналогичным способом, определил отсутствие у него подобных пептидов (рис. 3.2.1). Тестирование антимикробной активности пептидов гамадрила методом наложения ПААГ показало, что они активны в отношении бактерий *E.coli* и *L.monocytogenes*.

Экстракты подверглись ультрафильтрации через фильтр «Amicon» УМ-10. При использовании фильтра преследовались две цели: добиться предварительного разделения высоко- и низкомолекулярных пептидных фракций и избавиться от солей, присутствующих в экстрактах и затрудняющих последующие стадии очистки. Электрофоретический анализ в щелочной среде в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) показал, что большая часть фракций пептидов с молекулярными массами 3-4 кДа не прошли через фильтр с НОММ 10 кДа.

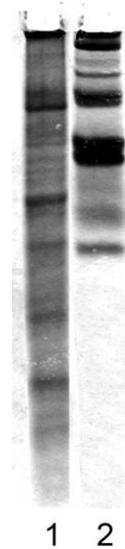


Рисунок 3.2.1 – Электрофореграмма уксуснокислых экстрактов лейкоцитов гамадрила (1) и лейкоцитов человека (2). Гели окрашены красителем Кумасси G-250.

Дальнейшее разделение материала, не прошедшего через фильтр ("концентрат" УМ-10) проводили методом препаративного электрофореза в кислой среде с мочевиной, что позволило осуществить предварительное разделение фракций, как по заряду молекул, так и по их молекулярным массам. Содержимое всех фракций тестировали на антимикробную активность. Окончательную очистку низкомолекулярных фракций «концентрата УМ-10», демонстрирующих АМА, проводили методом ОФ ВЭЖХ на колонке «Alltech» C₁₈ (рис. 3.2.2).

Для лучшего разделения пиков 2 и 3 применяли рехроматографию не разделившихся фракций на той же колонке, элюируя пептиды линейным градиентом ацетонитрила от 10 до 40% в течение 1 часа. В результате было выделено три высокоочищенных пептида, которые получили предварительные названия П-1, П-2 и П-3, порядковые номера присвоены в соответствии с электрофоретической подвижностью пептидов в направлении к катоду в ПААГ (рис. 3.2.3; дорожки 1-3). Пептид П-1 получен в количестве ~25 мкг, П-2 ~35 мкг и П-3 ~65 мкг).

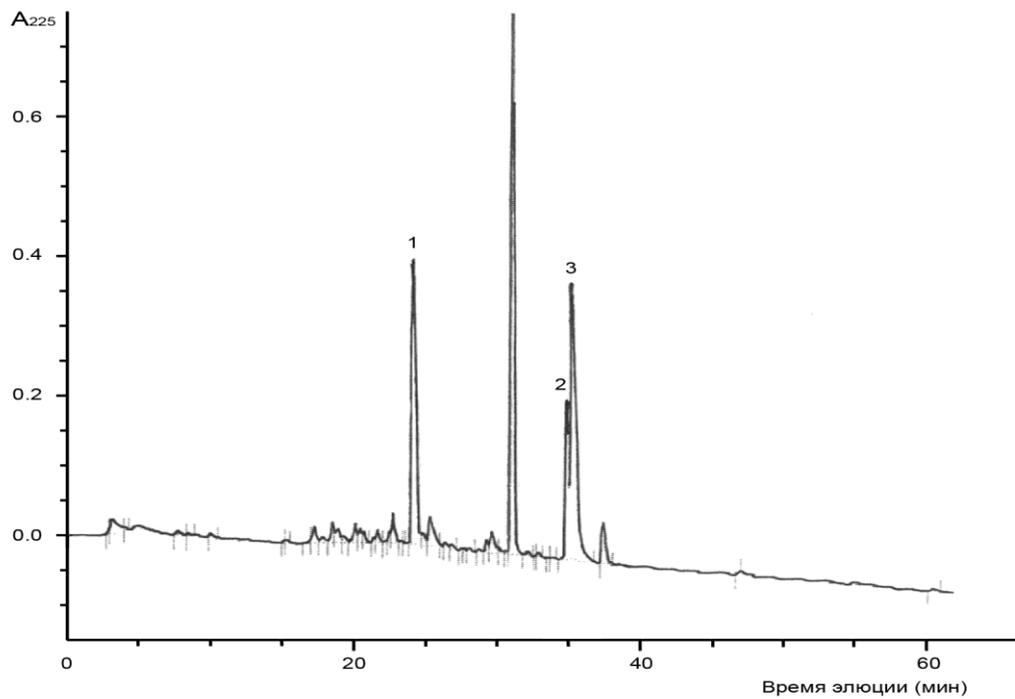


Рисунок 3.2.2 – Профиль элюции пептидов «концентрата УМ-10» с колонки «Alltech» C_{18} (4,6 x 250 мм) линейным градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 1 час. Пики 1–3 демонстрируют антибиотическую активность в отношении *E.coli*, *C.albicans* и *L.monocytogenes*

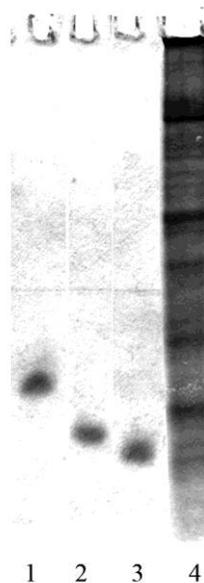


Рисунок 3.2.3 – Электрофореграмма очищенных пептидов гамадрила. 1-3 – П1-3, соответственно; 4 – экстракт лейкоцитов гамадрила гамадрила. Гели окрашены красителем Кумасси G-250.

3.2.1 Молекулярные массы выделенных пептидов

Молекулярные массы выделенных пептидов определяли методом масс-спектрометрии на время-пролетном масс-спектрометре. Молекулярные массы пептидов составили: П1 – 3938.73 Да, П2 – 3782.35 Да и П3 – 3725.30 Да (рис. 3.2.4).

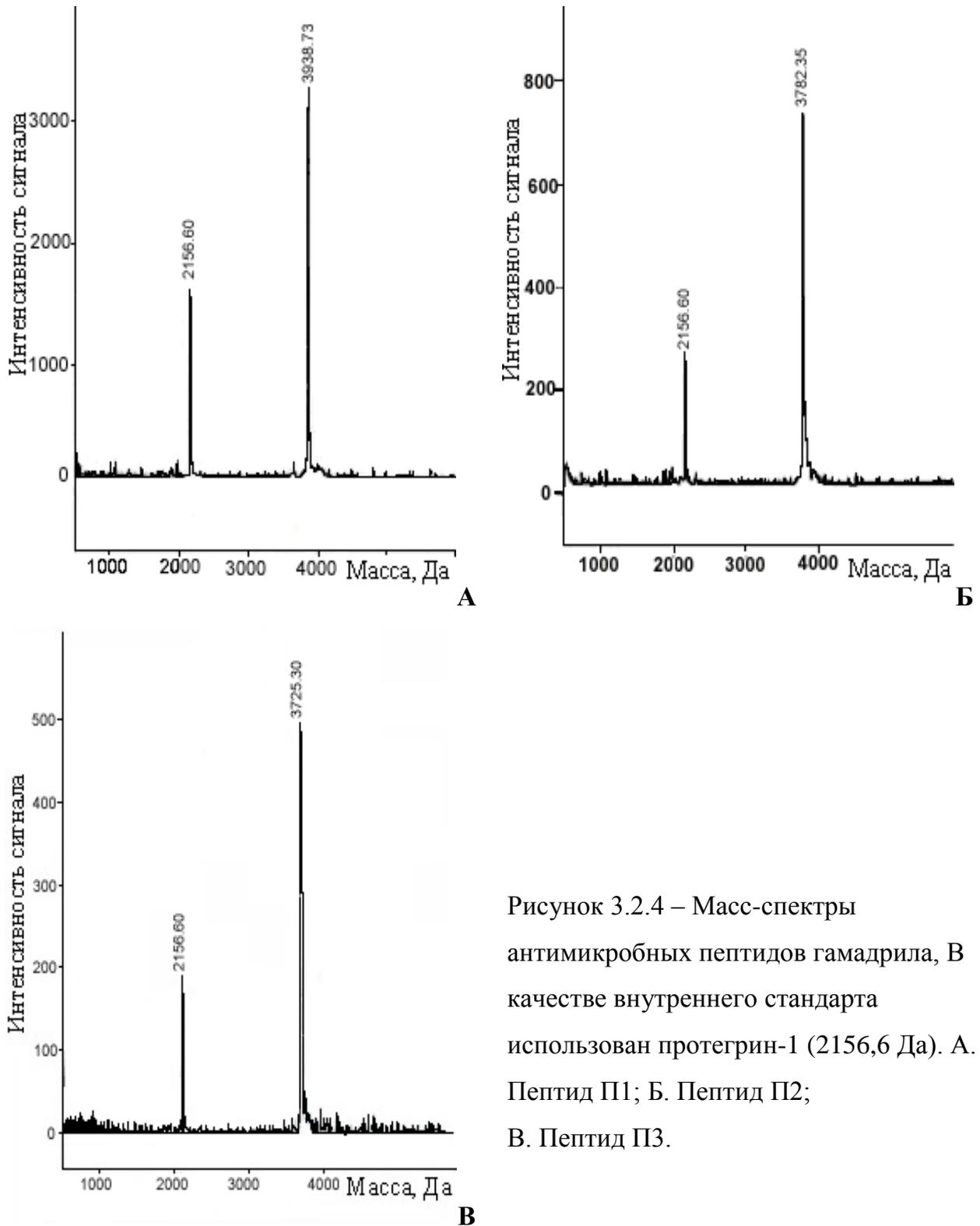


Рисунок 3.2.4 – Масс-спектры антимикробных пептидов гамадрила, В качестве внутреннего стандарта использован протегрин-1 (2156,6 Да). А. Пептид П1; Б. Пептид П2; В. Пептид П3.

3.2.2 Первичные структуры выделенных пептидов

Первичные структуры пептидов П1, П2 и П3 были определены методом деградации по Эдману на автоматическом секвенаторе (работа по определению первичных структур проводилась 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 П1-3 к данному подсемейству дефенсинов. Поэтому они получили названия PHD1, PHD2 и PHD3 (**P**apio **h**amadryas **d**efensin) соответственно. Первичные структуры PHD1-3 представлены на рисунке 3.2.5. Для сравнения приведены первичные структуры α -дефенсинов: из нейтрофилов человека HNP-1 и макак-резуса (RMAD5), а также из клеток Панета человека HD5 и макак-резуса RED1.

PHD1	RRICRCRIGRCLGLEVYFG VCFLHGRLARRCCR
PHD2	RICRCRIGRCLGLEVYFG VCFLHGRLARRCCR
PHD3	RTCRCRLGRC SRRE SYSG SCNINGRIYSLCCR
RED1	RTCRCRIRRCR GLE SSFG NCILHGQFAKLCCR
RMAD5	RTCRCRFGRC FRRE SYSG SCNINGRIFSLCCR
HD5	ATCYCRTGR CATRE SL SG VCEISGRLYRLCCR
HNP1	ACYCRIPACI AGERRYGTCTYQGR LWAFCC

Рисунок 3.2.5 – Первичные структуры α -дефенсинов гамадрила PHD1-3, человека HNP-1 и HD5, макак-резуса RMAD5 и RED1. Жирным шрифтом выделены инвариантные остатки аминокислот.

Близкое соответствие между значениями молекулярных масс, рассчитанных теоретически (3936,8 Да для PHD1, 3780,6 Да для PHD2 и 3724,2 Да для PHD3), и экспериментальными значениями указывает на то, что полученные первичные последовательности являются полными. Как следует из рисунка 3.2.5, PHD2 и PHD3 содержат по 32 аминокислотных остатка, PHD1 – 33, что характерно для семейства α -дефенсинов, содержащих в своем составе 30-37 аминокислот. Из рисунка 3.2.6 также

видно, что первичные структуры PHD1 и PHD2 практически идентичны и различаются только наличием одного дополнительного остатка аргинина у PHD1. Расчетные суммарные заряды молекул выделенных дефенсинов составили +8 для PHD1 и +7 для PHD2 и PHD3.

Для определения наличия внутримолекулярных дисульфидных связей аликвоты PHD1-3 инкубировались с 1,4-дителиотриэтолом (ДТТ) («Sigma», США), который разрушал дисульфидные мостики в молекулах (из расчета 50 молекул ДТТ на одну дисульфидную связь). МС-анализ восстановленных форм PHD1-3 выявил, что молекулярная масса последних изменилась на 6 Да, что подтверждает наличие в молекулах PHD1-3 трех дисульфидных связей.

3.2.3 Антимикробная активность дефенсинов PHD1-3

Анализ антимикробной активности (АМА) показал, что PHD1-3 проявляют антимикробный эффект в отношении всех тестируемых микроорганизмов, хотя и в различной степени. При определении МИК использовались шесть последовательных двукратных разведений PHD1-3, начиная с 50 мкМ. МИК PHD1-3 и HNP-1 для четырех тестируемых микроорганизмов представлены в таблице 3.2.1. Сравнение МИК PHD1-3 и HNP-1 показывает, что, в целом, они схожи по эффективности и характеру АМА. Наибольшую АМА PHD1-3 продемонстрировали в отношении *L. monocytogenes*, наименьшую против *S. aureus*, обе бактерии являются грамположительными. Добавление в агарозный гель 0,1 М NaCl приводило к существенному снижению антимикробного действия против *E.coli*, *C.albicans* и *S. aureus*, в отношении *L. monocytogenes* этот эффект был менее выражен. Это явление, характерное, в той или иной степени, для большинства изученных α -дефенсинов, может объясняться ослаблением сорбции пептидов на мембранах микроорганизмов в условиях повышенной ионной силы среды.

Иммуноцитохимическое исследование в отношении клеточной локализации выделенных пептидов не проводилось, однако, можно предположить, что они являются компонентами гранулярного аппарата нейтрофильных гранулоцитов, которыми была обогащена лейкоцитарная масса.

Таблица 3.2.1 – Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антимикробных пептидов (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
RHD1	1,6	3,5	1,3	1,8	3,8	>50	2,3	4,5
RHD2	1,7	2,9	2,1	1,9	7,8	>50	4,0	7,5
RHD3	2,0	3,1	1,2	1,9	4,5	7,8	2,6	3,8

Известно, что семь α -дефенсинов из лейкоцитов макак-резуса образуют два подсемейства, причем представители одного (RMAD1, RMAD2, RMAD3), проявляют высокую гомологию с HNP-1 (α -дефенсином лейкоцитов человека), а другого (RMAD4, RMAD5, RMAD6, RMAD7) – с HD5 (α -дефенсином человека, продуцируемого клетками Панета в тонком кишечнике) [Tang et al., 1999a]. Кроме того, были выделены и охарактеризованы шесть α -дефенсинов (RED1-6) из тонкого кишечника макак-резуса [Tanabe et al., 2004]. Как следует из рисунка 3.2.5, для RHD3 гомология с одним из α -дефенсинов лейкоцитов макак-резуса RMAD5 составила 90%, с HD-5 – 60%, гомология же с HNP-1 составила <30%. Гомология RHD1 и RHD2, различающихся наличием одного дополнительного остатка аргинина у RHD1, как с RHD3, так и с RMAD5 и HD5 составила 50%. Наибольшее сходство первичных структур для RHD1 и RHD2 (69% гомологии) наблюдалось с RED1, одним из шести энтеральных α -дефенсинов макак-резуса. У макак-резуса пары RMAD4-5 и RMAD6-7 также различаются наличием одного дополнительного остатка аргинина у RMAD4 и RMAD6. Анализ кДНК предшественников RMAD4-7, выявил, что появление этого остатка является результатом альтернативной посттрансляционной модификации [Tang et al., 1999a]. Можно предположить, что и у гамадрила при процессинге предшественников RHD1 и RHD2 такая модификация имеет место. Дендрограмма известных α -дефенсинов макак-резуса, гамадрила и человека, представленная на рисунке 3.2.6, позволяет наглядно оценить степень их структурного родства.

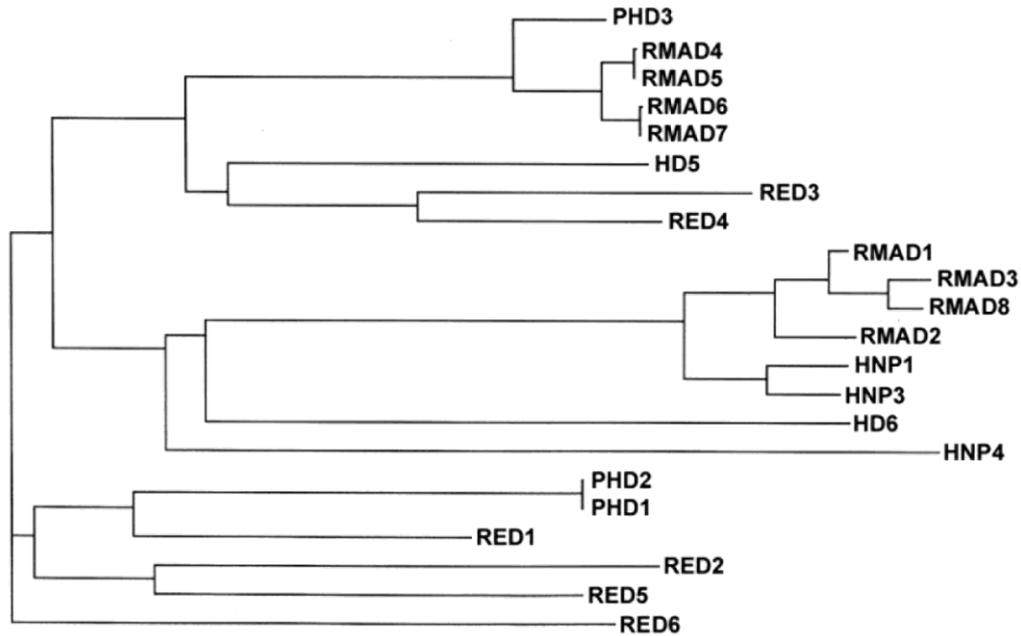


Рисунок 3.2.6 – Дендрограмма α -дефенсинов приматов. PHD1-3 (лейкоциты) – гамадрила; RMAD1-8 (лейкоциты) и RED1-6 (клетки Панета) – макак-резуса; HNP-1, 3, 4 (лейкоциты) и HD5, 6 (клетки Панета) – человека. В скобках указана клеточная локализация пептидов.

Как было указано выше, пептиды PHD1-3 были выделены из фракции уксуснокислых экстрактов лейкоцитов гамадрила, не прошедшей через фильтр с номинально отсекаемой массой 10 кДа, что может свидетельствовать о склонности этих пептидов к образованию олигомеров, что характерно для дефенсинов человека, особенно энтеральных [Chairatana, Nolan, 2014].

3.2.4 Идентификация антимикробных пептидов лейкоцитов гамадрила с молекулярной массой менее 3 кДа

Следующим этапом работы стало выделение антибиотических пептидов из фракции экстрактов лейкоцитов гамадрила, прошедшей через фильтр ("ультрафильтрат" УМ-10). "Ультрафильтрат" был обессолен и сконцентрирован ультрафильтрацией на фильтре УМ-1 и нанесен на колонку для препаративного электрофореза в ПААГ. Фракции 44-48 и 56-58, демонстрирующие антибиотическую активность против *E.coli*, *L. monocytogenes* и *C.albicans* подвергали разделению методом ОФ ВЭЖХ на колонке

«Alltech» C₁₈ и C₄ соответственно, линейным градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 1 час в 0.1% растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) в воде (рис. 3.2.7 и 3.2.8).

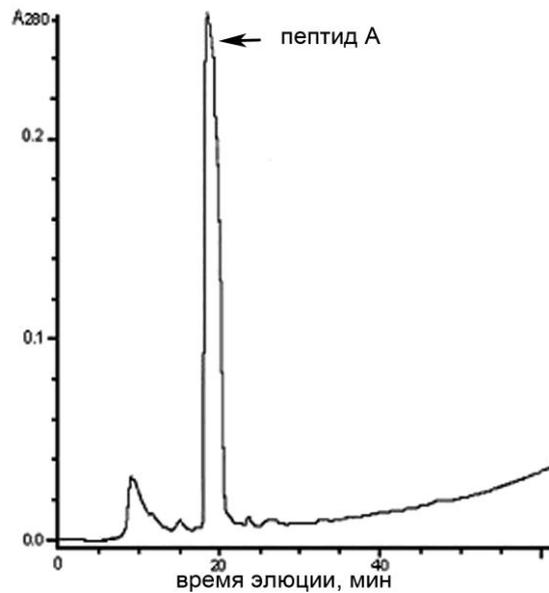


Рисунок 3.2.7 – Профиль элюции фракции № 46 с колонки «Alltech» C₁₈, в 0,1% растворе ТФУ, линейным градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 1 час, скорость элюции 1 мл/мин

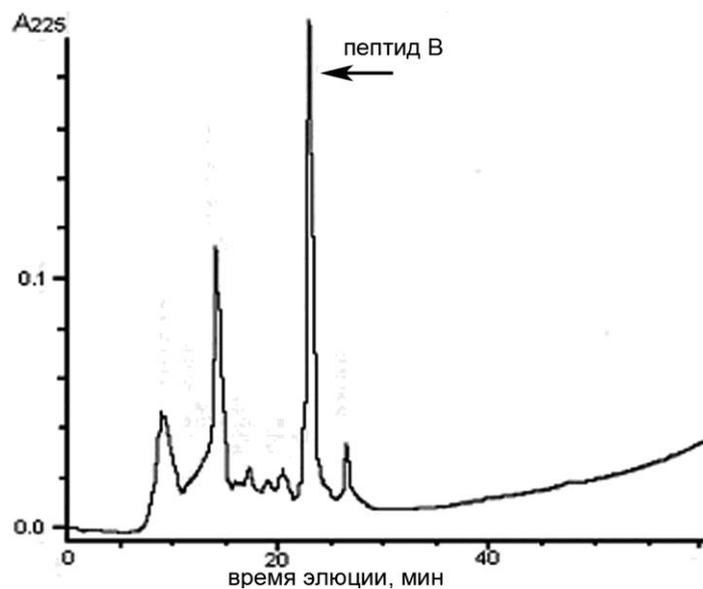


Рисунок 3.2.8 – Профиль элюции фракции № 57 с колонки «Alltech» C₄, в 0,1% растворе ТФУ, линейным градиентом ацетонитрила от 0% до 60% за 1 час, скорость элюции 1 мл/мин

Пептиды, демонстрирующие антибиотическую активность обозначили как пептиды А и В.

Точные молекулярные массы выделенных пептидов определяли методом масс-спектрометрии на время-пролетном масс-спектрометре (Рис. 3.2.9).

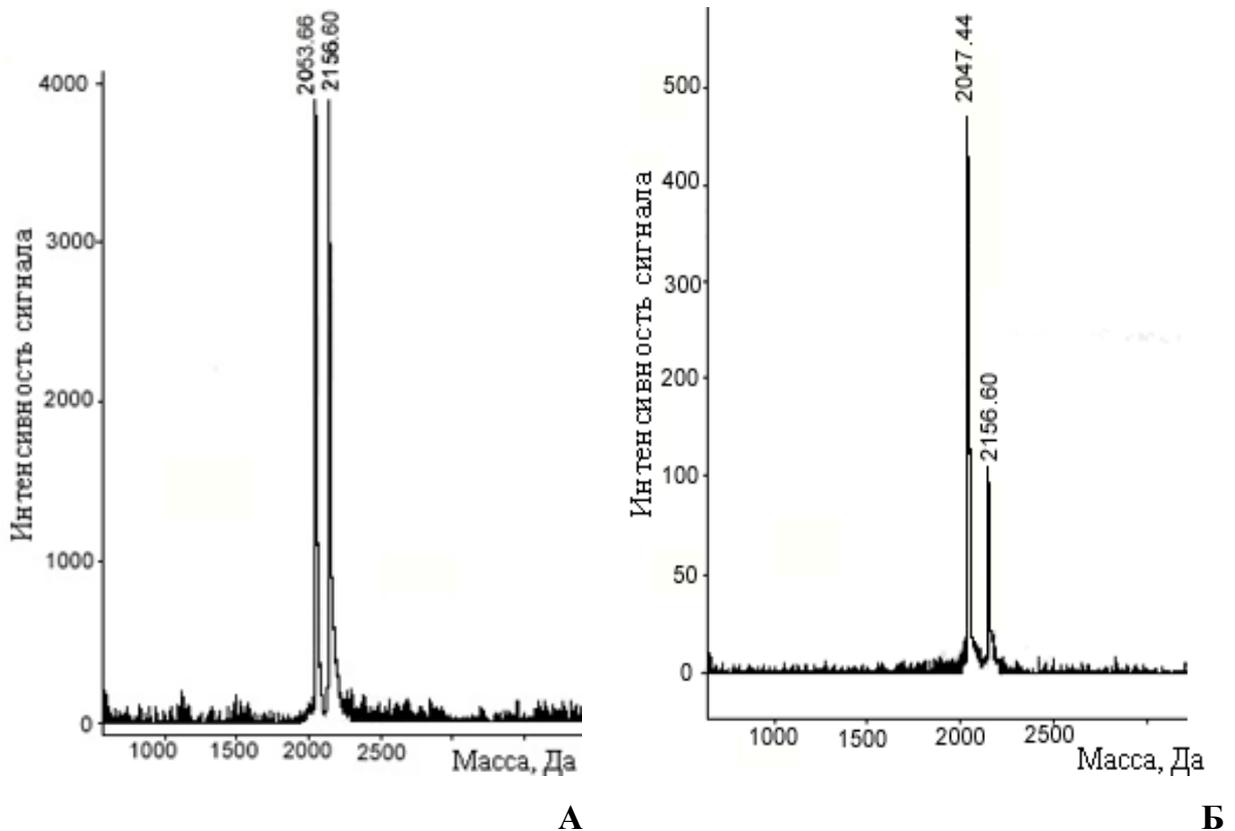


Рисунок 3.2.9 –Масс-спектры антимикробных пептидов гамадрила, представленных в виде однозарядных ионов. В качестве внутреннего стандарта использован протегрин-1 (для однозарядного иона – масса/заряд – 2156,6). А. Пептид А; Б. Пептид В.

Пептид А был получен в количестве 295 мкг, пептид В – 145 мкг.

Антимикробную активность полученных пептидов оценивали методом радиальной диффузии в агарозном геле, содержащем тестируемые микроорганизмы, как описано в разделе «Материалы и методы». При определении минимальных ингибирующих концентраций (МИК) использовались два варианта проведения опыта. В первом случае оценивали антимикробное действие пептидов в среде, содержащей только 0,01 М натрий-фосфатный буфер без добавления NaCl, во втором – в той же среде, но содержащей 0,1М NaCl. В качестве контроля использовали три хорошо изученных антимикробных пептида: протегрин-1 свиньи PG-1 (его антимикробная активность не снижается при добавлении 0,1М NaCl в среду) и α -дефенсины человека HNP-1 и кролика NP-1 (их активность снижается при добавлении в среду 0,1М NaCl).

МИК изучаемых и контрольных пептидов в отношении четырех тестируемых микроорганизмов представлены в таблице 3.2.2.

Таблица 3.2.2 – Минимальные ингибирующие концентрации выделенных антимикробных пептидов (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	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl	без NaCl	0,1 М NaCl
Пептид А	1,5	2,0	1,6	1,7	2,5	3,6	1,6	6,5
Пептид В	1,7	2,2	1,5	1,9	1,7	4,5	1,4	7,4
RTD-1	1,8	1,9	1,4	1,6	2,1	2,0	1,7	3,9
PG-1	1,2	1,0	0,9	0,9	1,2	1,1	1,1	1,5
RHD1	1,6	3,5	1,3	1,8	3,8	>50	2,3	4,5
HNP-1	2,1	10,2	1,3	2,1	3,5	>50	3,2	>50

Обращает на себя внимание, что в присутствии повышенной концентрации NaCl выделенные пептиды А и В практически не снижают своей антибиотической активности против *E.coli* и *S.aureus*, что не характерно для α -дефенсинов, таких, например, как HNP-1 и выделенный нами RHD1. Такая особенность и малая молекулярная масса (около 2000 Да) делает их похожими на кателицидин из нейтрофилов свиньи PG-1 и θ -дефенсин из нейтрофилов макак-резуса RTD-1. В то же время невозможность определить аминокислотную последовательность методом деградации по Эдману позволила предположить, что выделенные пептиды А и В представляют собой θ -дефенсины. 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.

Аминокислотный состав пептидов, представленный в таблице 3.2.3, соответствует установленным молекулярным массам при условии наличия макроциклической структуры.

Таблица 3.2.3 – Аминокислотный состав антимикробных пептидов А и В

Аминокислота	Пептид А	Пептид В
Asx	0	0
Glx	0	0
Ser	0	0
Gly	2	2
His	0	0
Arg	5	4
Thr	1	2
Ala	0	0
Pro	0	0
Tyr	0	0
Val	3	2
Met	0	0
Ile	0	0
Leu	0	0
Phe	1	2
Lys	0	0
Cys	6	6
Trp	0	0

Таким образом, выделенные пептиды А и В представляют собой макроциклические структуры, состоящие из 18 аминокислотных остатков, содержащие три дисульфидных внутримолекулярных связи, что является характерным признаком θ -дефенсинов, и что дает нам основание назвать выделенный пептид А – PhTD-1 (*Papio hamadryas theta-defensin*), а пептид В – PhTD-3, по аналогии и сходству аминокислотного состава с θ -дефенсинами из лейкоцитов макак-резуса RTD-1 и RTD-3 (*Rhesus theta-defensin*). Изоформа PhTD-2, по-видимому, присутствует в лейкоцитах *Papio hamadryas* в следовых количествах, недостаточных для проведения структурного анализа. Можно отметить, что содержание RTD-2 в лейкоцитах макак-резуса также гораздо меньше, чем RTD-1 и RTD-3.

Аминокислотные последовательности PhTD-1 и PhTD-3 (Рис. 3.2.10) были определены методом масс-спектрометрии фрагментов, полученных энзиматическим гидролизом с помощью тандемного масс-спектрометра MALDI-TOF/TOF MS в ходе совместной работы с лабораторией профессора Р. Хоффманна института Биоаналитической химии Лейпцигского университета (Германия).

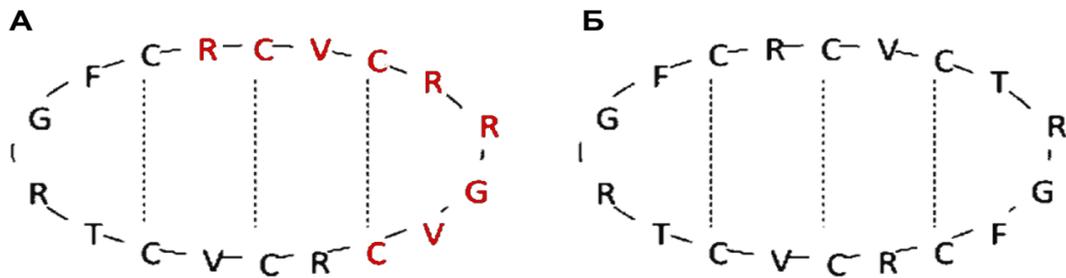


Рисунок 3.2.10 – Аминокислотные последовательности θ -дефенсинов, выделенных из лейкоцитов гамадрила. А – PhTD-1; Б – PhTD-3. Паттерн дисульфидных связей выбран по аналогии с θ -дефенсинами макак-резуса.

Американскими исследователями выявлены несколько изоформ θ -дефенсинов в лейкоцитах зеленого павиана *Papio anubis* [García et al., 2008], две из которых (BTD-1 и BTD-3) оказались структурно идентичными θ -дефенсинам из лейкоцитов *Papio hamadryas* (PhTD-1 и PhTD-3), что можно рассматривать в качестве факта, дополнительно подтверждающего эволюционную близость этих двух видов обезьян рода *Papio*.

Анализ структуры генов θ -дефенсинов (DEFT) позволяет заключить, что в эволюции млекопитающих отряда приматов эти гены произошли от генов α -дефенсинов. Таким образом, в эволюции позвоночных первичными были скорее всего гены β -дефенсинов, характерных для кур [Harwig et al., 1994], болотной черепахи [Stegeman et al., 2009], которые во многом родственны генам дефенсинов насекомых и других беспозвоночных. Только у млекопитающих, наряду с генами β -дефенсинов, впервые появились гены α -дефенсинов (человек, кролик, мышь и т.д.). Последние в свою очередь дали начало генам θ -дефенсинов, которые встречаются только в отряде приматов. Если у узконосых обезьян семейства Мартышковые (макак-резус, гамадрил, бабуин) эти гены экспрессированы на уровне белково-пептидных продуктов, то у человека и человекообразных обезьян (шимпанзе, горилла) также выявлены гены θ -дефенсинов (DEFT), экспрессия которых осуществляется только на уровне транскрипции, но не трансляции, так как эти гены в силу определенной мутации имеют стоп кодон в последовательности ДНК и мРНК, ответственной за синтез сигнального пептида [Cole et al., 2004].

Могут ли какие-либо человеческие группы из 7 миллиардов людей в мире сохранить немутированные гены DEFT? Вместо непосредственного тестирования этого

было проведено сравнительное популяционное и молекулярно-генетическое исследование [Nguyen et al., 2003], которое показало, что все люди и их ближайшие родственники – человекообразные обезьяны (шимпанзе, гориллы) имели гены θ -дефенсина с наличием стоп-кодона в сигнальной последовательности. У орангутана шесть генов DEFT были целы, и один был дефектным. Только несколько неповрежденных генов DEFT были обнаружены у некоторых обезьян Старого Света и у гибона (*Hylobates syndactylus*). Гены DEFT не были обнаружены в ДНК шести обезьян Нового Света и пяти полуобезьян. Это свидетельствует о том, что гены DEFT и θ -дефенсины возникли у обезьян Старого Света и что неповрежденные гены существовали в нашей собственной линии до тех пор, пока они не разошлись с орангутанами около 7,5 миллионов лет назад. Эти соображения делают маловероятным, чтобы какие-либо человеческие популяции экспрессировали θ -дефенсины спонтанно [Nguyen et al., 2003].

Однако клетки человека могут экспрессировать θ -дефенсины при культивировании с аминокликозидом, присутствие которого позволяет аппарату трансляции обходить преждевременный стоп-кодон [Venkataraman et al., 2009]. Когда промиелоцитарные клетки человека или клетки ткани влагалища подвергались такой обработке *in vitro*, они продуцировали интактный θ -дефенсин, показывая, что доступны стадии обрезки и сплайсинга, необходимые для получения θ -дефенсинов [Venkataraman et al., 2009]. Стоит отметить, что транскрипты мРНК θ -дефенсина обнаружены в костном мозге и селезенке человека, а также в меньшем количестве в тимусе, яичке и скелетных мышцах [Nguyen et al., 2003]. В то время как анализ экспрессии RTD-1 в тканях макак-резуса выявил наличие транскриптов только в костном мозге [Nguyen et al., 2003].

3.3 Антибиотические пептиды из целоцитов пескожила

Эволюционная систематизация и оценка структурной гомологии антимикробных пептидов различных видов животных представляют значительный научный интерес и хотя известна структура (полная или частичная) уже более 1000 антимикробных пептидов (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) представители многих таксонов животных до настоящего времени остаются за рамками исследований. В частности, слабо

исследованным в этом отношении является ключевой в эволюционном плане тип кольчатые черви (Annelida). По современным представлениям от древних кольчатых червей произошли два крупных типа животных: членистоногие и моллюски. Эти таксоны достигли биологического прогресса, несмотря на отсутствие у них механизмов приобретенного (адаптивного) иммунитета. Поэтому в качестве объекта исследования нами был выбран морской кольчатый червь пескожил *Arenicola marina*, обитающий в прибрежных водах Белого моря и принадлежащий к семейству Arenicolidae, отряду Drilomorpha, классу Polychaeta, типу Annelida.

Забор материала для исследований проводился на базе биостанции СПбГУ на Белом море. Из животных получали целомическую жидкость, целомоциты отделяли центрифугированием при 100 g в течении 10 минут. Экстракцию белков и пептидов из целомоцитов проводили 10% раствором уксусной кислоты.

3.3.1 Анализ кислотного экстракта из целомоцитов пескожила и выделение из него индивидуальных фракций антимикробных пептидов

Препарат, полученный в результате кислотной экстракции, анализировали с помощью диск-электрофореза в ПААГ в присутствии ДСН и электрофореза в ПААГ в кислой среде в присутствии мочевины (Рис. 3.3.1, 3.3.2), который позволяет разделять белки не только по массе, но и по заряду, с последующим антимикробным тестированием методом наложения геля против культур грам-отрицательной бактерии *E.coli* и грам-положительной бактерии *L. monocytogenes* (Рис. 3.3.3). В случае если препарат содержит микробицидные компоненты, на ковче микроорганизма в агаре обнаруживаются пятна лизиса на уровне, соответствующем полосе в ПААГ.

Оказалось, что экстракт содержит ряд компонентов с молекулярной массой от 3,5 до 17 кДа (рис. 3.3.1), т. е. присутствуют интересующие нас низкомолекулярные белки с молекулярной массой меньше 10 кДа и положительно заряженные фракции по уровню заряда соответствующие дефенсинам кролика, одним из самых сильных пептидных антибиотиков. Мажорная полоса на уровне дефенсина кролика NP-4 проявляет существенную активность в отношении двух микроорганизмов. Таким образом, предварительный анализ подтвердил наши предположения о наличии в целомоцитах пескожила антимикробных пептидов, что в полной мере соответствует роли этих клеток

в обеспечении защитных реакций организма аннелид, в частности, фагоцитоза и заживления ран [Stein, Cooper, 1983].

Параллельно был проведен скрининг уксуснокислых экстрактов различных органов и тканей животного (кишечника, покровного эпителия, железистых образований в ротовой области, подкисленной бесклеточной целомической жидкости) на предмет обнаружения в них антимикробных пептидов, однако тестирование дало отрицательные результаты и основным объектом исследования остались целоמוциты.

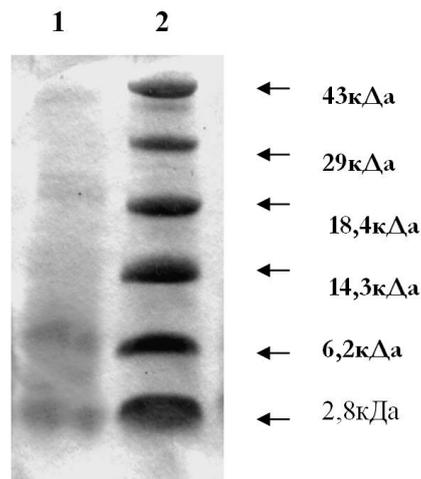


Рисунок 3.3.1 – Электрофореграмма белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Гели окрашены красителем Кумасси G-250
1 – уксуснокислый экстракт целоמוцитов пескожила; 2 – смесь маркерных белков

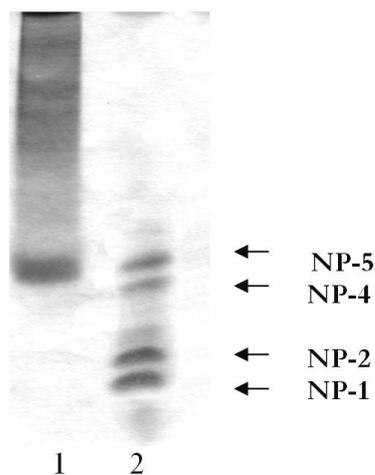


Рисунок 3.3.2 – Электрофореграмма белков в полиакриламидном геле в присутствии уксусной кислоты и мочевины. Гели окрашены красителем Кумасси G-250
1 – уксуснокислый экстракт целоמוцитов пескожила; 2 – смесь маркерных белков

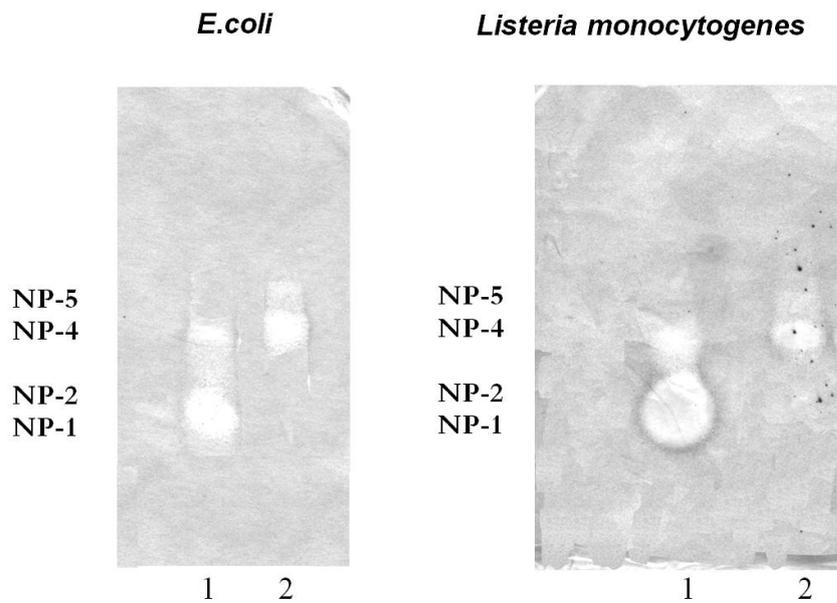


Рисунок 3.3.3 – Тестирование экстрактов целоцитов пескожила для выявления антимикробных компонентов методом наложения геля

1 – смесь дефенсинов кролика; 2 – уксуснокислый экстракт целоцитов

Чтобы избавиться от высокомолекулярных компонентов, экстракт был подвергнут ультрафильтрации через фильтр РМ-10 "Amicon". Раствор, прошедший через ультрамембрану (ультрафильтрат) содержал молекулы с молекулярной массой не более 10кДа.

Ультрафильтрат был сконцентрирован и подвергнут препаративному электрофорезу (этот метод был выбран исходя из электрофореграммы экстракта в кислой среде, наше внимание привлекла мажорная полоса на уровне дефенсина кролика NP-4, судя по антимикробному тесту содержащая микробицидные компоненты).

Полученные фракции анализировали, измеряли поглощение раствора белка при 280 нм, изучали антимикробную активность фракций в отношении трех микроорганизмов – грамотрицательной *E.coli*, грамположительной *L.monocytogenes* и грибка рода *Candida*. Было выявлено несколько пиков антимикробной активности, параллельно фракции анализировали с помощью электрофореза в ПААГ в кислой среде и в присутствии ДСН.

Как наиболее перспективные были выбраны фракции с 25 по 35, демонстрирующие значительную антимикробную активность в отношении трех

микроорганизмов и имеющие достаточно однородные физико-химические характеристики. Они обладают почти одинаковой подвижностью в ПААГ в кислой среде и все содержат мажорный компонент с молекулярной массой 3 кДа.

Фракции 25-35 объединили и подвергли ОФ ВЭЖХ на колонке Vydac C₄ 450мм X 4,6мм, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-60% за 60 мин., 0,1% ТФУ). Для дополнительной очистки была произведена повторная рехроматография пептидов, вышедших в двух основных пиках, в растянутом по сравнению с предыдущим градиенте ацетонитрила (15-30% за 30 мин.). На итоговой хроматограмме присутствуют два четких пика, которые мы назвали ареницин 1 и ареницин 2, выходящие при разной концентрации ацетонитрила 29% и 31% соответственно и, следовательно, различающиеся по гидрофобности (рис. 3.3.4).

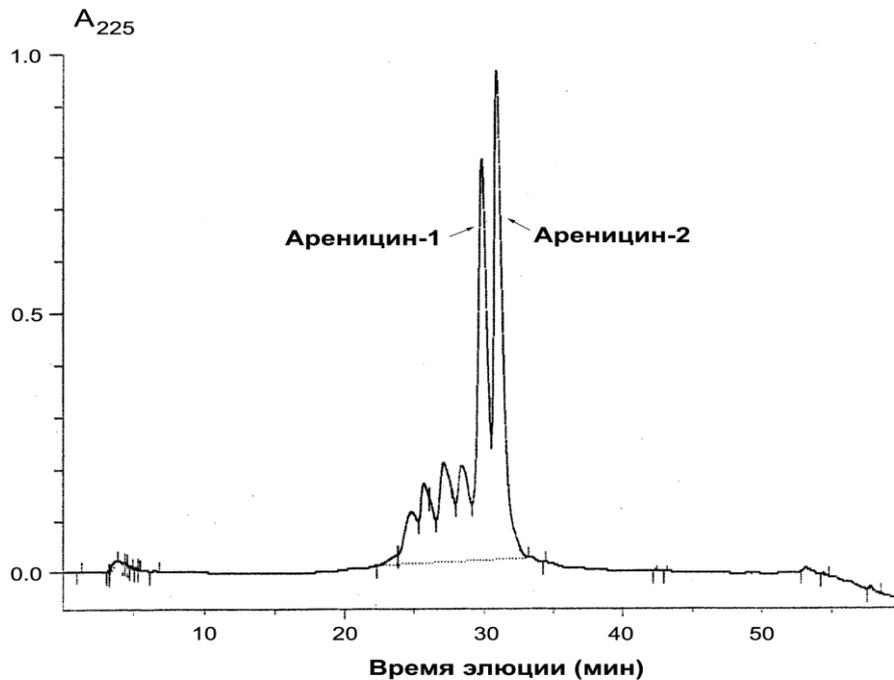


Рисунок 3.3.4 – Профиль элюции выделенных антимикробных пептидов при очистке методом ОФ ВЭЖХ на колонке Vydac C₄ 450мм X 4,6мм, в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0-60% за 60 мин, 0,1% ТФУ)

Чистоту препаратов оценивали с помощью электрофореза в ПААГ в двух системах, в присутствии ДСН и в кислой среде в присутствии мочевины (рис. 3.3.5, 3.3.6). Из 1 г клеток было получено приблизительно по 50 мкг ареницинов.

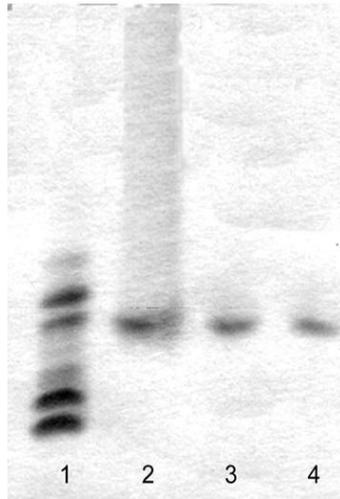


Рисунок 3.3.5 – Электрофореграмма пептидов в полиакриламидном геле в присутствии уксусной кислоты и мочевины. Гели окрашены красителем Кумасси G-250
1 – дефенсины кролика, 2 – экстракт из целоцитов, 3 – ареницин-1, 4 – ареницин-2

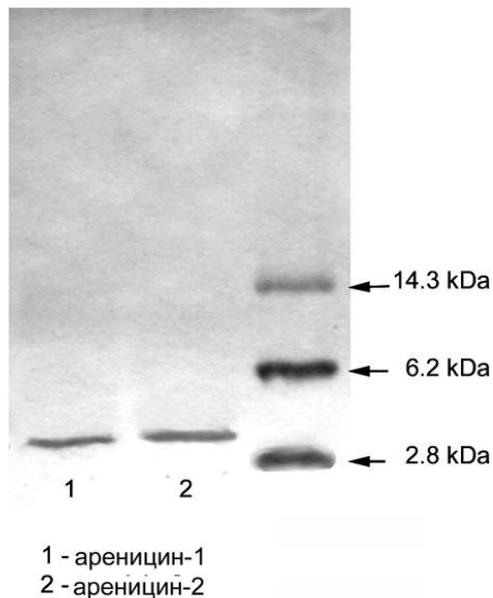


Рисунок 3.3.6 – Электрофореграмма пептидов (по 1 мкг каждого пептида) в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Гели окрашены красителем Кумасси G-250

На электрофореграммах видно, что фракции представлены одной мажорной полосой с молекулярной массой около 3 кДа и по степени катионности находятся на уровне дефенсина кролика NP-4.

3.3.2 Антимикробная активность выделенных пептидов

Антимикробную активность очищенных пептидов оценивали методом радиальной диффузии пептидов в агарозном геле с культурой микроорганизма, метод позволяет достаточно точно количественно оценивать микробицидную активность, расходуя при этом минимальное количество препарата. Для сравнения использовали протегрин-1, один из самых сильных известных пептидных антибиотиков.

Оба ареницина демонстрировали активность против грам-положительной бактерии *L. monocytogenes*, штамм EGD (Рис. 3.3.7.А), грам-отрицательной бактерии *E. coli*, штамм ML-35p (Рис. 3.3.7.В) и дрожжеподобного гриба *C. albicans*, штамм 820 (Рис. 3.3.7.С). Антимикробная активность ареницинов была абсолютно одинакова во всех тестах. При концентрации выше 25 мкг/мл оба пептида ингибируют рост микроорганизмов с такой же эффективностью, как протегрин-1. В условия низкой концентрации соли ареницины и протегрин-1 проявляют приблизительно одинаковую активность против *L. monocytogenes* (МИК 0,6 и 0,8 мкг/мл соответственно, но ареницины менее активны против *E. coli* (МИК 4 мкг/мл) и *C. albicans* (4,5 мкг/мл), чем протегрин-1 (МИК 0,7 и 0,8 мкг/мл соответственно). Присутствие 100 мМ NaCl не влияет на активность ареницинов против *E. coli* и активности протегрина-1 против всех тест-микроорганизмов. Активность ареницинов против *C. albicans* резко уменьшалась в присутствии повышенной концентрации соли (МИК 20 мкг/мл), а против *L. monocytogenes* немного увеличивалась (МИК 0,4 мкг/мл).

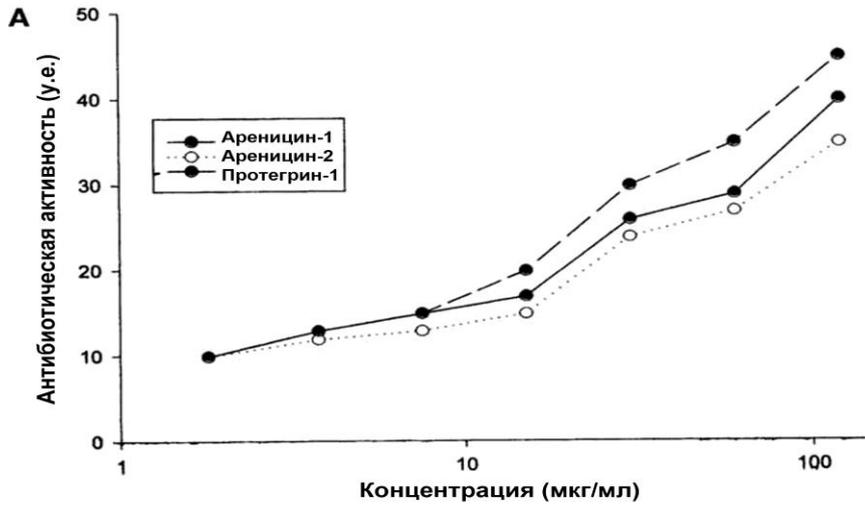
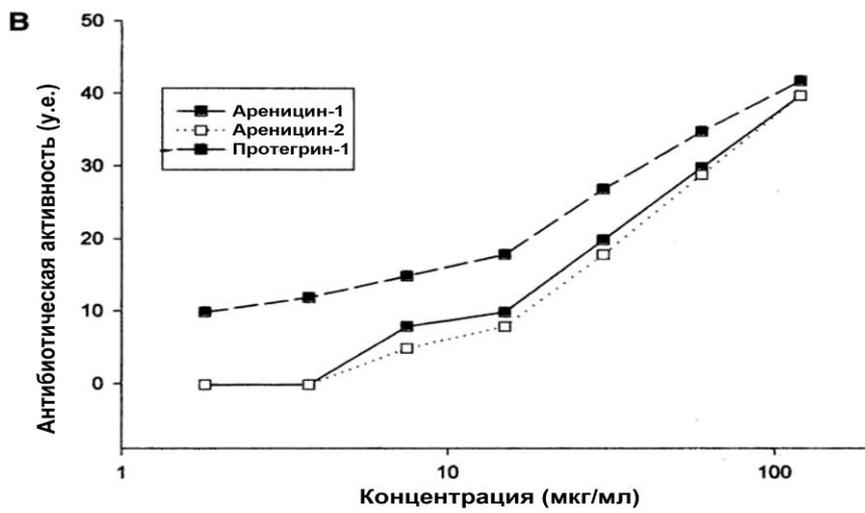
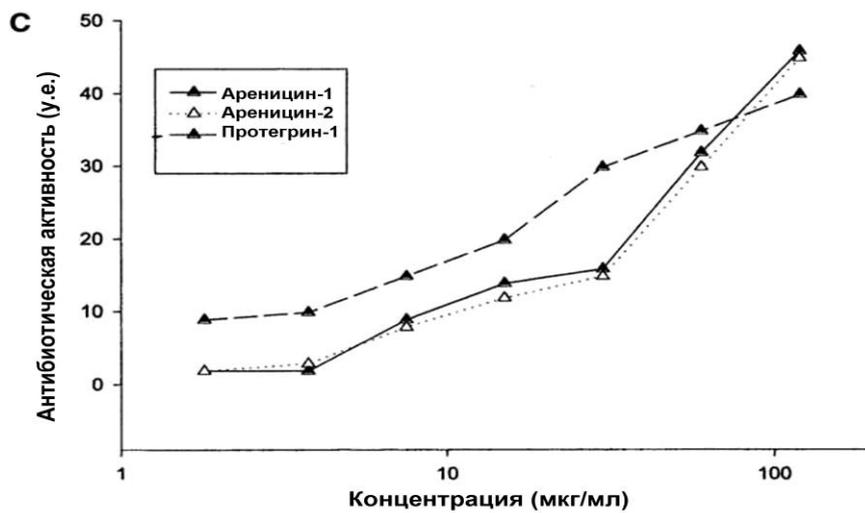
Listeria monocytogenes, EGD*E. coli* ML-35p*Candida albicans*

Рисунок 3.3.7 – Антибиотическая активность ареницинов против (А) *L. monocytogenes*; (В) *E. coli* и (С) *C. albicans* (0,01 М Na-фосфатный буфер, рН 7,4)

3.3.3 Молекулярная масса ареницинов

Для определения молекулярной массы ареницинов использовали MALDI масс-спектрометрический анализ на приборе VISION 2000 (ThermoBioAnalysis, ОК). В качестве матрицы использовали 0,15М 2,5-дигидроксibenзойную кислоту в смеси, содержащей 25% метанол и 0,1% трифторуксусную кислоту. Образец облучали УФ-лазером с длиной волны 337 нм и максимальной энергией 250 мкДж в импульсном режиме с частотой 3 нс. При масс-спектрометрическом исследовании первого пептида был получен пик с m/z 2758,1, соответствующий молекулярному иону M^+ ареницина-1. При масс-спектрометрическом исследовании второго пептида был получен пик с m/z 2772,3, соответствующий молекулярному иону M^+ ареницина-2.

Восстановление 10-кратным молярным избытком дитиотреитола с последующим алкилированием 5-кратным молярным избытком 4-винилпиридина под аргоном при комнатной температуре в течение 2 часов выявило молекулярные ионы с m/z 2969,7 для пиридинэтилированного ареницина-1 и m/z 2983,0 для пиридинэтилированного ареницина-2, что соответствует возрастанию молекулярной массы каждого пептида на 210 Да после модификации. Это свидетельствует о наличии в каждом пептиде двух остатков цистеина, образующих одну дисульфидную связь.

3.3.4 Первичная структура ареницинов

Для определения N-концевой аминокислотной последовательности выделенных пептидов применяли автоматическое микросеквенирование на приборе Procise 491 cLC Protein Sequencing System. В результате микросеквенирования выделенных пептидов были установлены их N-концевые аминокислотные последовательности:

Ареницин-1

Arg¹-Trp²-PECys³-Val⁴-Tyr⁵-Ala⁶-Tyr⁷-Val⁸-Arg⁹-Ile¹⁰-Arg¹¹-Gly¹²-Val¹³-Leu¹⁴-Val¹⁵-Arg¹⁶-Tyr¹⁷-Arg¹⁸-Arg¹⁹-PECys²⁰-X²¹

Ареницин-2

Arg¹-Trp²-PECys³-Val⁴-Tyr⁵-Ala⁶-Tyr⁷-Val⁸-Arg⁹-Val¹⁰-Arg¹¹-Gly¹²-Val¹³-Leu¹⁴-Val¹⁵-Arg¹⁶-Tyr¹⁷-Arg¹⁸-Arg¹⁹-PECys²⁰-X²¹,

где PECys – пиридинэтилцистеин

Таким образом, была установлена частичная (95%) аминокислотная последовательность за исключением последнего аминокислотного остатка для каждого из выделенных пептидов. Для установления полной первичной структуры с помощью колонок Spin (Promega, США) была выделена суммарная РНК из целоцитов *Arenicola marina*. Определение структуры генов, кодирующих ареницины, проводилось путем обратной транскрипции и амплификации, которую проводили с помощью набора реактивов SMART* RACE** cDNA Amplification Kit (глава «Материалы и методы», раздел 2.9.1).

Структура ген-специфических праймеров для амплификации была выбрана, исходя из известной аминокислотной последовательности каждого пептида. Электрофорез продуктов ПЦР, полученных с разными ген-специфическими праймерами, показал, что преимущественно амплифицировался фрагмент размером около 600 н.п. Фрагмент элюировали из геля и использовали в лигазной реакции с плазмидным вектором для клонирования продуктов ПЦР. Шесть клонов были отобраны для выделения плазмидной ДНК и секвенирования.

В результате секвенирования по методу Сэнгера стала известна последовательность 3'-конца кДНК, на основании структуры которой были синтезированы праймеры для амплификации 5'-концевой области. В результате была определена полная первичная структура кДНК (рис. 3.3.8) и соответствующие аминокислотные последовательности (рис. 3.3.9). Обе последовательности (GenBank Accession Nos.: AY684856, AY684857) содержат 609 нуклеотидных пар, кодирующих предшественник пептидов, состоящий из 202 аминокислотных остатков. Кроме замены Val/Le в активном пептиде, имеют место еще 12 нуклеотидных замен, приводящих к 6 заменам аминокислотных остатков в прекурсоре (Рис. 3.3.9). Поиск в программе BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) по аминокислотным и нуклеотидным последовательностям не выявил сходства с уже известными последовательностями.

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

1	GAGAGATCCA GGCAGATCCC GATACGTCAA CGCTGAGCAG TTTTCAGAGAA GTCTCCATAG AGTCTCTGGA TAGCCAGTGA
81	TCCTTGCGGT CTCCCACCAA GTTGCCAAAC TTGACAGCAA GCCCAGAAGA CGCATAGGCC GAGATAGTTG TGATCAACCA
	↓ M T S T Q S V A V C A T L I L A I F C V N D I H
161	ACTGCATTAT GACGAGTACG CAGTCCGTTG CGGTGTGTGC CACACTAATC CTGGCCATTT TCTGCGTTAA CGACATCCAT
	↓ C D P I A E A R A A A F G E R E A R S D G E W K Q F D
241	TGTGACCCGA TCCTGAAGC GAGGGCCGCA GCCTTTGGTG AGCGAGAGGC GAGATCGGAT GGAGAATGGA AGCAATTTGA
	↓ D V N G E K I E V N E Q E N R E I I R Q A G G D G V E G
321	CGTTAACGGC GAGAAGATTG AGGTAAACGA GCAGGAAAAC CGCGAGATCA TCAGACAGGC GGGAGGAGAC GGCCTCGAGG
	↓ G S V M V I D H A K G L I S V S I P R A G E C Y L I G
401	GATCTGTTCAT GGTGATCGAC CACGCTAAGG GTCTGATCAG CTGGTCTATC CCGCGTGTCTG GGGAGTGCTA CCTGATCGGA
	↓ G V D K Q L P D A Q E L L H Y F Q S A Q G S A D G E G
481	GGGGTGGACA AACAGCTGCC GGATGCCAG GAACTCCTGC ACTATTTCCA GTCAGCTCAG GGCTCGGCCG ATGGTGAGGG
	↓ G V E S A L D Y V K A E D R P V T D L N L L A P E V R E
561	GGTTGAAAGC GCTCTGGACT ACGTGAAGGC TGAGGACCGC CAGTGACCG ACCTGAACCT CCTGGCCCCC GAGGTGCGAG
	↓ E A C Q G K S V Y V L E K S S G D N N E P E K R R V C
641	AGGCCTGCCA GGGCAAATCA GTGTACTGGC TGGAGAAGAG CTCTGGTGAC AACATGAGC CGGAAAAAAG ACGCTGGTGC
	↓ V Y A Y V R V R G V L V R Y R R C V
721	GTCTACGCAT ACGTCAGGGT CCGAGGTGTG TTGGTGCCTT ACCGAAGGTG TTGGTAGGAA AGCCAGACCC CGACGGCAGC
801	CAGACCCCGA CGGTAGCCAG ACCCCGACGG CAGCCAGACC CCGACGACAT CCACTTTCAC GGCATCCACT GTCAGGGCAT
881	CTACTGTCAC GGCATCCACT GTCACGGCAT CCACTGTCAC GGCATCCACT GTCACGGCAT CTACTGTCAC GGCATCCACT
961	GTCACGGCAT CCACTGTCAC GGCATCCACT GAGAACCAC GATTCTGCAG CCCTCAGAGT GTGACCATTT TGAAATGGGA
	***** #3 5'RACE primer ***** #4 5'RACE primer
1041	TCAATGACAT TTTTACTTTT CAAGTATTAT TCAAAAATGT GATTGTTTTG AACAAATACA AATTTAGTCA ACGAAGTTGT
	***** #4 5'RACE primer *****
1121	CTGTACACTT TCGGTAGAAA GCACGTAATA STATCCGCGG TTATCCACT ACCTAGCTTA GATATTCACA ACTTCAAGCC
1201	AGACACCTTG GTCATGGAAT TATGTGGCA TAAAGAAAAC TTTTATAAAT ACAAATAAAA AAAAAA

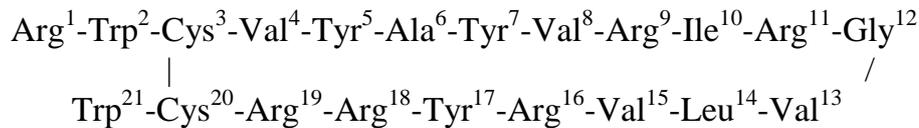
Рисунок 3.3.8 – Нуклеотидная последовательность кДНК препроареницина-1 и соответствующая аминокислотная последовательность. Последовательность активного пептиды выделена черным цветом

	1	50
Препроареницин-1	MTSTQSVAVCATLILAI FCVNDIHC DP IAEARAAAFGEREARS DGEWKQF	
Препроареницин-2	MTSTQSVAVYATLILAI FCFNDIHC DP IAEARAAAFGEREARS SAGEWKQF	
	51	100
Препроареницин-1	DVNGEKIEVNEQENREI I RQAGGDGVEGSVMVIDHAKGLI SWSIPRAGEC	
Препроареницин-2	DVNGEKVEVNEQENREI I RQAGGDGVEGSVMVIDHAKGLI IWSIPRAGEC	
	101	150
Препроареницин-1	YLIGGVDKQLPDAQELLHYFQSAQGSADGEGVESALDYVKAEDRPVTDLN	
Препроареницин-2	YLIGGVDKQLPDAQELLHYFRSAQGSADGEGVQSALDYVKAEDRPVTDLN	
	151	202
Препроареницин-1	LLAPEVREACQGKSVYWLEKSSGDNNEPEKRRWC VYAYVRI RGVLRVYRRCW	
Препроареницин-2	LLAPEVREACQGKSVYWLEKSSGDNNEPEKRRWC VYAYVRI RGVLRVYRRCW	

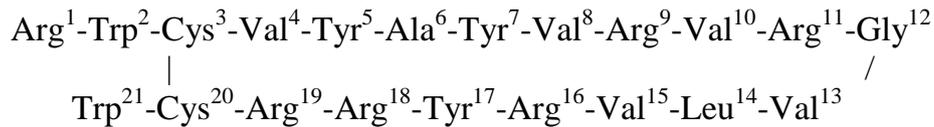
Рисунок 3.3.9 – Различия в последовательности прекурсоров ареницинов. Сигнальный пептид выделен темно-серым цветом, прочая часть – светло-серым, активный пептид – черным

Таким образом, показано, что обнаруженные антимикробные пептиды имеют следующие аминокислотные последовательности и дисульфидные связи:

Ареницин-1:



Ареницин-2:



В литературе описано несколько пептидов, содержащих одну дисульфидную связь, в основном это пептиды, выделенные из кожи лягушек – бревенины [Morikawa et al., 1992], эскулентины [Simmaco et al., 1993], раналексины [Clark et al., 1994], гаегурины [Park et al., 1994], нигроцины [Park et al., 2001], есть гомологичный им пептид танатин, выделенный из гемолимфы насекомого *Podisus maculiventris* [Fehlbaum et al., 1996], однако между ними и выделенными нами пептидами имеются существенные различия в характере замыкания дисульфидной связи. У бревенин-подобных молекул и танатина дисульфидная связь локализована на С-конце молекулы и пространственная структура, представлена в виде замкнутого кольца из 6-8 аминокислотных остатков и длинного N-терминального хвоста. По кольцевой структуре пептиды из целомоцитов пескожила ближе всего к т.н. циклическому додекапептиду из нейтрофилов быка (небольшой замкнутой в кольцо молекуле с сильными антимикробными свойствами, состоящей всего из 12 аминокислот) [Romeo et al., 1988] и тригеринам, состоящим из 11-12 аминокислот и образующих нанопептидное кольцо [Sai et al., 2001], но по остальным характеристикам (молекулярная масса, аминокислотный состав) они сильно отличаются.

Если сравнивать с антимикробными пептидами, выделенными из других представителей аннелид, то мы также увидим значительные структурные различия.

Антимикробный пептид люмбрицин (7 кДа), выделенный из червя *Lumbricus rubellus* и проявляющий активность как против грам-положительных, так и грам-отрицательных бактерий, является линейным пролин-богатым пептидом [Cho et al., 1998]. Его локализация была выявлена в поверхностной слизи и наружном эпителии. Локализация в целомоцитах остается под вопросом, так как они не были исследованы.

Видимо, люмбрицин характерен для олигохет, т.к. его гомологи были обнаружены также у других представителей этой группы *Pheretima tschiliensis* [Wang et al., 2003] и *Pheretima guillelmi* (Michaelson) [Li et al., 2011].

Из пиявки *Theromyzon tessulatum* выделены пептиды теромацин и теромизин [Tasiemski et al., 2004]. Теромацин на 74 остатка аминокислот содержит 10 остатков цистеина, а теромизин является линейным пептидом и анионным, что не характерно для антимикробных пептидов животного происхождения. Из пиявки *Hirudo medicinalis* также выделены два антимикробных пептида, один из которых цистеин-богатый (8 остатков цистеина) нейромацин и линейный люмбрицин-подобный пептид Нм-люмбрицин [Schikorski et al., 2008].

Стоит отметить, что для теромицина и нейромацина установлено наличие нейропротективной активности наряду с антимикробной [Jung et al., 2012].

Кроме выделенных нами ареницинов из полихет получен еще один антимикробный пептид перинерин (FNKLLKQGSSK RTCAKCFRKI MPSVHELDER RRGANRWAAG FRKCVSSICRY) из *Perinereis aibuhitensis* Grube [Pan et al., 2004]. Пинерин содержит 51 аминокислотный остаток, две дисульфидные связи.

Таким образом, можно говорить, что ареницины, содержащие 21 аминокислотный остаток и образующие большое кольцо из 18 аминокислотных принадлежат к новому структурному семейству антимикробных пептидов.

Низкий молекулярный вес в сочетании с широким спектром антимикробного действия и эффективностью повреждающего воздействия на клетки микроорганизмов, в том числе грибов, низкой гемолитической активностью [Краснодембская, 2007] делают эти молекулы перспективными объектами для дальнейшего химического синтеза и применения в медицине и ветеринарии.

3.4 Разработка иммуноферментных тест-систем для количественного определения пептидов и белков нейтрофильных гранулоцитов

Антимикробные пептиды и белки человека и животных (дефенсины, кателицидины, миелопероксидаза, лактоферрин), одним из основных источников которых являются нейтрофильные гранулоциты, представляют собой ключевые молекулярные факторы врожденного иммунитета.

Для исследования роли эндогенных дефенсинов и белков, секретируемых нейтрофильными гранулоцитами при различных неблагоприятных воздействиях на организм, в развитии патофизиологических процессов в клинике и на экспериментальных моделях необходимо иметь возможность количественного определения этих молекул в биологических жидкостях. В то время, когда мы начинали свою работу, коммерческие фирмы не предлагали необходимые тест-системы для определения миелопероксидазы (МПО) человека и α -дефенсинов нейтрофилов крыс – одного из самых распространенных лабораторных животных.

Нами были разработана и оптимизированы иммуноферментные тест-системы для количественного выявления в биологических жидкостях α -дефенсина крысы RatNP-3, а также МПО и лактоферрина (ЛФ) человека.

3.4.1 Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов крыс

Выделение дефенсинов крысы проводили по стандартной схеме, ранее применяемой нами для выделения дефенсинов из других видов животных (раздел 2.2 в главе "Материалы и методы"). В качестве исходного материала использовали лейкоциты перитонеального экссудата крыс, который инициировали внутрибрюшинным введением 0,5% крахмала в 0,85 % NaCl. Дефенсин RatNP-3 был получен в количестве достаточном для разработки иммуноферментной тест-системы.

Связывание дефенсинов с цианоген бромид-активированной агарозой фирмы проводили согласно протоколу, приложенному к матрице (раздел 2.17.2.1. в главе "Материалы и методы"). Часть полученных специфических иммуноглобулинов конъюгировали с пероксидазой хрена (раздел 2.17.3 в главе "Материалы и методы"), оставшиеся использовались в качестве первичных антител в иммуноферментной тест-системе.

Концентрацию дефенсина RatNP-3 в биологических жидкостях определяли твердофазным иммуноферментным анализом методом «сэндвича» (раздел 2.17.5 в главе "Материалы и методы").

Полученная система имеет чувствительность 0,1 нг/мл и диапазон измерений 0,1–8 нг/мл. Данная тест-система выявляет также дефенсин RatNP-2 (с эффективностью 3% от значений для RatNP-3), и не выявляет RatNP-1 и RatNP-4.

В интервале концентраций от 0 до 2 нг/мл зависимость оптической плотности от концентрации пептида имеет линейный характер (рис. 3.4.1).

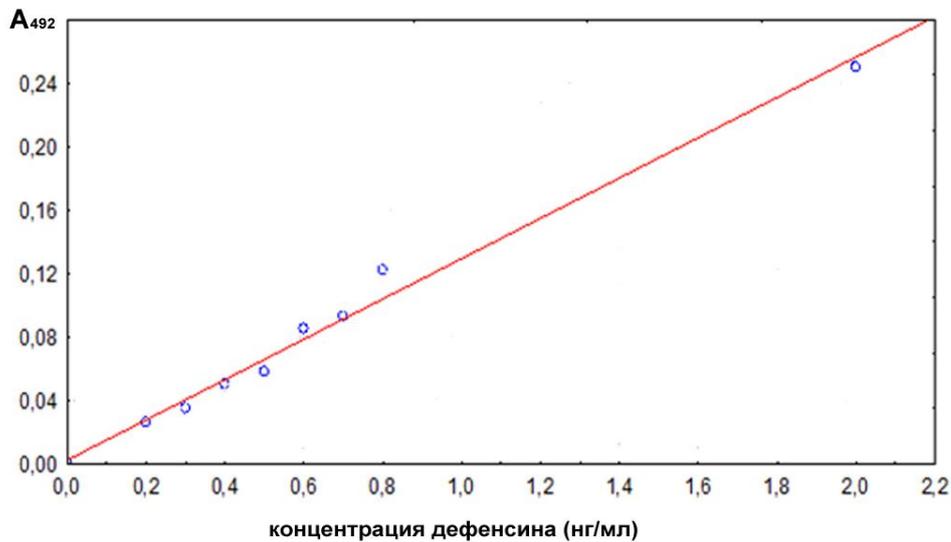


Рисунок 3.4.1 – Калибровочный график для определения концентрации дефенсина RatNP-3

Установлено что средняя концентрация дефенсина RatNP-3 в плазме крови у интактных животных составляет 36 ± 6 нг/мл (среднее \pm ошибка среднего). Такая концентрация сравнима с концентрацией дефенсинов человека в плазме крови – 42 ± 53 нг/мл (среднее \pm стандартное отклонение) [Panyutich et al., 1993].

Была проведена проверка тест-системы на корректность определения дефенсина в плазме крысы. В разведенную в 100 раз плазму добавляли заранее известное количество дефенсина RatNP-3. Наблюдаемые и ожидаемые значения концентраций дефенсина в плазме крови при добавлении известного количества дефенсина достоверно не отличаются (Табл. 3.4.1).

Таблица 3.4.1 – Наблюдаемые и ожидаемые концентрации дефенсина RNP-3 в пробах при добавлении известного количества дефенсина.

	Дефенсин добавлен до концентрации	A_{492}	Концентрация дефенсина наблюдаемая, нг/мл	Концентрация дефенсина ожидаемая, нг/мл
Проба 1		0,061	0,47	
Проба 2		0,056	0,44	
Проба 3		0,069	0,52	
Проба 1	0,2 нг/мл	0,093	0,72	0,67
Проба 2	0,2 нг/мл	0,088	0,68	0,64
Проба 3	0,2 нг/мл	0,101	0,78	0,72
Проба 1	0,8 нг/мл	0,164	1,28	1,27
Проба 2	0,8 нг/мл	0,156	1,22	1,24
Проба 3	0,8 нг/мл	0,170	1,33	1,32

Первая иммуноферментная тест-система для выявления дефенсинов в плазме крови была разработана А.В. Панютичем для дефенсинов из нейтрофилов человека на основе моноклональных антител к дефенсинам [Panyutich et al., 1991]. Система имела диапазон измерений 0,05-10 нг/мл. Особенности физико-химических свойств дефенсинов человека (прежде всего, высокая гидрофобность молекулы и сравнительно небольшой положительный заряд) заставили авторов отказаться от некоторых традиционных реагентов, используемых для иммуноферментного анализа. Так, например, ТВИН-20 был заменен на цетилтриметиламмоний бромид для того, чтобы избежать неспецифического связывания дефенсина с поверхностью планшета. Кроме того для корректных измерений требовалось разбавлять плазму крови не менее, чем в 1000 раз. Физико-химические свойства дефенсинов крысы позволили нам не изменять стандартную схему, которая ранее применялась нами для определения белков нейтрофилов человека» (раздел 2.17.5 в главе "Материалы и методы") [Ботерашвили и др., 2002].

В настоящее время биотехнологические фирмы (в частности, LifeSpan BioSciences и antibodies-online), производящие коммерческие наборы для количественного определения дефенсинов из нейтрофильных гранулоцитов предлагают такие наборы для определения дефенсина крысы RatNP-1. Наборы работают в диапазоне измерений 0,31–20 нг/мл, минимальная концентрация доступная для измерения – 0,31 нг/мл.

Таким образом, разработанная нами тест-система для выявления α -дефенсинов крысы в плазме крови имеет схожие характеристики с коммерческими наборами.

3.4.2 Разработка иммуноферментных тест-систем для количественного определения МПО и ЛФ из нейтрофильных гранулоцитов человека

Выделение МПО из лейкоцитов человека осуществляли по модифицированному методу Р. Дессера [Desser et al., 1972], который позволяет получить из лейкоцитов также и ЛФ [Кокряков и др. 1988] (глава «Материалы и методы», раздел 2.2.1).

Иммунные сыворотки к МПО и ЛФ получали иммунизированием кроликов по модифицированной схеме Призвански К. (раздел 2.17.1.2. в главе "Материалы и методы").

Для выделения специфических антител к МПО и ЛФ использовали аффинную хроматографию на колонках агарозы с "пришитыми" антигенами. Связывание белков с цианоген бромид-активированной агарозой фирмы проводили согласно протоколу, приложенному к матрице (раздел 2.17.2.1. в главе "Материалы и методы"). Часть полученных специфических иммуноглобулинов конъюгировали с пероксидазой хрена (раздел 2.17.3 в главе "Материалы и методы"), оставшиеся использовались в качестве первичных антител в иммуноферментных тест-системах.

Концентрацию МПО и ЛФ в биологических жидкостях определяли твердофазным иммуноферментным анализом методом «сэндвича» (раздел 2.17.5 в главе "Материалы и методы") с помощью калибровочных графиков (рис. 3.4.2 и 3.4.3).

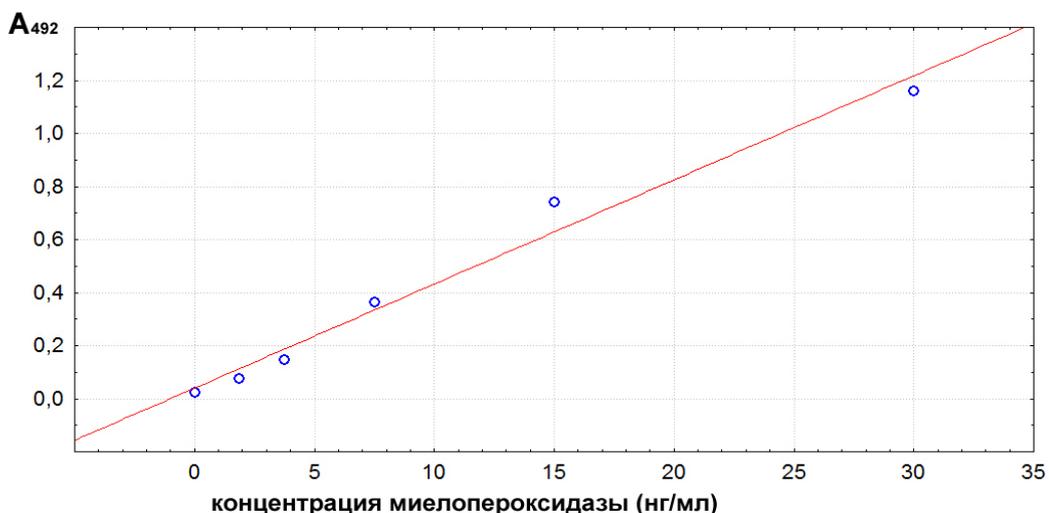


Рисунок 3.4.2 – Калибровочный график для определения концентрации МПО

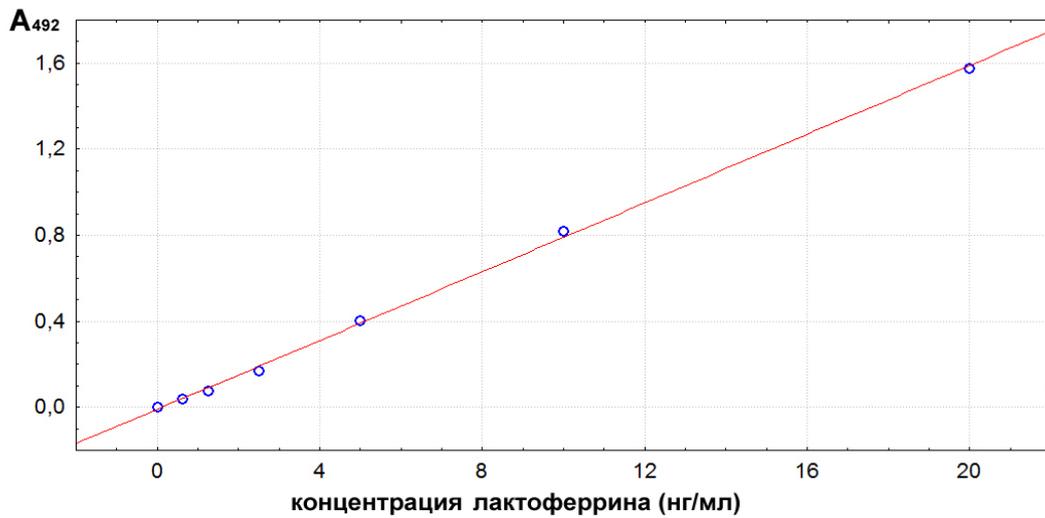


Рисунок 3.4.3 – Калибровочный график для определения концентрации ЛФ

Были проведены проверки тест-систем на корректность определения МПО и ЛФ в плазме человека. Для определения концентрации МПО плазму разводили в 50 раз, для определения ЛФ – в 100 раз.

В приготовленные образцы плазмы добавляли заранее известное количество МПО и ЛФ. Наблюдаемые и ожидаемые значения концентраций белков в плазме крови при добавлении известного количества МПО и ЛФ достоверно не отличаются (Табл. 3.4.2 и 3.4.3).

Таблица 3.4.2 – Наблюдаемые и ожидаемые концентрации МПО в пробах при добавлении известного количества МПО.

	МПО добавлена до концентрации	A ₄₉₂	Концентрация МПО наблюдаемая, нг/мл	Концентрация МПО ожидаемая, нг/мл
Проба 1		0,198	4,15	
Проба 2		0,205	4,34	
Проба 3		0,212	4,53	
Проба 1	4 нг/мл	0,347	7,86	8,15
Проба 2	4 нг/мл	0,367	8,38	8,34
Проба 3	4 нг/мл	0,376	8,62	8,53
Проба 1	10 нг/мл	0,593	14,02	14,15
Проба 2	10 нг/мл	0,605	14,30	14,34
Проба 3	10 нг/мл	0,612	14,48	14,53

Таблица 3.4.3 – Наблюдаемые и ожидаемые концентрации ЛФ в пробах при добавлении известного количества ЛФ.

	ЛФ добавлен до концентрации	A ₄₉₂	Концентрация ЛФ наблюдаемая, нг/мл	Концентрация ЛФ ожидаемая, нг/мл
Проба 1		0,419	5,36	
Проба 2		0,429	5,48	
Проба 3		0,437	5,58	
Проба 1	2 нг/мл	0,572	7,27	7,36
Проба 2	2 нг/мл	0,584	7,42	7,48
Проба 3	2 нг/мл	0,599	7,61	7,58
Проба 1	6 нг/мл	0,888	11,22	11,36
Проба 2	6 нг/мл	0,903	11,41	11,48
Проба 3	6 нг/мл	0,922	11,65	11,58

Полученные тест-системы для ЛФ и МПО имеют чувствительность 1 нг/мл и диапазон измерений 1-80 нг/мл и не дают перекрестных выявлений других нейтрофильных белков человека, а также МПО и ЛФ других видов, в частности коровы и свиньи.

3.5 Антимикробные пептиды как соединения, модулирующие ЛПС-индуцированную воспалительную реакцию

С момента открытия антимикробные пептиды и белки (АМПБ) фагоцитов рассматривались как эффекторные молекулы, отобранные в ходе эволюции для умерщвления микроорганизмов в процессе фагоцитоза. Что подтверждалось, в том числе, и морфологическими исследованиями, показывающими, что в ходе фагоцитоза происходит связывание АМПБ с клеточной стенкой микроорганизмов, сопровождающееся потерей жизнеспособности последними [Spitznagel, Chi, 1963; Данилова, 1988]. Положительный заряд молекул АМПБ определяет их высокое сродство к отрицательно заряженным компонентам (теиховые кислоты, липополисахариды, кислые фосфолипиды) клеточной оболочки микроорганизмов. Это свойство породило интерес к АМПБ как к потенциальным препаратам, направленным на нейтрализацию патогенного действия компонентов бактериальных клеток во внеклеточной среде организма, в частности в условиях интоксикации, вызванной липополисахаридами

(эндотоксинами) – компонентами наружной мембраны грам-отрицательных бактерий, которые являются ведущими патогенетическими факторами, запускающими каскад реакций локального и системного воспаления. Через специализированные рецепторы на клетках иммунной системы и эндотелия сосудов (TLR4, CD14) эндотоксин инициирует продукцию провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода, которые, наряду с защитным противомикробным, действием оказывают на организм и повреждающее воздействие, приводящее к системному нарушению гемодинамики и жизнедеятельности клеток и тканей. В связи с этим является актуальным вопрос о разработке профилактических и терапевтических медикаментозных средств, направленных на избирательное связывание и нейтрализацию эндотоксинов как ведущих патогенетических факторов эндотоксинового шока. Естественными прототипами подобных соединений являются катионные антимикробные пептиды (дефенсины, бактенецины, профенины) и белки (бактерицидный проникаемость увеличивающий белок, лактоферрин) нейтрофильных гранулоцитов, которые, наряду с проявлением антибиотической активности, могут связывать ЛПС с высокой аффинностью [Scott et al., 2000] и обладать противовоспалительным действием [Giacometti et al., 2004a, b].

Некоторые пептиды/полипептиды могут связывать и нейтрализовать ЛПС в условиях *in vitro* – гранулизин человека, НК-лизин свиньи [Brandenburg et al., 2010], LL-37 [Nijnik, Hancock, 2009], hBD-2 [Scott et al., 2000], производное протегрина IB-367 [Giacometti et al., 2003], бактерицидный проникаемость увеличивающий белок [Weiss, 2003], хотя эта активность не всегда сопровождалась противовоспалительным действием в условиях *in vivo*, в частности для НК-лизина свиньи [Andersson et al. 1999].

Вопрос о том, является ли противовоспалительное действие АМП прямым следствием ЛПС-связывающей активности и какие пептиды проявляют оптимальный набор свойств в качестве потенциального противовоспалительного препарата остается открытым.

Мы исследовали противовоспалительное действие антимикробных пептидов дефенсина человека 1 (HNP-1), профенина-1 (PF-1), протегрина-1 (PG-1), PR-39, асеницина-1, которые связывали ЛПС в LAL-тесте (количественный хромогенный Лимулюс тест) с различной эффективностью (табл. 3.5.1.), проявляющееся в снижении

ЛПС-стимулированной экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 β мононуклеарными клетками крови крыс в условиях *in vivo*.

Таблица 3.5.1 – Концентрации пептидов, при которой 50% ЛПС находится в связанном состоянии ($ЭК_{50}$), рассчитанные для каждого пептида по трем независимым экспериментам

	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

Как видно из таблицы 3.5.1, величина $ЭК_{50}$ для большинства антимикробных белков пептидов находится в пределах 1.5-6 мкМ. Несколько более высокое значение $ЭК_{50}$ – 39.87 мкМ было получено для дефенсина человека HNP-1. Хотя величины $ЭК_{50}$ для всех этих полипептидов значительно выше, чем $ЭК_{50}$ полимиксина В ($ЭК_{50}$ = 0.03 мкМ), эти полипептиды, за исключением дефенсина человека, могут рассматриваться как вещества с высокой ЛПС-связывающей активностью.

Результаты 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. Наличие у пептидов эндотоксин-нейтрализующей активности определяли по ингибирующему действию пептидов на ЛПС-индуцированную экспрессию гена ИЛ-1 β в мононуклеарных клетках крови крыс. Для антибиотических пептидов – дефенсина человека HNP-1, профенина-1, протегрина-1, PR-39 – продемонстрировано наличие эндотоксин-нейтрализующей активности, в то время как введение ареницина не снижало уровень ЛПС-индуцированной экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1 β (рис. 3.5.1). ЛПС вводили из расчета 25 мкг/кг веса животного, через 10 минут вводили АМП в количестве 100 мкг/кг.

Полученные результаты по эндотоксин-нейтрализующему действию антибиотических пептидов согласуются с литературными данными, свидетельствующими о том, что другие антимикробные пептиды животного происхождения, такие как θ -дефенсины макак-резуса [Schaal et al., 2012], β -дефенсин человека DEFB123 [Motzkus et al., 2006.], кателицидин овцы SMAP-29 [Giacometti et al., 2004a.], фрагменты антибиотических белков (лактоферрина и др.) [Brandenburg et al., 2011.] могут проявлять эндотоксин-нейтрализующее действие в условиях *in vivo*.

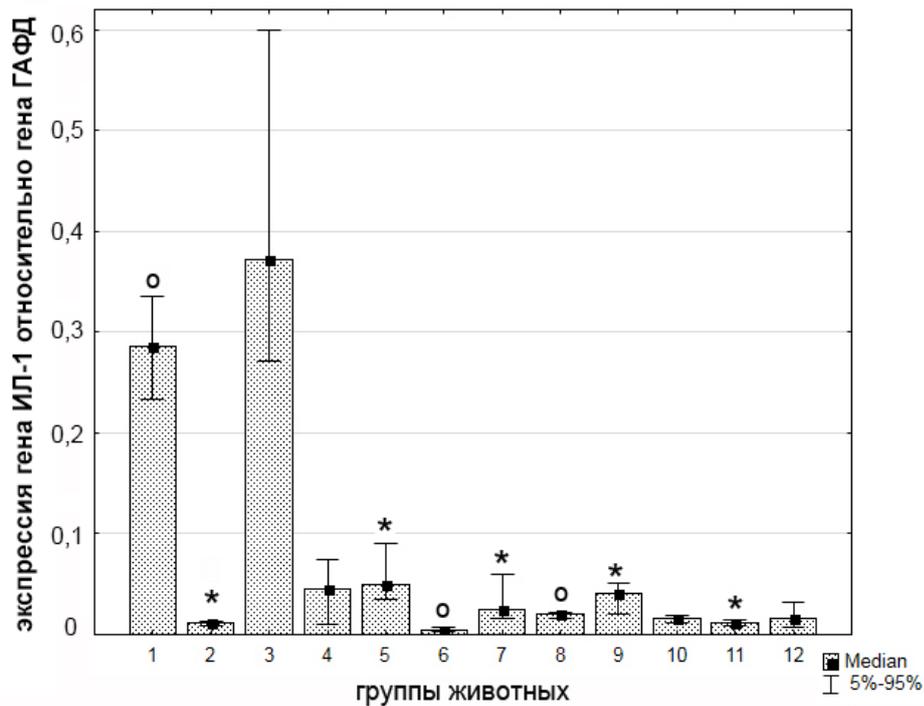


Рисунок 3.5.1 – Изменения экспрессии гена ИЛ-1 β в мононуклеарах крови крыс в условиях введения ЛПС и антимикробных пептидов (нормализовано относительно экспрессии гена ГАФД)

Группы животных, которым вводили: 1 – ЛПС; 2 – ЗФР; 3 – ЛПС и ареницин-1; 4 – ареницин-1; 5 – ЛПС и PR-39; 6 – PR-39; 7 – ЛПС и профенин-1 (PF-1); 8 – PF-1; 9 – ЛПС и протегрин (PG-1); 10 – PG-1; 11 – ЛПС и дефенсин HNP-1; 12 – дефенсин HNP-1
ЗФР – забуференный "физиологический раствор" (0,01 М Na-фосфатный буфер, pH 7,2-7,4 с 0,14 М NaCl). (n=5 – 7; n – количество животных в группе)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

o – $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

Механизм такого действия остается до конца не установленным. Некоторые исследователи предполагают прямое взаимодействие и связывание пептидов с ЛПС, препятствующее образованию комплекса ЛПС с CD14 и ЛПС-связывающим белком [Brandenburg et al., 2011], в то время как другие [Schaal et al., 2012.] полагают, что в случае, например, с θ -дефенсином нельзя говорить о прямом ЛПС-связывающем действии пептида в условиях *in vivo*. В пользу того, что противовоспалительное действие θ -дефенсинов скорее всего не связано с непосредственным взаимодействием с ЛПС, говорит установленный ими факт о том, что θ -дефенсин обладает способностью снижать продукцию фактора некроза опухоли лейкоцитами крови, стимулированную не

только ЛПС, но и другими TLR-агонистами – одноцепочечной РНК, термически обработанной грамположительной бактерией *Listeria monocytogenes*, флагеллином. По-видимому, механизм эндотоксин-нейтрализующего, противовоспалительного действия различен для разных антибиотических пептидов.

Следует отметить, что дозы АМП, использовавшиеся в приведенных выше исследованиях гораздо выше, чем в нашей работе. Так, при изучении противовоспалительного действия θ -дефенсина мышам вводили подкожно (или внутривенно) около 250 мкг пептида (5 мг/кг веса животного) [Schaal et al., 2012.], а кателицидин овцы вводили крысам парентерально в дозе 1 мг/кг веса животного [Giacometti et al., 2004a].

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). Продукты ПОЛ могут ингибировать синтез белков, изменять проницаемость сосудов и мембран клеток, и тем самым существенно влиять на развитие воспалительных процессов. В то же время недостаточно изученным остается вопрос о влиянии антибиотических пептидов на синтез активных форм кислорода, которые являются патогенетическими факторами при развитии системного воспаления.

Влияние антимикробных пептидов 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 vitro* антимикробные пептиды – дефенсин человека HNP-1, протегрин-1, PR-39, но не профенин-1, усиливают продукцию супероксидного радикала клетками цельной крови крыс (Рис. 3.5.2). Аналогичные результаты получены при исследовании действия пептидов *in vivo* (Рис. 3.5.3).

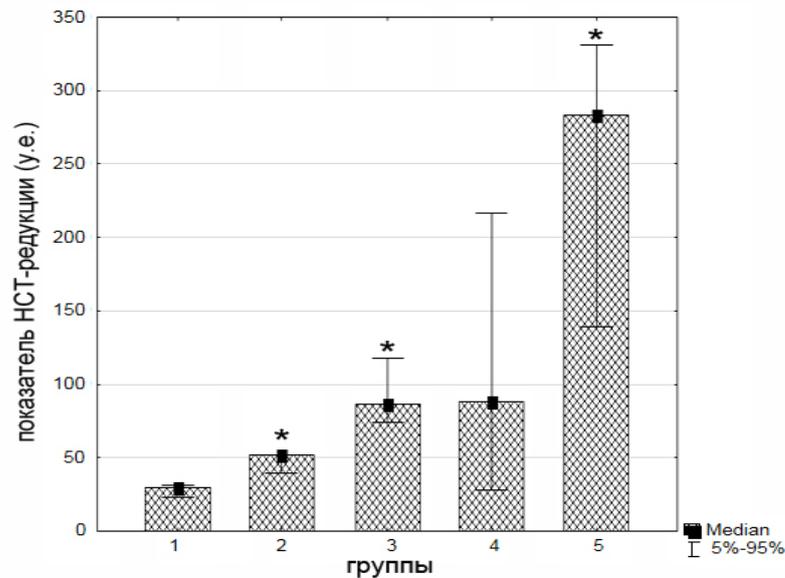


Рисунок 3.5.2 – Генерация супероксидного радикала клетками крови крыс *in vitro* при добавлении антимикробных пептидов

Группы: 1 – контроль (ЗФР); 2 – PR-39; 3 – протегрин-1; 4 – профенин-1; 5 – дефенсин человека HNP-1

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

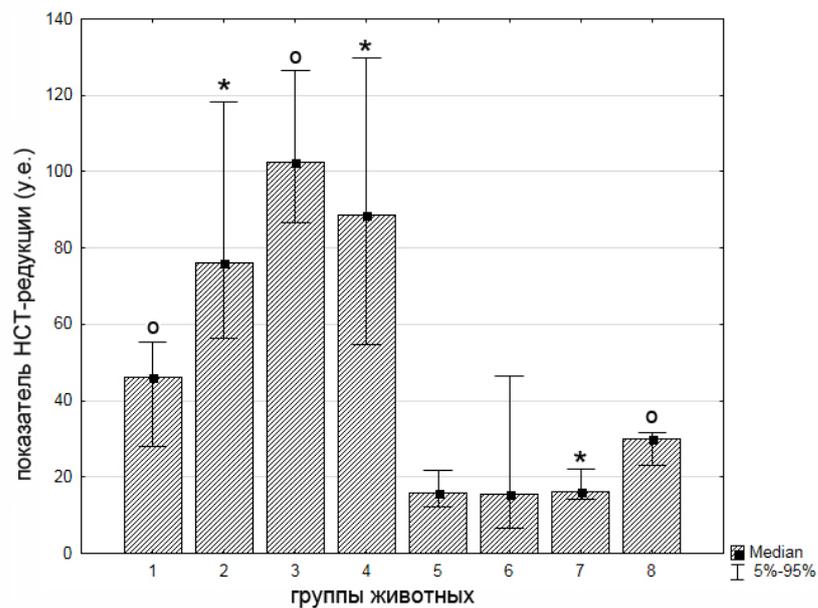


Рисунок 3.5.3 – Генерация супероксидного радикала клетками крови крыс *in vivo* при введении антимикробных пептидов и ЛПС

Группы животных, которым вводили: 1 – протегрин-1; 2 – ЛПС и протегрин-1; 3 – PR-39; 4 – ЛПС и PR-39; 5 – профенин-1; 6 – ЛПС и профенин-1; 7 – ЗФР; 8 – ЛПС (n=5 – 7)

* – $p < 0,05$ относительно гр. 8 (по U-критерию Манна-Уитни)

° – $p < 0,05$ относительно гр. 7 (по U-критерию Манна-Уитни)

Профенин-1 не усиливает спонтанную продукцию супероксидного радикала клетками крови, в отличие от других испытываемых пептидов (препарат дефенсина человека не испытывали в этом тесте, так как он показал значительно более сильное стимулирующее влияние на продукцию супероксидного радикала в условиях *in vitro*, чем другие пептиды).

Повышенный уровень спонтанной продукции свободных радикалов должен был вызвать повышение перекисного окисления липидов, что мы и выявили с помощью измерения содержания диеновых конъюгатов (Рис. 3.5.4). Введение ЛПС и профенина-1 (по отдельности или совместно) не влияет на уровень содержания диеновых конъюгатов, в то время как введение протегрина и PR-39 достоверно повышает содержание продуктов ПОЛ.

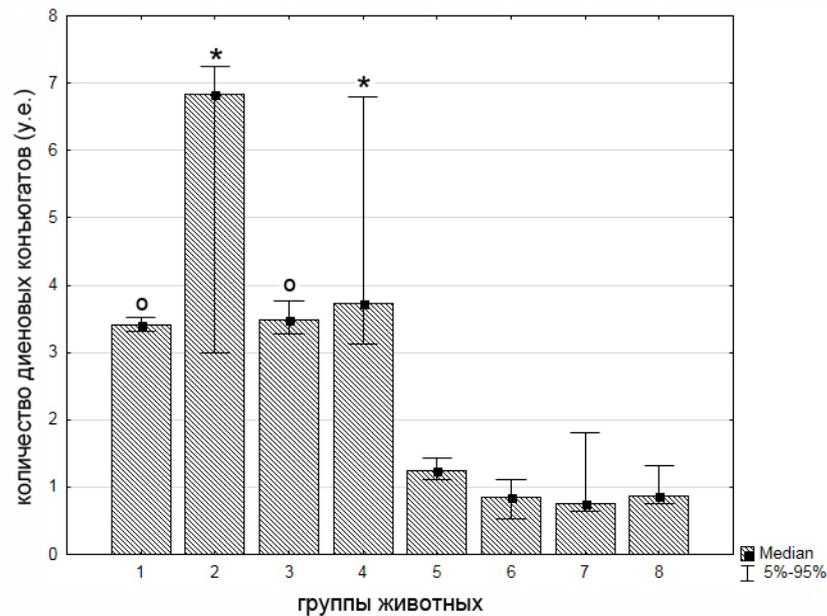


Рисунок 3.5.4 – Количество диеновых конъюгатов в крови крыс *in vivo* при введении антимикробных пептидов и ЛПС

Группы животных, которым вводили: 1 – протегрин-1; 2 – ЛПС+протегрин-1; 3 – PR-39; 4 – ЛПС+PR-39; 5 – профенин-1; 6 – ЛПС+профенин-1; 7 – ЗФР; 8 – ЛПС (n=5 – 7)

* – $p < 0,05$ относительно гр. 8 (по U-критерию Манна-Уитни)

o – $p < 0,05$ относительно гр. 7 (по U-критерию Манна-Уитни)

Полученные результаты, свидетельствующие о том, что PR-39 повышает уровень продукции свободных радикалов, оказались довольно неожиданными, так как для этого

пептида показано свойство ингибировать активность НАДФН-оксидазы в условиях бесклеточной среды [Shi et al., 1996]. В последующих исследованиях антиоксидантное действие PR-39 подтверждалось, но работы проводили, как правило, на выделенных клетках [Ikeda et al., 2001], а не на цельной крови. В то же время в одной из работ было показано, что, несмотря на ингибирующее действие PR-39 на активность NO-синтазы в условиях *in vitro*, введение этого пептида в экспериментальной модели сепсиса на мышах вызывало увеличение количества NO в печени животных [James et al., 2003].

Проведенный скрининг антимикробных пептидов (дефенсинов, кателицидинов) с целью выявления соединений, сочетающих в себе эндотоксин-нейтрализующие и противовоспалительные свойства, и не вызывающих активацию синтеза активных форм кислорода, показал, что пептиды PR-39, протегрин-1 и дефенсин нейтрофилов человека HNP-1 в условиях *in vitro* усиливают спонтанную продукцию супероксидного радикала клетками крови, а PR-39 и протегрин-1 усиливают продукцию супероксидного радикала и повышают содержание продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) *in vivo* как у интактных животных, так и у ЛПС-стимулированных, в то время как, профенин-1 в условиях *in vivo* и *in vitro* не изменяет уровень генерации супероксидного радикала клетками крови и содержания диеновых конъюгатов в плазме крови.

Исследована динамика изменения содержания провоспалительного цитокина ИЛ-1 β , противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в крови животных и степени секреции нейтрофилов по содержанию дефенсина RatNP-3 в плазме крови после введения крысам ЛПС, влияния на эту динамику введения профенина-1. Показано, что введение профенина-1 нормализует ЛПС-индуцированное повышение уровня цитокина ИЛ-1 β и снижает содержание ИЛ-10 (табл. 3.5.2) в плазме крови крыс. Также происходит нормализация количества дефенсина RatNP-3 как абсолютное, так и относительное из расчета на 10^6 нейтрофилов крови (Рис. 3.5.5).

В этих экспериментах ЛПС и профенин-1 (PF-1) вводили крысам внутрибрюшинно в количестве 500 мкг/кг веса и 100 мкг/кг веса соответственно.

Таким образом, показано, что профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для 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 цитотоксическое действие на эукариотические клетки [Wessely-Szponder et al., 2010].

Таблица 3.5.2 – Динамика количества ИЛ-1 β и ИЛ-10 в плазме крови крыс после введения ЛПС и профенина-1 (PF-1)

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 (по U-критерию Манна-Уитни)

– $p < 0,05$ относительно группы животных, у которых забор проводили через 1 час после введения ЛПС (по U-критерию Манна-Уитни)

LQ – нижний квартиль, UQ – верхний квартиль (n=5 – 7)

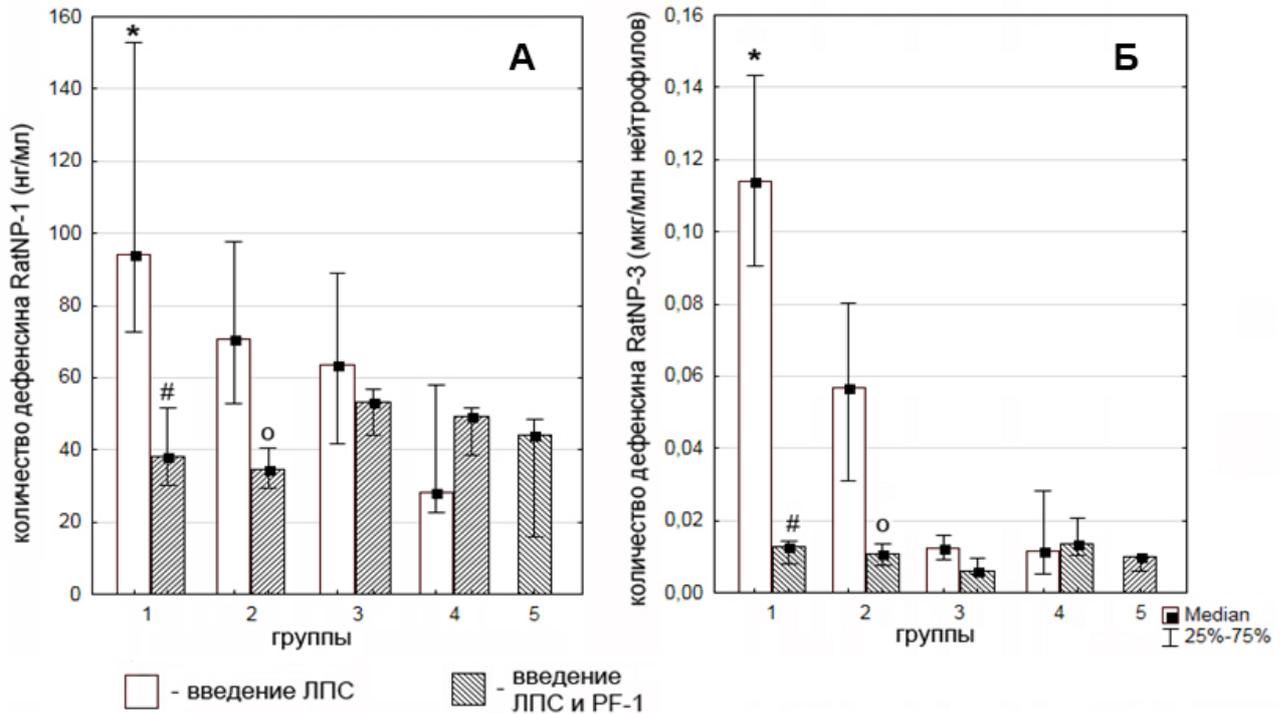


Рисунок 3.5.5 – Динамика содержания дефенсина RatNP-3 (А) и относительного (из расчета на 10^6 нейтрофилов) содержания дефенсина RatNP-3 (Б) в плазме крови крыс после введения ЛПС и профенина-1 (PF-1).

Группы: 1 – забор крови через 1 час после введения препаратов, 2 – забор крови через 3 часа после введения препаратов, 3 – забор крови через 6 часов после введения препаратов, 4 – забор крови через 24 часа после введения препаратов, 5 – интактные животные (n=5 – 7)

* – $p < 0,05$ относительно группы интактных животных (по U-критерию Манна-Уитни)

– $p < 0,05$ относительно группы животных, у которых забор крови проводили через 1 час после введения ЛПС (по U-критерию Манна-Уитни)

° – $p < 0,05$ относительно группы животных, у которых забор крови проводили через 3 часа после введения ЛПС (по U-критерию Манна-Уитни)

В то же время эксперименты на выделенных клетках мононуклеарного ряда крови (моноцитах) показали, что в условиях *in vitro* профенин-1 и PR-39 не снижают ЛПС-стимулированную экспрессию ИЛ-1 β ни через 2 часа инкубации, ни через 24 часа (табл. 3.5.3). В свою очередь, дефенсин HNP-1 даже увеличивает уровень ЛПС-индуцированной экспрессии через 24 часа инкубации с ЛПС (табл. 3.5.3), что соответствует данным других авторов [Chaly et al., 2000; Shi et al., 2007].

Таблица 3.5.3 – Экспрессия гена ИЛ-1 β в моноцитах крови человека под действием ЛПС и антибиотических пептидов 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*#
PR-39	0,043 \pm 0,016	0,063 \pm 0,024
ЛПС+ PR-39	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)

Неоднозначная роль дефенсинов из нейтрофилов при сепсисе подтверждается и исследованиями по изучению возможного прогноза течения заболевания в зависимости от числа копий генов дефенсинов. Так, проведенный скрининг количества копий генов HNP1-3 (*DEFA1/DEFA3*) на предмет корреляции с предрасположенностью к тяжелому сепсису показал, что пациенты с высоким числом копий были предрасположены к развитию тяжелого сепсиса [Chen et al., 2010]. В то же время пациенты отделений интенсивной терапии, у которых было низкое число копий *DEFA1/DEFA3* оказались более чувствительны к госпитальным инфекциям [Zhao et al., 2018].

Точные механизмы воздействия антимикробных пептидов на динамику течения сепсиса в условиях *in vivo* пока не известны, но одним из возможных механизмов, в

частности для α -дефенсинов нейтрофилов может быть индукция дефенсинами пироптоза эндотелиальных клеток сосудов путем связывания с рецептором P2X₇ с последующей активацией канонической каспазы-1 через NLRP3 инфламмасому [Chen et al., 2019].

Следует отметить, что АМП могут влиять на функционирование цитокиновой сети не только как модуляторы экспрессии генов, но и как регуляторы секреции и процессинга проcitoкиновых молекул. Так, LL37 способствует выходу и процессингу ИЛ-1 β из культуры клеток через активацию рецептора P2X₇ [Elssner et al., 2004].

Протегрины также способствуют выходу и процессингу ИЛ-1 β из культуры моноцитов человека, стимулированных ЛПС, с такой же интенсивностью как и АТФ, но это действие опосредуется через различные рецепторы. Активность АТФ блокируется P2X₇R-специфическим антагонистом, а действие протегина – нет. Воздействие дефенсина человека HNP-1 на ЛПС-стимулированные моноциты также приводит к выходу процессированных форм ИЛ-1 β , хотя и с меньшей интенсивностью [Perregaux et al., 2002]. Криптины мыши (но не их проформы) также снижали выход ИЛ-1 β из ЛПС-стимулированных макрофагов мышей. Более того мыши дефицитные по "зрелым" дефенсинам (*MMP-7^{-/-}*) имели повышенный уровень ИЛ-1 β в кишечнике [Shi et al., 2007].

Важно подчеркнуть, что перечисленные выше исследования (за исключением изучения мышей, нокаутных по MMP-7) проводились не на целых организмах, а на выделенных клетках или долгоживущих клеточных культурах.

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

Следует отметить, что возможности нейроиммунной модуляции системного воспаления сейчас активно исследуются и обсуждаются [Matsuda et al., 2012; Kumar, Sharma, 2010], в том числе и в связи с тем, что для некоторых нейропептидов установлена антимикробная активность.

В частности, продемонстрировано, что 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 физико-химические свойства характерны и для большинства эндогенных антибиотических пептидов.

Подход такого рода тем более логичен, что инициацию воспаления можно рассматривать как сигнал для развития стресс-реакции, которая по определению Г. Селье представляет собой "общую неспецифическую нейрогормональную реакцию организма на любое предъявляемое ему требование, не зависящая от природы действующего агента".

3.6 Иммуномодулирующее действие антимикробных пептидов и белков в условиях стрессирующего воздействия

Многие нейрогуморальные и иммунные реакции организма на введение ЛПС и психофизический (или психологический) стресс схожи и отличаются чаще всего временем и динамикой проявления. В частности, стресс активирует многие из тех же областей мозга, что и иммунные стимулы [Wan et al., 1994].

Психологический стресс активирует симпатическую нервную систему (СНС) и гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальную систему (ГГАС), приводя к повышению кровяного давления, частоты сердечных сокращений и увеличению уровней циркулирующих гормонов – катехоламинов и глюкокортикоидов, которые модулируют продукцию провоспалительных цитокинов связываясь с соответствующими рецепторами на клетках иммунной системы [Black, Garbutt, 2002]. В то же время, ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α , выделяющиеся при инфекции и психологическом стрессе, могут участвовать в передаче сигналов в мозг по принципу обратной связи, регулирующей функцию нейроэндокринной системы и метаболизм нейромедиаторов [Dantzer et al., 2007].

Как при введении ЛПС, так и при иммобилизационном стрессе на клетках селезенки мышей – нейтрофилах, эозинофилах или их предшественников увеличивается

экспрессия рецепторов к кортикотропин-релизинг фактору 1 типа (CRF-R1), но кинетика и амплитуда реакции различна – после иммобилизации она достигает 8-кратного увеличения и наблюдается через 1,5 часа после стресса [Radulovic et al., 2000], в то время как максимум манифестации рецепторов после ведения ЛПС происходит через 12 часов, в 17 раз превышает уровень экспрессии CRF-R1 по сравнению с контролем, высокий уровень кортикостерона сохраняется длительно [Radulovic et al., 1999].

В зависимости от природы стрессорного воздействия и его интенсивности экспрессия генов тех или иных молекулярных факторов иммунитета может изменяться. При кратковременном холодном стрессе (охлаждение крыс в индивидуальных металлических контейнерах в течение 10 мин при -20°C) экспрессия гена ИЛ-1 β в клетках селезенки и мононуклеарных клетках крови крыс не изменяется, а при комбинированном стрессе (охлаждение крыс, фиксированных на спине за конечности, в течение 30 мин при -20°C) интенсивность экспрессии гена ИЛ-1 β в клетках селезенки снижается (рис. 3.6.1.).

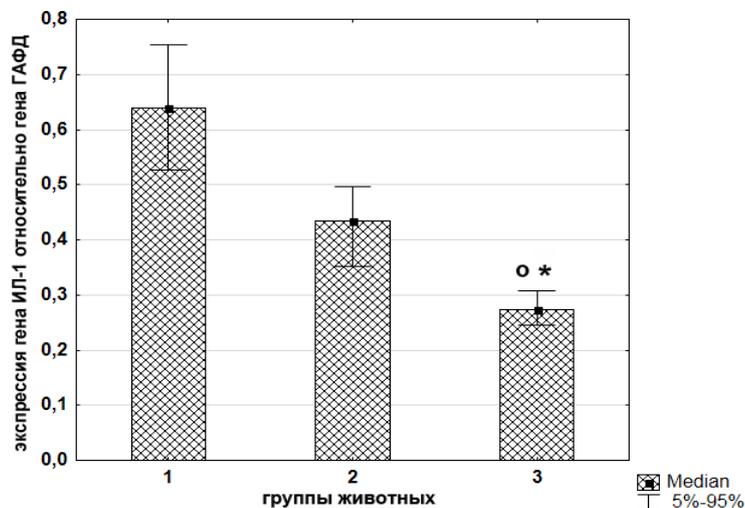


Рисунок 3.6.1 – Экспрессия гена ИЛ-1 β в спленоцитах крыс через 1 час после стрессорирующего воздействия (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД).

Группы животных: 1 – контрольные (без стресса); 2 – после кратковременного холодного стресса; 3 – после комбинированного стресса (n=5 – 6)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

° – $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

При психоэмоциональном стрессорирующем воздействии экспрессия гена ИЛ-1 β либо увеличивается [Brydon et al., 2005; O'Connor et al., 2003; De Miguel et al., 2017] либо остается неизменной [Meltzer et al., 2004; Sathyanesan et al., 2017]. Нами впервые показано, что в условиях комбинированного стресса (иммобилизация на спине и охлаждение) происходит снижение уровня экспрессии гена ИЛ-1 β в клетках селезенки крыс в первые часы после стресса, что может быть одной из причин, лежащих в основе транзиторной иммуносупрессии.

Стресс влияет на интенсивность продукции иммуномодуляторов, вызванную введением микроорганизмов, липополисахаридов [Connor et al., 2005] или повреждением тканей [Mercado et al., 2002]. Эффекты действия стресса на ЛПС-индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6), по-видимому, зависят от времени аппликации стресса по отношению к ЛПС-инъекции, природы стрессорного воздействия и используемой экспериментальной модели [Meltzer et al., 2004]. Стрессорное воздействие может препятствовать ЛПС-индуцированной выработке цитокинов [Beno and Kimura, 1999; Goujon et al., 1995] или потенцировать ее [Johnson et al., 2002; Quan et al., 2001].

Наши исследования, проведенные с использованием различных моделей стресса, свидетельствуют о том, что электроболевое раздражение не ингибирует ЛПС-индуцированную экспрессию гена ИЛ-1 β в мононуклеарных клетках крови крыс (рис. 3.6.2).

Плавающий стресс (плавание в холодной воде) также не ингибирует ЛПС-индуцированную экспрессию гена ИЛ-1 β в клетках селезенки, но смещает время манифестации максимальной экспрессии (рис. 3.6.3), что может быть связано с изменениями степени активации как гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы, в частности уровня кортикостерона, так и симпатической нервной системы.

Следует отметить, что введение α -дефенсинов человека не отменяло ЛПС-стимулированную экспрессию гена ИЛ-1 β в условиях электроболевого воздействия (рис. 3.6.4), в отличие от реакции на введение ЛПС.

В то же время электроболевое воздействие вызывает усиление экспрессии гена ИЛ-10, которое снижается при введении α -дефенсинов (рис. 3.6.5).

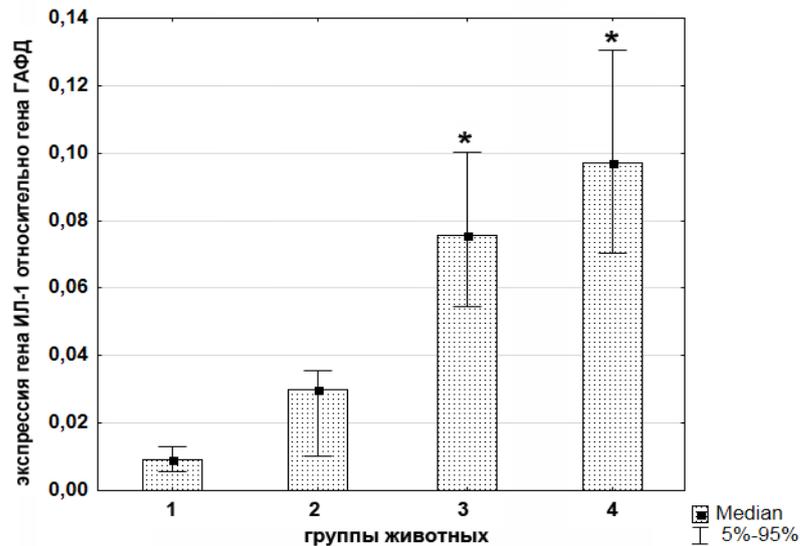


Рисунок 3.6.2 – Экспрессия ИЛ-1 β в мононуклеарных клетках крови крыс через 2 часа после электрошокового раздражения и введения ЛПС (нормализовано относительно экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контрольные (без стресса); 2 – после стресса; 3 – после введения ЛПС; 4 – после стресса и введения ЛПС (n=5 – 6)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

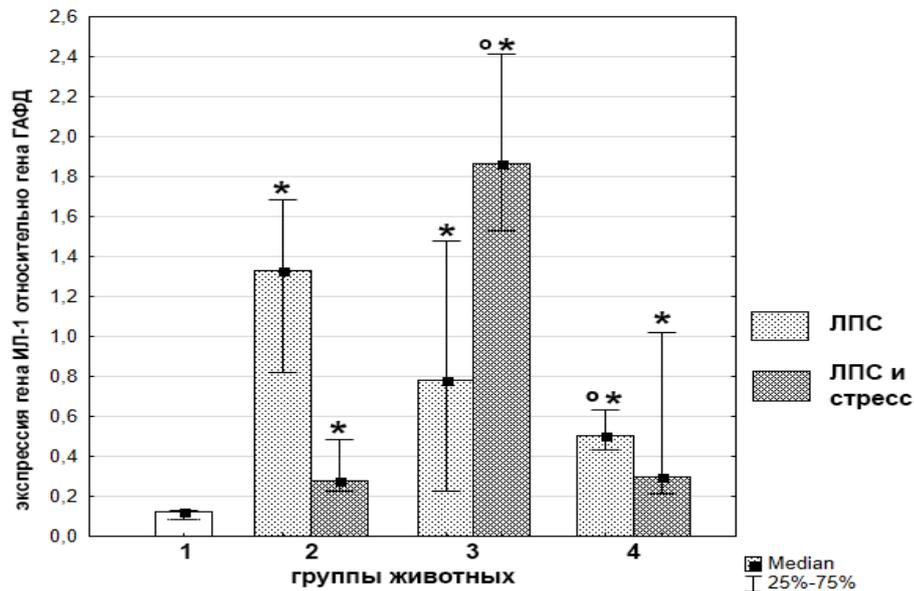


Рисунок 3.6.3 – Экспрессия гена ИЛ-1 β в спленocyтocyтaх крыс после введения ЛПС и введения ЛПС с последующим плавательным стрессом (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контрольные (без стресса); 2 – через 30 минут после воздействия; 3 – через 90 минут после воздействия; 4 – через 180 минут после воздействия (n=5 – 6)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

o – $p < 0,05$ относительно группы соответствующей 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

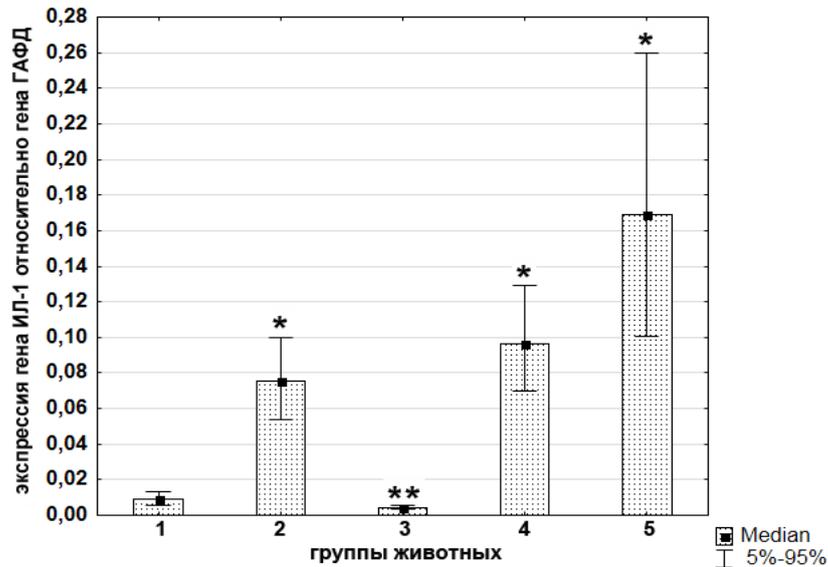


Рисунок 3.6.4 – Экспрессия ИЛ-1 β в мононуклеарных клетках крови крыс через 2 часа после электрошолевого раздражения, введения ЛПС и дефенсинов
Группы животных: 1 – контрольные (без стресса); 2 – после введения ЛПС; 3 – после введения дефенсинов и ЛПС; 4 – после стресса и введения ЛПС; 5 – после стресса и введения дефенсинов и ЛПС (n=5 – 7)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

** – $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

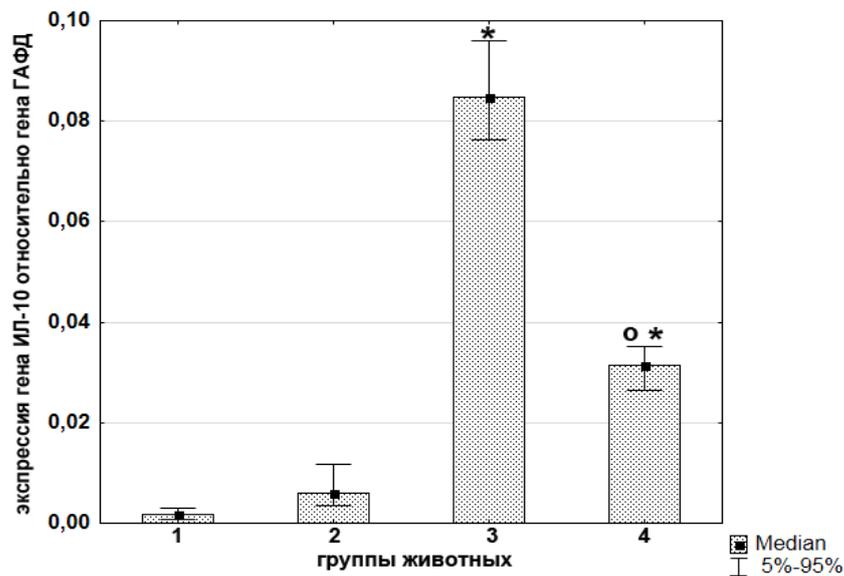


Рисунок 3.6.5 – Экспрессия гена цитокина ИЛ-10 в мононуклеарных клетках крови крыс через 2 часа после электрошолевого раздражения и введения дефенсинов (нормализовано относительно экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контрольные (введение ЗФР); 2 – после введения дефенсинов; 3 – после электрошолевого раздражения и введения ЗФР; 4 – после электрошолевого раздражения и введения дефенсинов (n=5 – 7)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (контрольной) (по U-критерию Манна-Уитни)

° – $p < 0,05$ относительно группы 3 (по U-критерию Манна-Уитни)

Говоря об активации ГГАС и СНС необходимо отметить такой важный компонент этой активации как перераспределение лейкоцитов крови, и в частности, нейтрофилез, который характерен не только для воспалительных реакций, вызванных микроорганизмами, но и является неотъемлемой частью стресс-реакции.

Хотя увеличение количества нейтрофилов является известным и стандартным проявлением стресс-реакции [Горизонтов и др., 1983], его биологический смысл остается до конца не ясным. Поиски ответов ведутся, как правило, в направлении исследования стресс-индуцированных изменений функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов. Показано, что в ходе острого психологического стресса увеличивается фагоцитарная активность нейтрофилов человека, уровень нестимулированной продукции супероксидного радикала повышается, а уровень стимулированной – снижается [Khanfer et al., 2010; Ellard et al., 2001].

Однако можно предположить, что антимикробные пептиды и белки, которые в ходе стресс-стимулированной дегрануляции выходят из нейтрофилов во внеклеточную среду, в частности пептиды дефенсины и белок лактоферрин, оказывают не только антибиотическое действие, но и по принципу обратной связи могут оказывать влияние на развитие стресс-реакции.

В 1988 году канадскими учёными было впервые обнаружено, что некоторые дефенсины, содержащиеся в гранулах нейтрофильных гранулоцитов (и названные кортикостатинами) подавляют продукцию кортикостерона клетками культуры ткани надпочечников крысы [Zhu et al., 1988]. Нами показано, что введение тотальных фракций дефенсинов крысы или кролика, которые содержат, в том числе, и кортикостатины, снижает уровень кортикостерона в крови при стрессе и отменяет стресс-индуцированную иммуносупрессию (подавление выработки специфических антител) у экспериментальных животных [Shamova et al., 1993; Шамова и др., 1995]. Эти результаты получили подтверждение в работах американских исследователей, показавших, что введение химически синтезированного кортикостатина-1 крысы (RatNP-1) снижает уровень кортикостерона в крови крыс при стрессе [Cervini et al., 1995].

В настоящей работе исследованы стресс-индуцированные изменения уровня кортикостерона, аденокортикотропного гормона (АКТГ), норадреналина в плазме крови и клеточного состава крови у крыс, а также экспрессии генов про- и

противовоспалительных цитокинов и гена паттерн-распознающего рецептора TLR4 в клетках селезенки в условиях экзогенного введения дефенсинов крысы RatNP-1 и RatNP-3 из нейтрофилов и антимикробного белка лактоферрина.

Паттерн-распознающие рецепторы, в том числе Toll-подобные рецепторы (TLR), рассматриваются обычно как составная часть механизмов реализации противоинфекционной защиты [Janeway, 2002]. Однако в последнее время появляется все больше данных о том, что пептиды и белки нейтрофильных гранулоцитов являются лигандами Toll-подобных рецепторов [Piccinini, Midwood, 2010]. В связи с этим изучение динамики экспрессии гена паттерн-распознающего рецептора TLR4 и влияния на этот процесс антимикробных белков и пептидов является важным аспектом оценки механизмов реализации стресс-реакции.

3.6.1 Особенности развития стресс-реакции в условиях экспериментальной модели плавательного стресса

Как говорилось ранее, результат действия стресса на продукцию цитокинов зависит от природы стрессорного воздействия и используемой экспериментальной модели, поэтому мы остановились на модели плавательного стресса, которая ранее применялась для демонстрации стресс-протективного действия дефенсинов, а именно было показано, что введение экспериментальным животным тотальной фракции дефенсинов крысы в течение первого получаса перед стрессом снимает подавление продукции антител к эритроцитам барана, вызываемого этим видом стрессирующего воздействия [Орлов, 1998].

Плавательный стресс сопровождается классической глюкокортикоидной реакцией – повышением уровня кортикостерона в крови крыс в течение получаса после стрессирующего воздействия, нормализация происходит через три часа (Рис. 3.6.6).

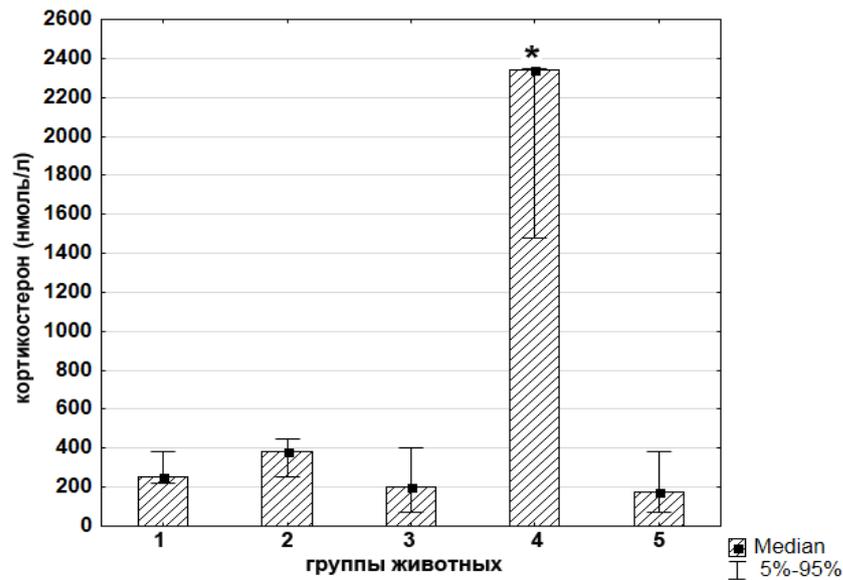


Рисунок 3.6.6 – Концентрация кортикостерона в крови крыс через 30 минут и 3 часа после плавательного стресса

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после введения растворителя; 3 – через 3 часа после введения растворителя; 4 – через 30 мин после стресса и введения растворителя; 5 – через 3 часа после стресса и введения растворителя (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ гр. 1, 2, 3, 5 (по U-критерию Манна-Уитни)

Одной из стандартных реакций на стресс является повышение содержания нейтрофилов в крови [Горизонтов и др., 1983; Selye, 1936]. В рамках данной работы вопрос о физиологической значимости явления нейтрофилиза имеет особое значение, поскольку именно нейтрофильные гранулоциты являются источниками изучаемых нами белковых и пептидных молекул. В связи с этим нами были оценена динамика количества нейтрофилов в крови крыс в ходе реализации стресс-реакции, а также изменение лейкоцитарного состава крови.

На 30 минуте после аппликации стрессорного воздействия понижается процентное содержание нейтрофилов в крови крыс, а через 3 часа – повышается, как и их абсолютное количество в крови крыс (Рис. 3.6.7).

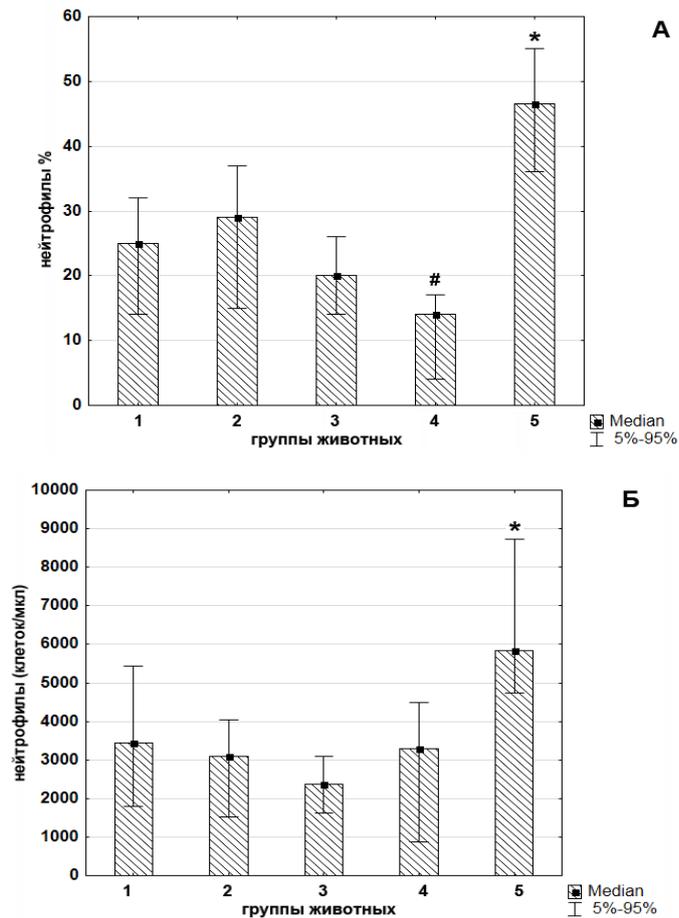


Рисунок 3.6.7 – Процентное (А) и абсолютное (Б) содержание нейтрофилов в крови крыс при плавательном стрессе

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после введения растворителя; 3 – через 3 часа после введения растворителя; 4 – через 30 мин после стресса и введения растворителя; 5 – через 3 часа после стресса и введения растворителя (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр. 1, 3 (по U-критерию Манна-Уитни)

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

При использовании этой экспериментальной модели (плавательный стресс) экспрессия генов цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-10 не изменяется (рис. 3.6.8), гена ФНО- α в клетках селезенки крыс снижается через 30 минут после стресса, а гена ТФР- β – через 3 часа (рис. 3.6.9). Экспрессия гена цитокина ИЛ-6 полностью подавлена через три часа после стрессирующего воздействия, а генов цитокина ИЛ-4 и рецептора TLR4 возрастает через три часа после стресса (рис. 3.6.10).

Факт увеличения уровня экспрессии гена TLR4 хорошо согласуется с данными, полученными австрийскими исследователями [Neubauer et al., 2013], показавшими, что

интенсивные физические упражнения приводят к повышению уровня экспрессии гена TLR4 в нейтрофилах крови человека через три часа после воздействия. Авторы связывают этот феномен с увеличением уровня миоглобина в крови. Внеклеточный миоглобин является алармином, сигнализирующим о повреждении мышц.

Блокирование экспрессии гена ИЛ-6 и отсутствие повышения экспрессии гена ИЛ-1 β в процессе развития стресс-реакции согласуется с повышением уровня экспрессии гена противовоспалительного цитокина ИЛ-4, который, как известно, снижает продукцию провоспалительных цитокинов [Szczepanik et al., 2001].

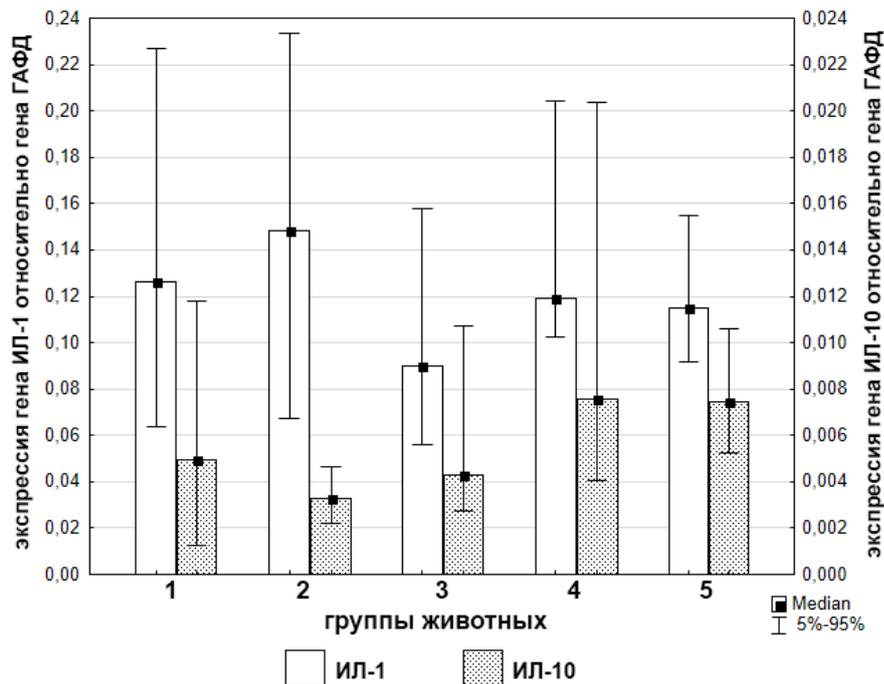


Рисунок 3.6.8 – Экспрессия генов интерлейкинов ИЛ-1 β и ИЛ-10 в селезенке крыс при плавательном стрессе (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контрольные, 2 – через 30 минут после введения растворителя, 3 – через 3 часа после введения растворителя, 4 – через 30 минут после введения растворителя и стресса, 5 – через 3 часа после введения растворителя и стресса (n=5 – 7)

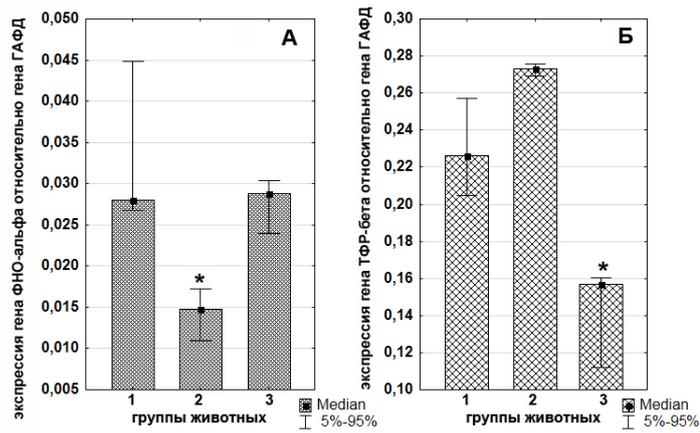


Рисунок 3.6.9 – Экспрессия генов ФНО- α (А) и ТФР- β (Б) в спленоцитах крыс после плавательного стресса (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контроль (интактные); 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 3 часа после стресса (n=5 – 7)

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

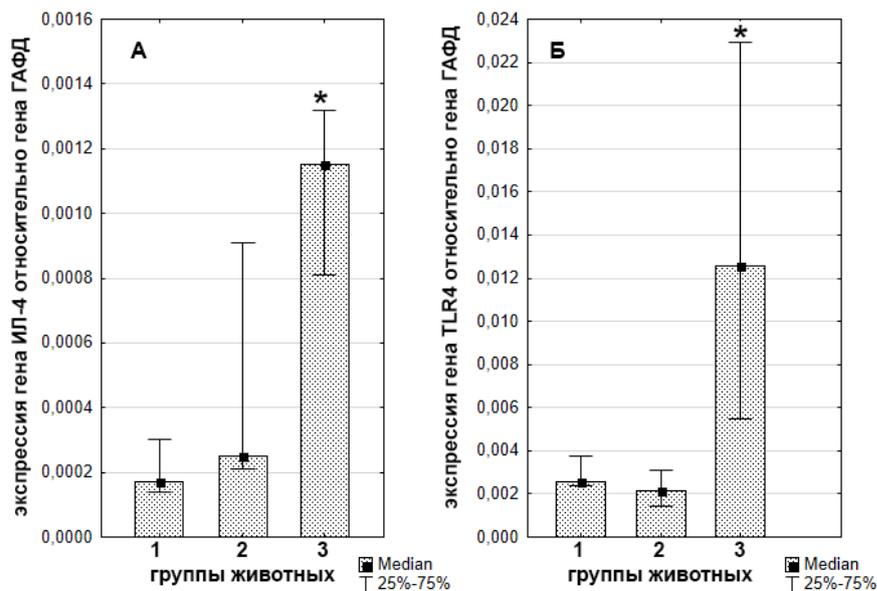


Рисунок 3.6.10 – Экспрессия генов ИЛ-4 (А) и TLR4 (Б) в спленоцитах крыс после плавательного стресса (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – контроль (интактные); 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 3 часа после стресса (n=5 – 7)

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

При принудительном плавании повышается содержание α -дефенсинов в крови, причем не только за счет увеличения количества нейтрофилов, но и за счет их усиленной дегрануляции (табл. 3.6.1).

Таблица 3.6.1 – Динамика содержания дефенсина RatNP-3 в крови крыс при плавательном стрессе

Группы животных	Концентрация дефенсина (нг/мл)		Относительная концентрация дефенсина (нг/10 ⁶ нейтрофилов)	
	Медиана (LQ; UQ)	Среднее± ошибка среднего	Медиана (LQ; UQ)	Среднее± ошибка среднего
Интактные	29,0 (22,0; 40,0)	33,9±4,8	10,1 (6,0; 10,3)	9,5±1,4
Через 30 минут после стресса	57,1* (49,2; 104,3)	82,7 ± 24,8*	65,6* (15,7; 66,0)	46,4±9,4*
Через 3 часа после стресса	225* (153; 339)	246±69*	30,0* (13,7; 43,8)	28,8±9,5*

* – $p < 0,05$ относительно гр. интактных животных (по U-критерию Манна-Уитни); LQ – нижний квартиль; UQ – верхний квартиль (n=5 – 7)

3.6.2 Иммуномодулирующее действие дефенсинов из нейтрофилов крысы при экспериментальном плавательном стрессе у крыс

Впервые показано, что превентивное введение крысам дефенсинов (RatNP-1, RatNP-3) нормализует процентное содержание нейтрофилов в крови как через 30 минут после стресса, когда происходит уменьшение процентного содержания нейтрофилов, так и через 3 часа, когда оно увеличивается (Рис. 3.6.11). Введение дефенсинов нормализует и абсолютное количество нейтрофилов (рис. 3.6.12).

На основании полученных данных можно предположить, что дефенсины, секретируемые нейтрофилами в кровь в начальную фазу развития стресс-реакции, вовлечены в формирование механизмов обратной связи, направленных на снижение числа циркулирующих нейтрофилов.

Можно предположить, что реализация этих реакций может осуществляться и посредством изменения продукции катехоламинов симпатoadреналовой системой в результате модулирования работы Ca²⁺ ионных каналов по аналогии с действием некоторых омега-конотоксинов [Terlau, Olivera, 2004.], третичная структура которых схожа со структурой дефенсинов – те и другие представляют собой цистин-содержащие амфипатические катионные пептиды. Кроме того дефенсины могут влиять на

нейрогенные механизмы регуляции, воздействуя на медленные натриевые каналы нейронов [Плахова и др., 2005].

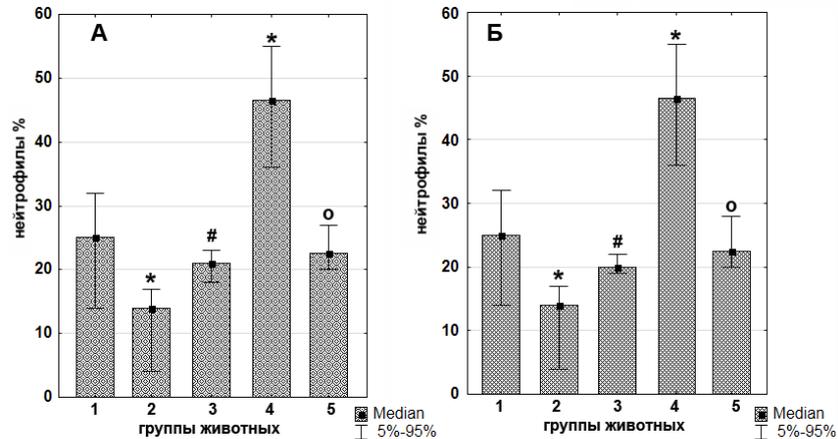


Рисунок 3.6.11 – Процентное содержание нейтрофилов в крови крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 30 мин после стресса и введения дефенсина; 4 – через 3 часа после стресса; 5 – через 3 часа после стресса и введения дефенсина (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр.1; # – $p < 0,05$ относительно гр. 2; o – $p < 0,05$ относительно гр. 4 (по U-критерию Манна-Уитни)

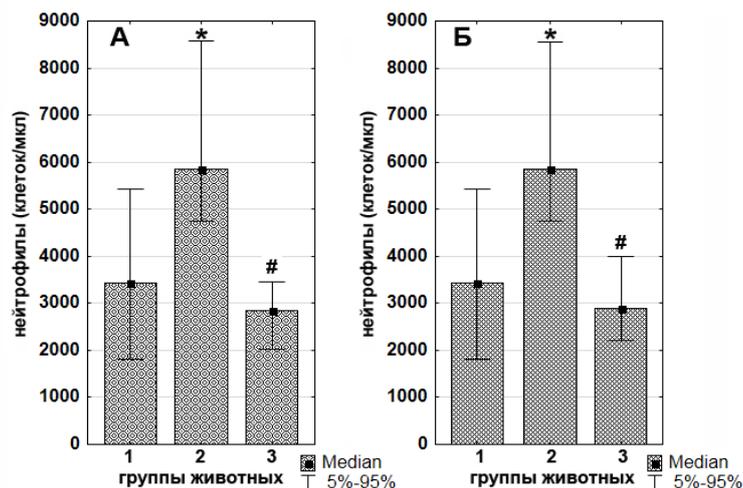


Рисунок 3.6.12 – Абсолютное содержание нейтрофилов в крови крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б)

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)

Исследовано изменение уровня норадреналина при плавательном стрессе и введении дефенсинов. Как выяснилось, введение дефенсинов не влияет на стресс-индуцированные изменения уровня норадреналина в крови крыс (табл. 3.6.2.)

Таблица 3.6.2 – Содержание норадреналина в плазме крови крыс через 30 мин и 3 часа после введения дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 и плавательного стресса

№ гр.	Воздействие	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	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	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)

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

Известно, что перераспределение лейкоцитов является следствием одновременного воздействия на них как катехоламинов, так и глюкокортикоидов [Davis et al., 1991].

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. 3.6.3).

Таблица 3.6.3 – Содержание кортикостерона в плазме крови крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 через 30 мин и 3 часа после воздействия

Группы животных	Уровень кортикостерона в плазме крови (нмоль/л)	
	RatNP-1	RatNP-3
1. Интактные	260 (240; 264)	250 (220; 340)
2. Через 30 мин после стресса	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	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) (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

– $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

Выбор дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 для исследования был обусловлен тем, что, как уже упоминалось ранее, для некоторых дефенсинов было выявлено кортикостатическое действие *in vitro* в культуре клеток коркового слоя надпочечников крысы, а именно показано, что RatNP-1 в этих экспериментах 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 *in vivo*, оцениваемое на максимуме развития глюкокортикоидной реакции, описано впервые.

Ранее американскими исследователями [Cervini et al., 1995] было установлено кортикостатическое действие синтетического пептида RatNP-1 *in vivo* у крыс при электроболевым воздействием, которое проявлялось при введении высоких доз синтетического пептида – 8-12 мг/кг веса животного. Такие концентрации далеки от физиологических, концентрация дефенсинов человека в плазме крови в норме

составляет в среднем около 50 нг/мл (у крысы – около 40 нг/мл) и достигает максимальных значений порядка 150 мкг/мл при тяжелом сепсисе, а при концентрации 1 мг/мл и выше дефенсины вызывают преципитацию белков плазмы [Panyutich et al., 1993]. В настоящем исследовании кортикостатический эффект наблюдался при введении дефенсинов в количестве 100 мкг/кг веса животного, что позволяет говорить о возможной физиологической роли этих пептидов в механизмах регуляции стресс-реакции. Такое различие в действующих концентрациях можно объяснить с одной стороны тем, что мы использовали природные, а не синтетические пептиды, а с другой, тем, что американские исследователи использовали другую модель экспериментального стресса и работали на линии крыс Sprague-Dawley, более устойчивых к стрессирующим воздействиям.

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 уровня АКТГ, в том числе и кортикостатического в условиях *in vitro* RatNP-1 (табл. 3.6.4).

Как было показано, 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 ФНО- α в клетках селезенки крыс через 30 минут после стресса и гена ТФР- β через 3 часа после стресса.

Введение дефенсинов снижает стресс-стимулированную экспрессию генов TLR4 (Рис. 3.6.13) и ИЛ-4 (Рис. 3.6.14), восстанавливает экспрессию гена ТФР- β (Рис. 3.6.15), но не влияет на экспрессию гена ФНО- α (Рис. 3.6.16).

Таблица 3.6.4 – Содержание АКТГ в плазме крови крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 через 30 мин и 3 часа после воздействия

Группы животных	Уровень 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	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	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)

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

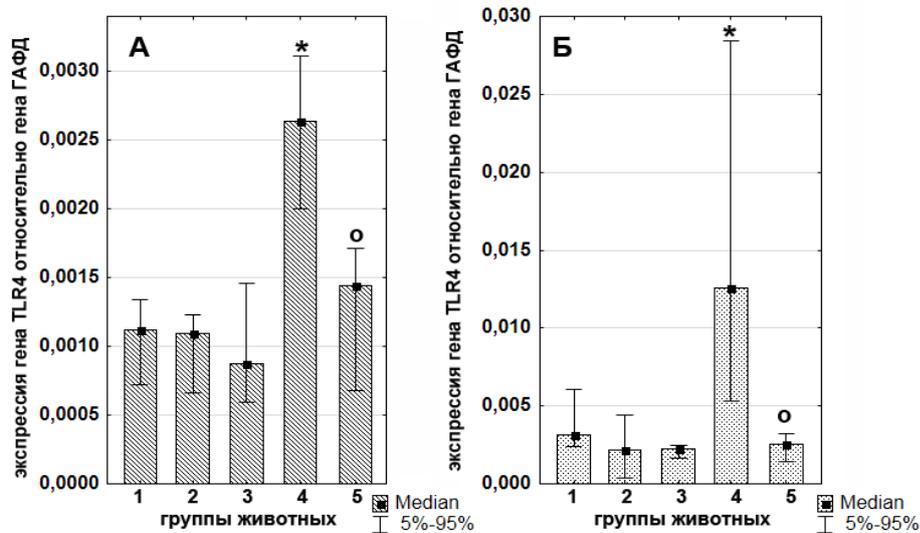


Рисунок 3.6.13 – Экспрессия гена TLR4 в спленocyтaх крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б) (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 30 мин после стресса и введения дефенсина; 4 – через 3 часа после стресса; 5 – через 3 часа после стресса и введения дефенсина (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр.1; o – $p < 0,05$ относительно гр. 4 (по U-критерию Манна-Уитни)

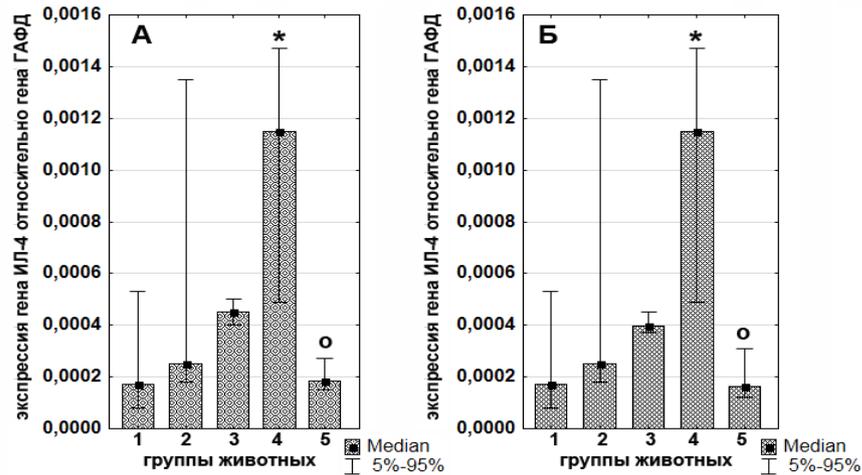


Рисунок 3.6.14 – Экспрессия гена ИЛ-4 в спленоцитах крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б) (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса;

3 – через 30 мин после стресса и введения дефенсина; 4 – через 3 часа после стресса; 5 – через 3 часа после стресса и введения дефенсина (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр.1; о – $p < 0,05$ относительно гр. 4 (по U-критерию Манна-Уитни)

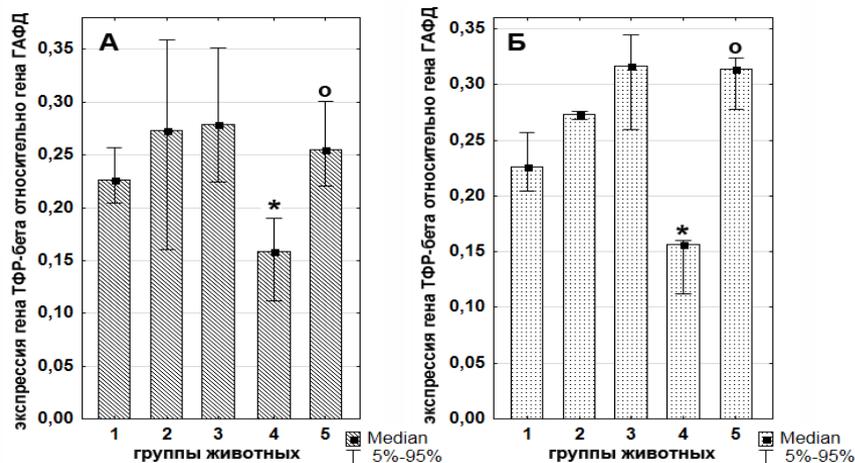


Рисунок 3.6.15 – Экспрессия гена ТФР-β в спленоцитах крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б) (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 30 мин после стресса и введения дефенсина; 4 – через 3 часа после стресса; 5 – через 3 часа после стресса и введения дефенсина (n=5 – 8)

* – $p < 0,05$ относительно гр.1; о – $p < 0,05$ относительно гр. 4 (по U-критерию Манна-Уитни)

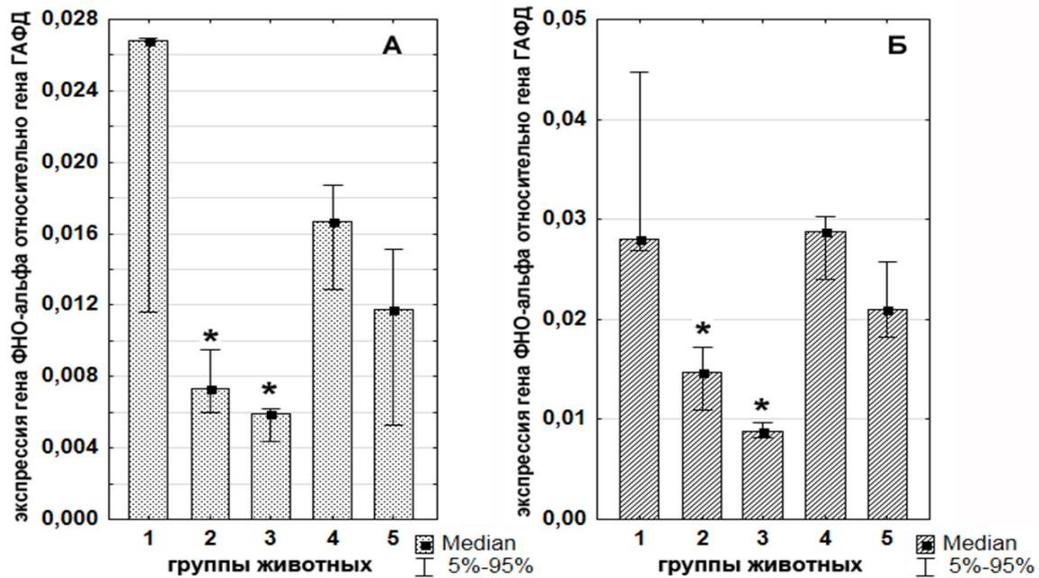


Рисунок 3.6.16 – Экспрессия гена ФНО- α в спленocyтaх крыс при плавательном стрессе и введении дефенсинов RatNP-1 (А) и RatNP-3 (Б) (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после стресса; 3 – через 30 мин после стресса и введения дефенсина; 4 – через 3 часа после стресса; 5 – через 3 часа после стресса и введения дефенсина (n=5 – 8)

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

Результаты проведенного исследования позволяют свидетельствуют об адаптогенном действии дефенсинов при плавательном 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, включающей четыре изоформы: RatNP-1, RatNP-2, RatNP-3, RatNP-4. Антитела к дефенсинам вводили крысам непосредственно перед аппликации стресса. В качестве контроля другой группе животных вводили суммарную фракцию иммуноглобулинов, выделенных из сыворотки, взятой у кроликов до иммунизации.

При введении антител наблюдалось снижение относительной концентрации (нг/10⁶ нейтрофилов) дефенсина RatNP-3 в плазме крови экспериментальных крыс через 3 часа после стрессирующего воздействия, что подтверждает предположение о том, что вводимые поликлональные АТ связываются с эндогенными дефенсинами (Рис. 3.6.17а).

Уровень кортикостерона в плазме экспериментальных животных оставался повышенным через 3 часа после стресса, а не снижался до уровня характерного для стрессированных животных без введения антител (Рис. 3.6.17б).

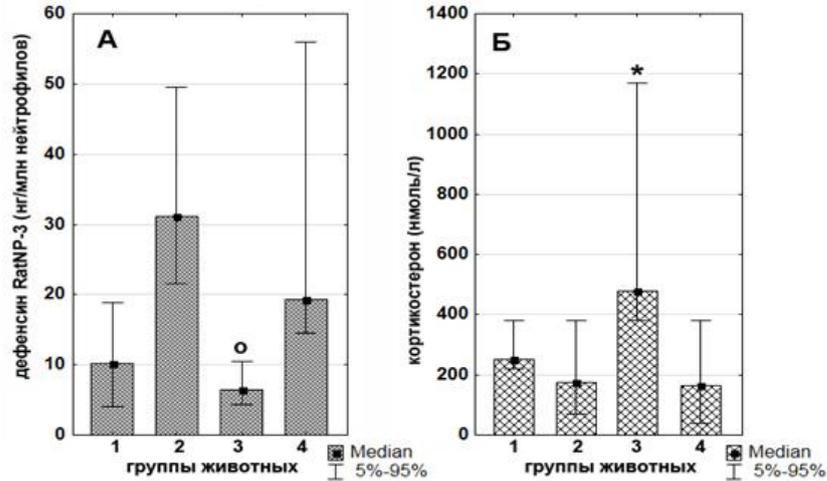


Рисунок 3.6.17 – Относительная концентрация дефенсина RatNP-3 (А) и концентрация кортикостерона (Б) в крови крыс через 3 часа после введения антител к дефенсинам крысы и плавательного стресса

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)

* – $p < 0,05$ относительно гр.1, 2, 4; ° – $p < 0,05$ относительно гр. 2, 4 (по U-критерию Манна-Уитни)

Таким образом, методом иммунонейтрализации, впервые показано, что эндогенные дефенсины участвуют в регуляции уровня кортикостерона в крови крыс в ходе развития стресс-реакции.

3.6.3 Иммуномодулирующее действие лактоферрина человека при экспериментальном плавательном стрессе у крыс

Лактоферрин является неотъемлемым компонентом специфических гранул нейтрофильных гранулоцитов, содержимое которых быстро выходит во внеклеточную среду под действием различных стимулов. Показано, что при инфекционных и воспалительных процессах, сопровождающихся увеличением количества нейтрофилов в крови, резко увеличивается содержания лактоферрина в плазме крови [Осидак и др.,

1994; Maffei et al., 1999]. Предполагается, что в этих условиях лактоферрин функционирует как антимикробный и противовоспалительный фактор. Как известно, при стрессирующем воздействии происходит мобилизация нейтрофилов и их дегрануляция нейтрофильных гранулоцитов. Вопрос о возможном участии соединений, секретлируемых нейтрофилами при стрессе (лактоферрин, дефенсины и др.), в механизмах реализации взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем остается недостаточно изученным.

Среди наиболее существенных работ такого рода можно отметить исследования, демонстрирующие, что эффекты действия ЛФ, в частности по влиянию на миелопоэз, различаются для нормальных и адреналэктомированных животных [Zimecki et al., 2009].

Включение в диету лактоферрина может уменьшать депрессивно-подобные симптомы у мышей, вызванные повторным плавательным стрессом [Takeuchi, et al., 2017], а пероральный прием лактоферрина может смягчать последствия психологического стресса у людей, в частности влиять на изменения сердечного ритма [Shinjo et al., 2018].

Кроме этого, внутрибрюшинное введение ЛФ изменяет поведенческие реакции у крыс в тесте «замирания», вызванного страхом [Kamemori et al., 2004], а пероральное введение ЛФ в период постнатального развития у крыс улучшает их когнитивные способности при выполнении задач в условиях стресса [Shumake et al., 2014].

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

Превентивное введение ЛФ снижает стресс-индуцированное повышение концентрации кортикостерона через 30 минут после аппликации стресса. При введении овальбумина подобного эффекта не наблюдалось. Через 3 часа изменений концентрации кортикостерона не выявлено (Рис. 3.6.18).

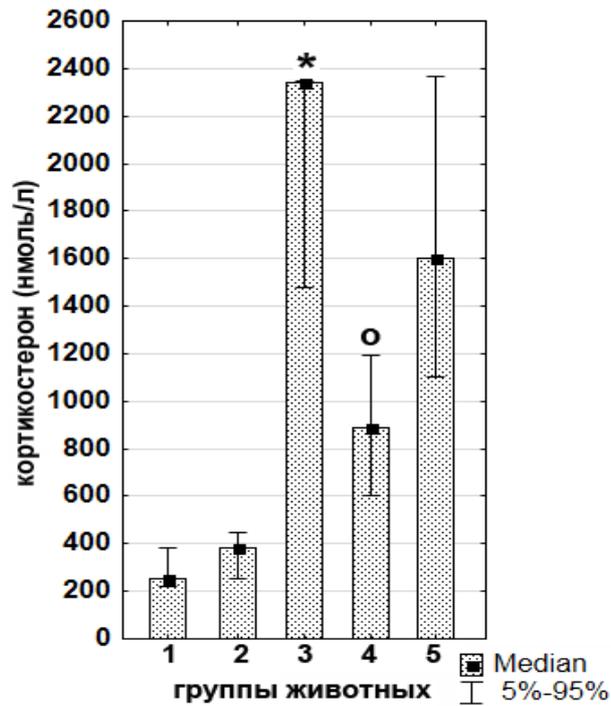


Рисунок 3.6.18 – Концентрация кортикостерона в крови крыс через 30 минут после плавательного стресса, введения лактоферрина или овальбумина

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 30 мин после введения растворителя; 3 – через 30 мин после стресса и введения растворителя; 4 – через 30 мин после стресса и введения лактоферрина; 5 – через 30 мин после стресса и введения овальбумина (n=5 – 8)

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

o – $p < 0,05$ относительно гр. 3 (по U-критерию Манна-Уитни)

Выявленное кортикостатическое действие лактоферрина, оцениваемое на максимуме развития глюкокортикоидной реакции, описано впервые. Следует подчеркнуть, что оно 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. 3.6.5) и не влияет на стресс-индуцированные изменения уровня норадреналина в крови крыс (табл. 3.6.5)

Таблица 3.6.5 – Содержание АКТГ и норадреналина в плазме крови крыс через 30 минут и 3 часа после плавательного стресса и введения ЛФ

Группы животных	АКТГ (пг/мл)		Норадреналин (пг/мл)	
	30 минут	30 минут	3 часа	3 часа
1. Инъекция растворителя	15,1 (7,1; 21,0)	13,6 (6,7; 14,0)	230 (199; 271)	275 (222;563)
2. Инъекция растворителя и плавательный стресс	24,7* (17,0; 29,3)	22,8* (16,3; 23,5)	502* (345; 677)	350 (287;460)
3. Инъекция ЛФ и плавательный стресс	19,7 (15,0; 24,0)	14,7 (10,5; 19,7)	414 (146; 555)	371 (215;468)

Данные представлены в виде – медиана (нижний квартиль; верхний квартиль) (n=5 – 6)

* – $p < 0,005$ отличается от соответствующей группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

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

Превентивное внутрибрюшинное введение ЛФ (но не ОА) снижает повышение уровня нейтрофилов в крови через 3 часа после стресса (табл. 3.6.6) и стресс-стимулированную экспрессию генов ИЛ-4 и TLR4 в селезенке крыс (рис. 3.6.19.).

Таблица 3.6.6 – Содержание нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в крови крыс через 30 минут и 3 часа после плавательного стресса и введения ЛФ или ОА

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 воды	29,5 (15,0, 37,0)	14,0 (10,0, 26,0)	3103 (1515, 4033)	1631 (1060, 3094)
3. Инъекция воды и плавательный стресс	14,0* (4,0, 16,0)	46,5* (38,0, 54,0)	3304 (864, 3408)	5844* (5046, 7526)
4. Инъекция ЛФ и плавательный стресс	18,0 (10,0, 21,0)	29,0# (23,0, 32,0)	2279 (2194, 2640)	3040# (2668, 3922)
5. Инъекция ОА и плавательный 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) (n=5 – 6)

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

– $p < 0,05$ относительно гр. 3 (по U-критерию Манна-Уитни)

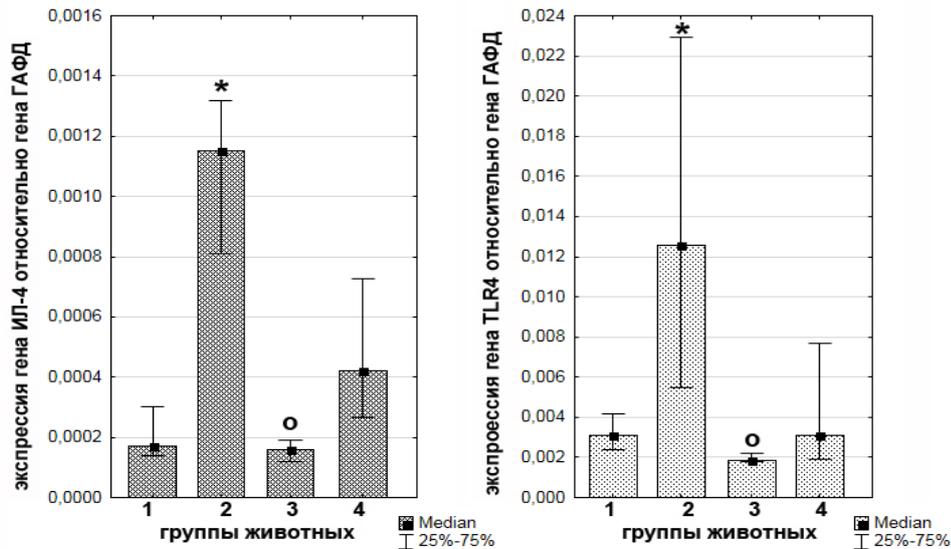


Рисунок 3.6.19 – Экспрессия генов ИЛ-4 (А) и TLR4 (Б) в спленоцитах крыс при плавательном стрессе после введения лактоферрина человека и овальбумина (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – через 3 часа после стресса; 3 – через 3 часа после стресса и введения лактоферрина; 4 – через 3 часа после стресса и введения овальбумина
* – $p < 0,05$ относительно гр.1; o – $p < 0,05$ относительно гр. 2 (по U-критерию Манна-Уитни) (n=5 – 6)

Необходимо отметить, что введение лактоферрина человека и дефенсина крысы без плавательного стресса не влияло на уровень кортикостерона в крови, клеточный состав и на экспрессию генов цитокинов, но изменяло 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. 3.6.20).

Возможно, появление в организме повышенной концентрации компонентов нейтрофилов является сигналом (сигналом тревоги – алармином) стрессорного воздействия и тем самым вызывающим индукцию экспрессии гена TLR4.

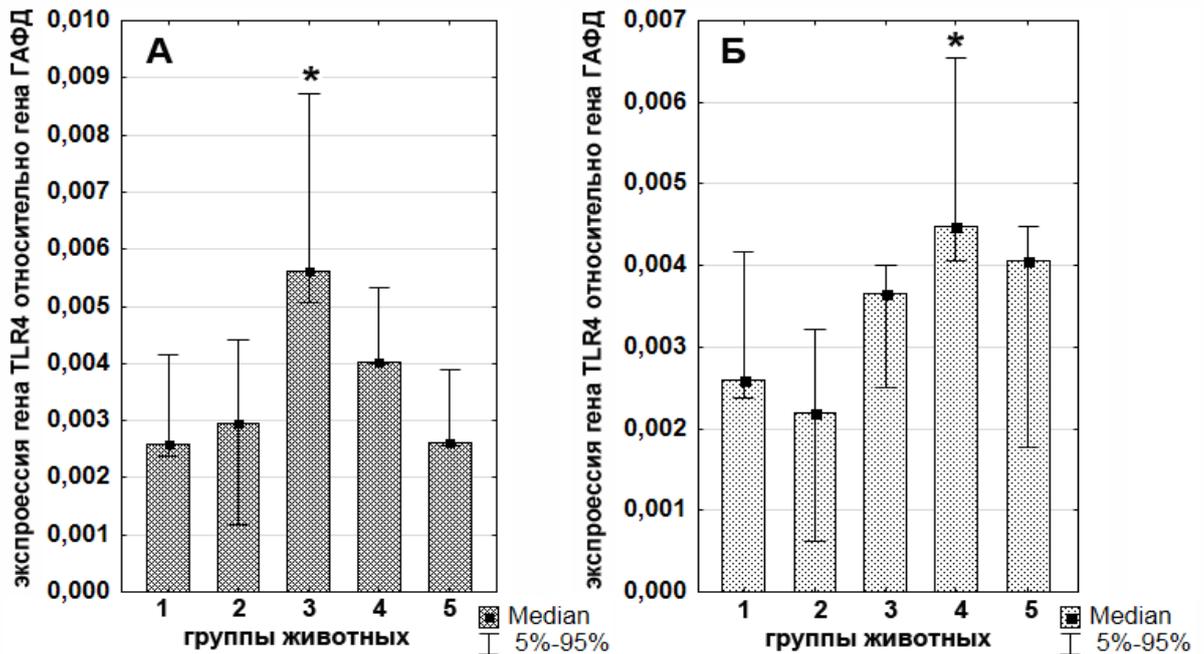


Рисунок 3.6.20 – Экспрессия гена TLR4 в спленocyтaх крыс через 30 минут (А) и 3 часа (Б) после введения дефенсина RatNP-3, лактоферрина и овальбумина (нормализовано по отношению к экспрессии гена ГАФД)

Группы животных: 1 – интактные; 2 – после введения растворителя; 3 – после введения дефенсина; 4 – после введения лактоферрина; 5 – после введения овальбумина (n=5 – 6)

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

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).

Таким образом, молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, мобилизующиеся в первые минуты и часы воздействия неблагоприятных факторов, вовлечены не только в противоинфекционную защиту, но и в более широкий круг защитно-приспособительных реакций, а антимикробные белки и пептиды могут выполнять функцию эндогенных иммуномодуляторов и адаптогенов.

Катионный характер этих соединений позволяет предположить их действие на систему меланокортиновых рецепторов. Как известно меланокортиновые рецепторы

ассоциированы с G-белками и 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. Причем, это кортикостатическое действие *in vitro* на культуре клеток надпочечников, по предположению авторов было обусловлено конкурентным связыванием дефенсинов с рецептором АКТГ, именно благодаря наличию блока остатков аргинина вблизи N-конца молекулы пептида, похожий блок есть и у АКТГ [Solomon, 1993].

Эти же кортикостатические дефенсины (а именно α -дефенсин кролика NP-3a) ингибируют действие α -меланоцит-стимулирующего гормона на продукцию альдостерона клетками клубочковой зоны коры надпочечников крысы, т.е. возможно, что такие дефенсины взаимодействуют не только с АКТГ-рецептором [Zhu et al., 1991; Solomon, 1993].

Позднее для другой формы дефенсинов – β -дефенсинов, было показано, что по крайней мере два β -дефенсина человека (hBD1 и hBD3) являются лигандами для меланокортинового рецептора 1 [Kaelin et al., 2008].

О.В. Шамоной установлено, что не только кортикостатические α -дефенсины могут модулировать активность альфа-меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH), но и α -дефенсины нейтрофилов, не влияющие на активность рецепторов АКТГ *in vitro*. Как HNP-4 (кортикостатический α -дефенсин человека), так и HNP-1 (не кортикостатический) снижают супрессивное действие α -меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH) на секрецию ИЛ-1 β мононуклеарными клетками человека [Шамова, 2013].

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

Как правило, активность α -меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH) связывают с усилением пигментации, а также с регуляцией пищевого и полового поведения, когнитивных функций [Datta, King, 1982; Kaelin et al., 2008]. Существует немного работ, посвященных особенностям функционирования α -MSH в условиях

эмоционального стресса. Так, уже через 30 минут после стресса (иммобилизация в "домиках" и принудительное плавание) у крыс активируются проопиомеланокортиновые POMC/CART-нейроны аркуатного ядра гипоталамуса, в которых проопиомеланокортин (POMC) процессируется преимущественно до α -MSH [Liu et al., 2007]. Концентрация α -MSH в плазме у мышей повышалась после интенсивных упражнений, а в гипофизе в этих условиях усиливалась экспрессия конвертазы PC2, участвующей в процессинге, который связан с образованием α -MSH из POMC [Hiramoto et al., 2013].

В последние несколько лет также активно исследуется противовоспалительная активность α -меланоцит-стимулирующего гормона. В частности, показано, что α -MSH ингибирует путь сигнальной трансдукции, приводящий к активации ядерного транскрипционного фактора NF- κ B [Manna et al., 1998; Catania et al., 2010]. Еще одним механизмом реализации противовоспалительной активности α -MSH может быть стимулирование продукции противовоспалительных цитокинов – этот гормон увеличивает синтез и секрецию интерлейкина ИЛ-10 в клетках селезенки мыши [Chang et al., 2008]. Таким образом, выявленное нами корригирующее действие α -дефенсина RatNP-3 на экспрессию гена интерлейкина ИЛ-10 в клетках селезенки крысы может быть обусловлено конкурирующим связыванием с одной из изоформ меланокортинового рецептора.

Кортикостатическое действие ЛФ человека, впервые описанное нами, обусловлено, возможно, его конкурентным связыванием с рецептором АКТГ (меланокортиновым рецептором 2), так как этот белок имеет в своей первичной структуре блок из четырех аргининов на N-конце молекулы. Подобная конфигурация молекул характерна для дефенсинов с кортикостатической активностью и АКТГ. Для подтверждения этого предположения мы провели исследование стресс-индуцированного изменения уровня кортикостерона у крыс в условиях экспериментального стресса и введении препаратов ЛФ человека, отличающихся по аминокислотному составу N-конца молекул, а именно, нативного ЛФ из молока человека и рекомбинантного апо-ЛФ человека ("БелЛактоферрин", БГУ, НПЦ НАН Беларуси по животноводству) полученного из молока трансгенных коз-продуцентов, выведенных в рамках научно-технической программы Союзного государства «БелРосТрансген-2». Основное отличие структуры трансгенного ЛФ от нативного – два

остатка аргинина, а не четыре на N-конце молекулы. Трансгенный ЛФ человека с измененной аминокислотной последовательностью на N-конце не оказывал кортикостатического действия (рис. 3.6.21).

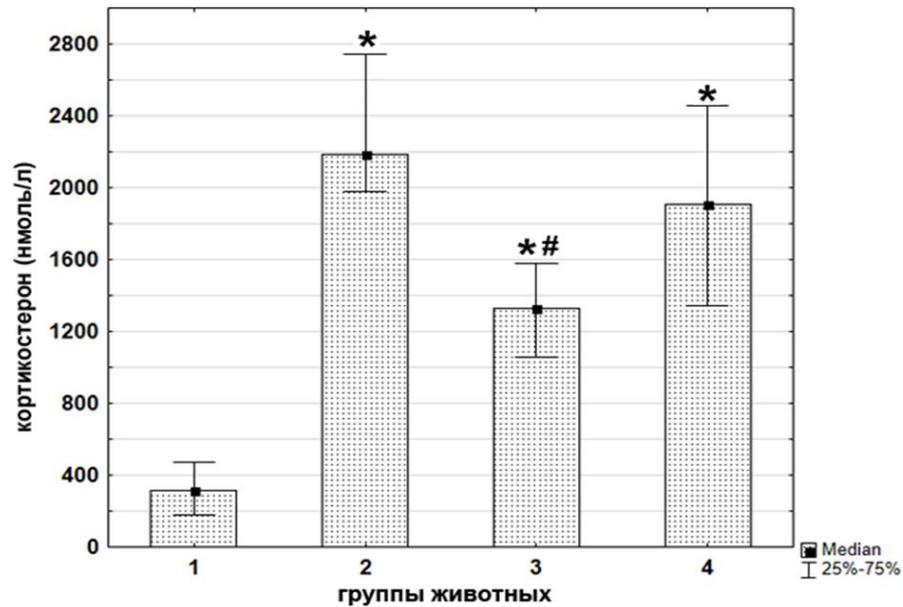


Рисунок 3.6.21 – Содержание кортикостерона в плазме крови крыс через 30 минут после плавательного стресса и введения нативного или трансгенного ЛФ
Группы животных: 1 – интактные, 2 – плавательный стресс и введение воды, 3 – плавательный стресс и введение нативного ЛФ, 4 – плавательный стресс и введение трансгенного ЛФ (n=5 – 7)

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

3.7 Функциональная активность компонентов врожденного иммунитета у больных туберкулезом

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

Нами исследована функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных туберкулезом.

Туберкулез является одним из самых распространенных инфекционных заболеваний. В соответствии с информацией ВОЗ в мире от туберкулеза ежегодно умирает от 1,5 до 2 миллионов человек, заболевает более 8 миллионов человек. Инфицированность составляет до 30% населения Земли (http://www.who.int/trade/distance_learning/gpgh/gpgh3/en/index4.html).

Известно, что у большинства лиц инфицирование *Mycobacterium tuberculosis* не приводит к развитию активного специфического процесса, но у некоторых инфицированных людей активация латентной инфекции приводит к заболеванию туберкулезом. Развитие туберкулезного процесса зависит от активности клеточного звена иммунитета, в первую очередь, макрофагов и лимфоцитов [Flynn, Chan, 2001]. Роль нейтрофилов в развитии этого процесса в настоящее время оценивается как двоякая. На ранней стадии туберкулезной инфекции нейтрофилы могут способствовать защите, благоприятствуя генерации эффекторных Т-клеток и участвуя в образовании гранулем, а на более поздних стадиях они участвуют в механизмах развития деструкции тканей, диссеминации инфекции [Lyadova, 2017]. В то же время есть данные в пользу активного участия нейтрофильных гранулоцитов в противотуберкулезной защите организма, хотя, как правило, полученные в экспериментах на животных [Silva, Silva, 1989; Pedrosa et al., 2000].

В настоящей диссертационной работе определяли антибактериальный потенциал нейтрофилов по содержанию катионных антимикробных белков и пептидов в этих клетках с помощью цитохимического лизосомально-катионного теста (ЛКТ), секреторная активность нейтрофильных гранулоцитов оценивалась по содержанию в сыворотке крови миелопероксидазы (МПО) и лактоферрина (ЛФ), определяемых иммуноферментным методом.

Исследованы показатели врожденного иммунитета у 58 пациентов клиники ГУ СПбНИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ.

У больных туберкулезом легких, почек, позвоночника, половых органов и глаз в фазе максимального проявления признаков заболевания выявлено значительное увеличение, как общего (рис. 3.7.1), так и удельного (из расчета на 1 миллион нейтрофилов) содержания (рис. 3.7.2) анализируемых белков в сыворотке крови, в 4-7 раз превышающее верхнюю границу физиологической нормы.

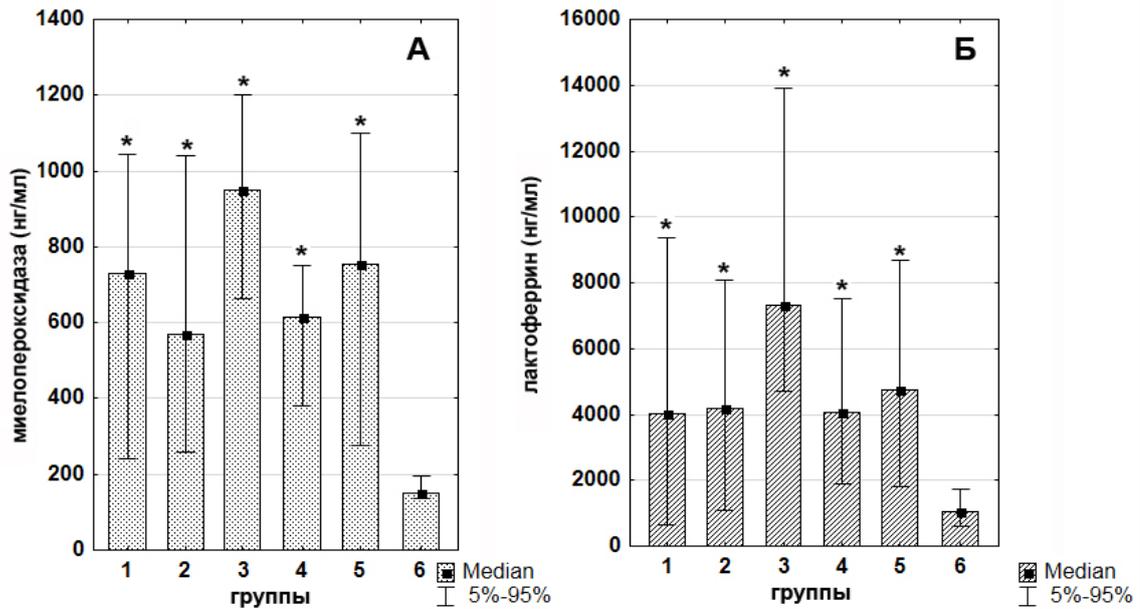


Рисунок 3.7.1 – Содержание миелопероксидазы (А) и лактоферрина (Б) в сыворотке крови больных с различной локализацией туберкулеза
 Группы больных туберкулезом: 1 – легких; 2 – позвоночника; 3 – почек; 4 – половых органов; 5 – глаз; 6 – здоровые доноры
 * – $p < 0,05$ сравнению со здоровыми донорами (по U-критерию Манна-Уитни)

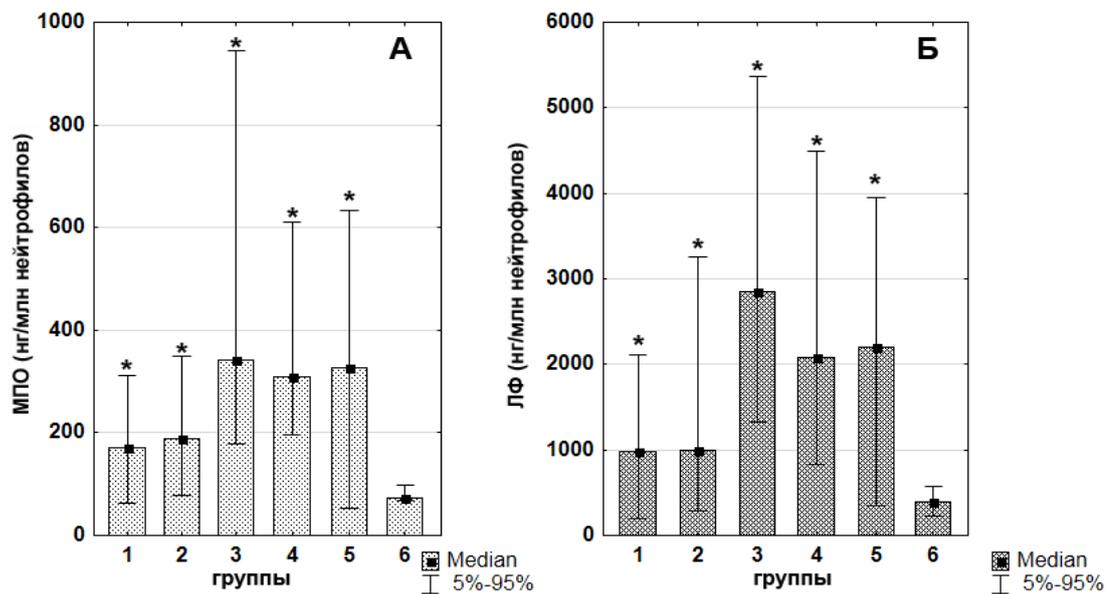


Рисунок 3.7.2 – Относительная концентрация миелопероксидазы (А) и лактоферрина (Б) в сыворотке крови у больных с различной локализацией туберкулеза.
 Группы больных туберкулезом: 1 – легких; 2 – позвоночника; 3 – почек; 4 – половых органов; 5 – глаз; 6 – здоровые доноры
 * – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами (по U-критерию Манна-Уитни)

Определение удельного содержания гранулярных белков важно для оценки уровня их секреции, так как повышение общего содержания этих белков может быть обусловлено нейтрофилезом, характерным для воспалительных процессов, а не повышением их секреции.

Для больных туберкулезом, характерны высокие значения среднего цитохимического коэффициента (СЦК) ЛКТ нейтрофильных гранулоцитов крови (при норме от $1,56 \pm 0,01$, медиана – 1,56 нижний квартиль – 1,55, верхний квартиль – 1,57) (рис. 3.7.3).

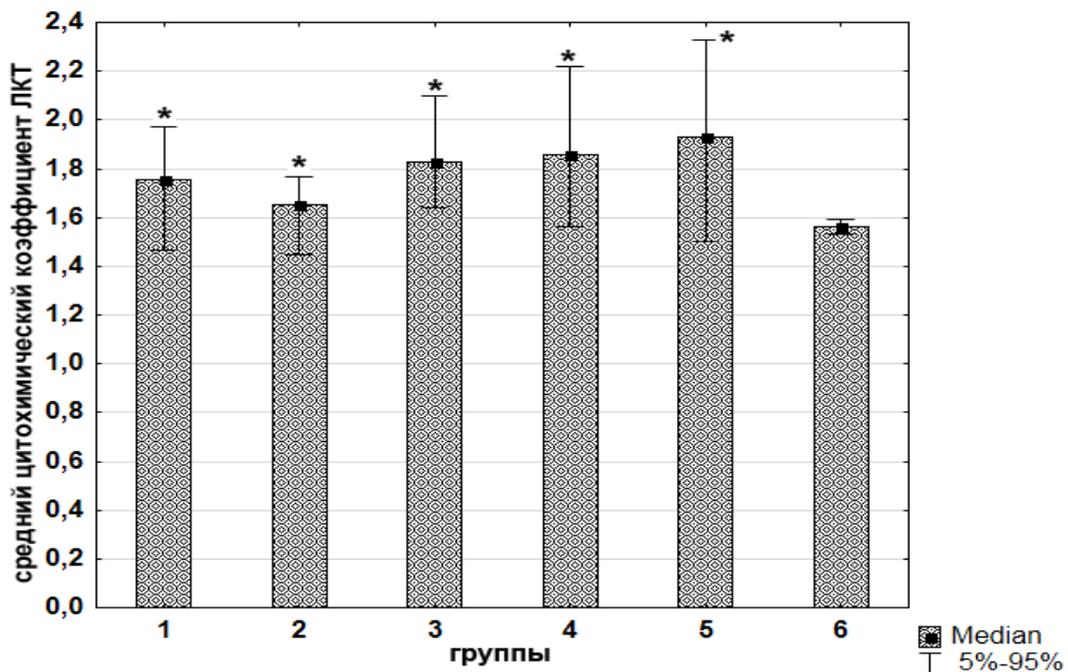


Рисунок 3.7.3 – Внутриклеточное содержание катионных белков в нейтрофилах (по ЛКТ) у больных с различной локализацией туберкулеза.

Группы больных туберкулезом: 1 – легких; 2 – позвоночника; 3 – почек; 4 – половых органов; 5 – глаз; 6 – здоровые доноры

* – $p < 0,05$ по сравнению со здоровыми донорами (по U-критерию Манна-Уитни)

Таким образом, выявлено уникальное сочетание этих показателей у больных туберкулезом: одновременное значительное повышение содержания катионных антимикробных белков и пептидов в нейтрофилах и увеличение количества миелопероксидазы и лактоферрина в сыворотке крови. Необходимо подчеркнуть, что увеличение уровня миелопероксидазы и лактоферрина в крови сопровождается, как правило, снижением содержания катионных антимикробных белков и пептидов в

нейтрофилах, так как синтез МПО и ЛФ в нейтрофильных гранулоцитах происходит и завершается на ранних этапах их дифференцировки в период гранулогенеза и увеличение внеклеточного содержания гранулярных белков сопровождается соответственно снижением их количества внутри клеток [Брызжикова и др., 1995; Осидак и др., 1994].

Следует отметить, что этот результат не явился неожиданностью. В ранних работах по изучению антимикробных факторов врожденного иммунитета было продемонстрировано, что введение лабораторным животным микобактерий туберкулеза вызывает повышение содержания антимикробных пептидов в фагоцитах [Lehrer et al., 1981], правда, там речь шла об альвеолярных макрофагах. Японские исследователи также выявили в плазме крови больных активным туберкулезом легких повышение уровня α -дефенсинов – антимикробных пептидов нейтрофилов [Ashitani et al., 2002]

Следующим этапом работы стало сравнительное исследование показателей врожденного иммунитета при различных клинических формах туберкулеза.

3.7.1 Исследование показателей врожденного иммунитета у больных туберкулезом легких

Проведено исследование содержания МПО и ЛФ в сыворотке крови 61 пациента с различными формами туберкулеза легких:

- первичный туберкулезный комплекс – 3 случая;
- инфильтративный туберкулез – 33 случая;
- кавернозный туберкулез – 3 случая;
- фиброзно-кавернозный туберкулез – 15 случаев;
- казеозная пневмония – 3 случая;
- диссеминированный туберкулез – 4 случая;

Все пациенты с диагнозом – туберкулез легких – лица молодого и среднего возраста 23 – 59 лет. При поступлении бактериовыделение было обнаружено в 67.2% случаев, симптомы интоксикации – в 54% случаев. Только у 15 больных (24.6%) выявлены поражения легких ограниченной протяженности (в пределах 1-2 бронхолегочных сегментов), у остальных имелись долевые и полисегментарные поражения, в том числе 6 сегментов и более – у 34 больных (55.7%).

Все больные получили курс интенсивной противотуберкулезной химиотерапии.

Установлено, что в зависимости от клинической формы туберкулеза значение показателей врожденного иммунитета меняется (таблица 3.7.1). Так, для двух наиболее распространенных форм туберкулеза легких (инфильтративного и фиброзно-кавернозного) характерно различие в содержании МПО в сыворотке крови, и эти величины составляют 1807 ± 297 нг/мл (среднее \pm ошибка среднего), медиана – 1562 нг/мл (нижний квартиль – 655 нг/мл, верхний квартиль – 2420 нг/мл) и 908 ± 116 нг/мл (среднее \pm ошибка среднего), медиана – 777 нг/мл (нижний квартиль – 473 нг/мл, верхний квартиль – 1290 нг/мл) соответственно. То же можно сказать об относительном содержании МПО (из расчета на 10^6 нейтрофилов) у больных ИТ и ФТК: 484 ± 12 нг/ 10^6 клеток (среднее \pm ошибка среднего), медиана – 270 нг/ 10^6 клеток (нижний квартиль – 186 нг/ 10^6 клеток, верхний квартиль – 578 нг/ 10^6 клеток) и 192 ± 20 нг/ 10^6 клеток (среднее \pm ошибка среднего), медиана – 200 нг/млн клеток (нижний квартиль – 123 нг/ 10^6 клеток, верхний квартиль – 258 нг/ 10^6 клеток) соответственно.

У больных с первичным туберкулезным комплексом, строго говоря, не относящегося к легочному туберкулезу, протекающим без распада легочной ткани и интоксикации, значения ЛКТ были в пределах нормы, тогда как значения МПО в сыворотке крови, хотя и значительно ниже, чем у всех других больных, но все же более, чем вдвое выше нормы.

С помощью корреляционного анализа (по Spearman) показана взаимосвязь между содержанием МПО и ЛФ в сыворотке крови и пролиферативной активностью Т-клеток у больных туберкулезом легких. Обратная корреляционная связь выявлена между значениями ЛФ и показателями РБТЛ на туберкулин ($R = -0,31$) и ФГА ($R = -0,41$), а также между значениями МПО и показателями РБТЛ на ФГА ($R = -0,31$). Реакцию бласттрансформации лимфоцитов проводили в ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России.

Таблица 3.7.1 – Показатели врожденного иммунитета у больных различными клиническими формами туберкулеза легких

Показатели	Клинические формы туберкулеза						Норма
	ПТК	ИТ	КТ	ФКТ	ДТ	КП	
ЛФ (нг/мл)	1260 (1090, 1830)	8452 (2640, 12830)	1520 (1065, 2213)	6515 (2831, 9410)	8222 (4842, 11600)	12700 (9032, 23194)	1137 (810, 1510)
МПО (нг/мл)	363 (282, 536)	1562* (655, 2420)	540 (457, 890)	777* (473, 1290)	1089 (814, 1787)	1515 (1289, 3910)	143 (110, 204)
ЛФ (нг/10 ⁶ нейтрофилов)	360 (294, 693)	1660 (579, 3063)	623 (392, 750)	1233 (764, 1895)	1431 (780, 1894)	1559 (587, 4273)	379 (280, 503)
МПО (нг/10 ⁶ нейтрофилов)	93,2 (84,6, 203,0)	270* (186, 578)	199 (155, 365)	200* (123, 258)	174 (130, 300)	279 (84, 480)	47,7 (36,8, 68,0)

ПТК – первичный туберкулезный комплекс; туберкулез: ИТ – инфильтративный; КТ – кавернозный; ФКТ – фиброзно-кавернозный; ДТ – диссеминированный; КП – казеозная пневмония

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

* – $p < 0,05$ отличия показателей врожденного иммунитета группы больных с ИТ от группы больных с ФКТ (по U-критерию Манна-Уитни)

Проведен анализ зависимости показателей врожденного иммунитета, сопряженных с нейтрофилами, от свойств возбудителя, а именно, его жизнеспособности и лекарственной устойчивости. Иммунный ответ организма на инфицирование возбудителями с разными биологическими свойствами различен. Так, по результатам лечения больных, выделявших микобактерии с низкой степенью жизнеспособности, в 70% было достигнуто значительное улучшение и в 30% улучшение. Напротив, при выделении микобактерий с высокой степенью жизнеспособности улучшение состояния пациентов было достигнуто лишь у 30 % больных, у остальных изменений не было или же наблюдалось ухудшение процесса [Вишневский, 2003]. Однако углубленного исследования факторов иммунитета у больных туберкулезом в зависимости от степени жизнеспособности возбудителя не проводили.

Обследован 31 больной инфильтративным туберкулезом легких (клиника Санкт-Петербургского НИИ фтизиопульмонологии Росздрава в 2002-2003гг.).

Все пациенты – лица молодого и среднего возраста 23–59 лет. При поступлении бактериовыделение отмечено в 100% случаев. У 24 больных проведены исследования на лекарственную устойчивость выделенного возбудителя. Из них у 10 пациентов выявлены полирезистентные *M. tuberculosis* (устойчивые к двум противотуберкулезным препаратам и более), эти пациенты составили группу I. У 14 больных выделен возбудитель, устойчивый не более чем к одному препарату, эти пациенты составили группу II. Во всех случаях (31 больной) оценивалась жизнеспособность выделенных у больных *M. tuberculosis* по критериям скорости и массивности роста на питательной среде Левенштейна-Йенсена и Финна-II. Для изучения корреляции между жизнеспособностью *M. tuberculosis* и интенсивностью иммунитета пациенты были разделены на две группы.

Первая группа (1) – 14 больных, у которых выделен возбудитель с низкой жизнеспособностью – рост на питательной среде отсутствует или не превышает 20 колоний при длительности роста более 30 суток. Вторая группа (2) – 17 больных, у которых выделен возбудитель со средней и высокой (больше 100 колоний при длительности роста менее 30 суток) жизнеспособностью. Все больные получили курс интенсивной противотуберкулезной химиотерапии.

Результаты исследования «лекарственной устойчивости» и «жизнеспособности» не совпадали между собой.

У больных легочным туберкулезом, у которых высеваемый возбудитель слабо растет на питательных средах, относительное содержание МПО и ЛФ в сыворотке крови достоверно выше (рис. 3.7.4), чем у больных, инфицированных более жизнеспособным возбудителем. У пациентов с различной лекарственной устойчивостью возбудителей разницы в содержании МПО и ЛФ не выявлено.

Эти результаты частично коррелируют с результатами других исследователей, которые показали, что у больных с полирезистентными *M. tuberculosis* содержание антибактериальных пептидов дефензинов в плазме крови ниже, чем у пациентов с возбудителем чувствительным к антибиотикам [Zhu et al., 2011], то есть интенсивность иммунного ответа организма, в частности системы врожденного иммунитета, на инфицирование возбудителями с разными биологическими свойствами различна.

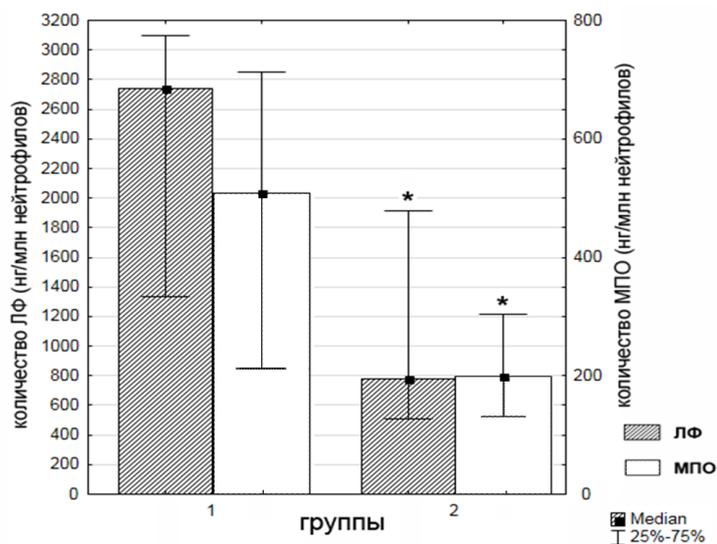


Рисунок 3.7.4 – Относительная концентрация ЛФ и МПО в сыворотке крови у больных инфильтративным туберкулезом, инфицированных возбудителями с различной жизнеспособностью

Больные, у которых возбудитель: 1 – с низкой жизнеспособностью; 2 – с высокой жизнеспособностью

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

3.7.2 Показатели врожденного иммунитета у больных внелегочным туберкулезом

3.7.2.1 Туберкулез почек

Исследованы показатели врожденного иммунитета у 70 пациентов с различными формами туберкулеза почек в возрасте 21-70 лет, из них 50 пациентов (71.4% от числа обследованных) в возрасте 41-65 лет. Продолжительность заболевания нефротуберкулезом до момента выявления колебалась от 1 года (9 больных, 12.9%) до 30 лет (2 больных, 2.9%). Продолжительность заболевания – от 3 до 5 лет и от 6 до 15 лет – у 28 и 14 больных (40% и 20%) соответственно. Пациенты были разделены на две группы. 1 группу составили 28 больных (40%) с ограниченными деструктивными процессами, 2 группу – 42 больных (60%) с монокавернозным и поликавернозным туберкулезом почек. Существенной разницы в симптоматике заболевания, независимо от распространенности и тяжести процесса у больных 1 и 2 групп, не определялось.

Забор материала проводили в течение первых трех дней после госпитализации, до начала противотуберкулезного лечения. Определяли содержание миелопероксидазы и лактоферрина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа, содержание антимикробных белков и пептидов в нейтрофилах периферической крови полуколичественным цитохимическим методом (ЛКТ). Пролиферативную активность Т-лимфоцитов изучали общепринятым методом в реакции бласттрансформации (РБТЛ) под воздействием фитогемагглютинина. Специфический клеточный и гуморальный ответы исследовали с помощью использования туберкулина в РБТЛ и серологических реакций выявления противотуберкулезных антител.

У больных нефротуберкулезом выявлены высокие значения МПО, ЛФ и ЛКТ вне зависимости от тяжести процесса. В то же время удельная концентрация МПО (из расчета на 10^6 нейтрофилов) у больных 2-ой группы, достоверно выше, чем в 1 группе. Ни у одного из этих больных показатели врожденного иммунитета не соответствовали норме ($p < 0.05$ по критерию Манна-Уитни) (табл. 3.7.2.).

Таблица 3.7.2 – Показатели врожденного иммунитета у больных туберкулезом почек

Показатели	Пациенты		Без заболевания
	1 группа	2 группа	
СЦК ЛКТ	1,90±0,07 1,78 (1,80; 2,08)	1,79±0,06 1,78 (1,63; 1,91)	1,56±0,01 1,56 (1,55; 1,57)
ЛФ (нг/мл)	9180±890 8864 (2560, 12340)	9002±263 8722 (4420, 11120)	1250±95 1137 (810, 1510)
МПО (нг/мл)	912±40 827 (536, 1190)	965±49 878 (613, 1270)	160±12 143 (110, 204)
ЛФ (нг/ 10 ⁶ нейтрофилов)	3166±65 2736 (1762, 3685)	3650±89 3280 (1854, 4095)	416±48 379 (280, 503)
МПО (нг/10 ⁶ нейтрофилов)	339±68* 300* (233, 468)	511±79* 470* (387, 688)	59±5 47,7 (36,8, 68,0)

* – $p < 0,05$ отличия показателей больных 1 группы от больных 2 группы (по U-критерию Манна-Уитни)

Данные представлены как – среднее±ошибка среднего; медиана (нижний квартиль, верхний квартиль)

У больных нефротуберкулезом выявлена корреляция между содержанием МПО и ЛФ в сыворотке крови и пролиферативной активностью Т-клеток. Исключительно высокая удельная концентрация МПО у наиболее тяжелых больных сочеталась с отчетливо выраженным повышением функциональной активности Т-лимфоцитов в ответ на туберкулин. Показана прямая коррелятивная связь между удельной концентрацией МПО, специфической пролиферацией Т-клеток и стимулированной секрецией ИЛ-2 и ИЛ-2РР- α (растворимый рецептор ИЛ-2) (в разных сочетаниях $R = 0,47-0,59$; $p < 0,05$).

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

Таким образом, осуществленный анализ подтверждает высокую степень информативности предлагаемых тестов для установления факта наличия туберкулезного процесса и оценки тяжести течения заболевания.

3.7.2.2 Спондилит

Современные способы визуализации заболеваний позвоночника, включающие компьютерную томографию, позволяют выявить патологические изменения в позвонках в начальной стадии заболевания, однако, не их этиологию. Поэтому дифференциальная диагностика туберкулеза позвоночника и гематогенного остеомиелита позвоночника остается сложной. Частота диагностических ошибок достигает 85%, что связано со схожестью клинико-рентгенологической картины этих заболеваний. В последнее десятилетие изменилось классическое хроническое малосимптомное течение туберкулеза позвоночника, стали чаще встречаться остро текущие формы с быстрым прогрессированием, ранним развитием осложнений, тяжелым клиническим течением, сходным с остеомиелитом позвоночника. Изменилось и классическое острое течение гематогенного остеомиелита, что связано с ранним и широким использованием современных антибиотиков, быстро снимающих воспаление, что привело к снижению тяжелых септических форм, быстрому переходу заболевания в подострую стадию.

Исследованы показатели врожденного иммунитета у пациентов, страдающих различными заболеваниями позвоночника. Обследовано 75 больных активным туберкулезным спондилитом и гематогенным остеомиелитом позвоночника в возрасте от 17 до 74 лет, поступивших в отделение хирургии туберкулеза позвоночника СПб НИИ фтизиопульмонологии. Больные активным туберкулезным спондилитом были разделены на две группы в зависимости от выраженности воспалительных изменений в телах позвонков и окружающих мягких тканях. В 1 группу вошли 27 больных (60%) с превалированием экссудативно-некротического компонента воспаления, во 2 группу – 18 больных (40%) – пролиферативного. У пациентов 1 группы наблюдалось прогрессирующее течение туберкулеза позвоночника с выраженными явлениями нагноения в паравертебральных тканях и телах позвонков и развитием неврологических нарушений. Туберкулезный спондилит у пациентов 2 группы характеризовался хроническим волнообразным течением, отсутствием нагноения в паравертебральных

тканях, забрюшинных пространствах. У большинства выявлялись небольшие эпидуральные абсцессы.

Третью группу составили 30 больных гематогенным остеомиелитом позвоночника в острой и подострой стадиях.

Диагноз туберкулезного спондилита у всех больных верифицирован гистологическим и бактериологическим методами исследования. Диагноз остеомиелита позвоночника поставлен на основании выявления вторичной микрофлоры (микрофлоры) в операционном материале и гистологической картины, подтверждающей остеомиелит.

Исследовано внеклеточное содержание миелопероксидазы и лактоферрина методом иммуноферментного анализа в сыворотках крови и внутриклеточное содержание антимикробных катионных белков и пептидов (миелопероксидазы, лактоферрина, дефенсинов) полуколичественным цитохимическим методом (ЛКТ) в нейтрофилах периферической крови больных туберкулезом и остеомиелитом (таб. 3.7.2.2.1).

У подавляющего большинства больных в острой стадии специфического и неспецифического спондилита обнаружено исключительно высокое содержание миелопероксидазы и лактоферрина, а также удельное содержание тех же белков. В то же время для больных первой группы (туберкулезный спондилит) характерны высокие показатели ЛКТ, тогда как при остеомиелите не наблюдалось повышения ЛКТ. Таким образом, выявлены различия в показателях врожденного иммунитета, что в сочетании с другими иммунологическими и рентгенологическими методами может способствовать раннему правильному установлению диагноза.

При туберкулезном спондилите происходит повышение содержания внутри- и внеклеточных катионных нейтрофильных белков при утяжелении специфического процесса. У больных 1 группы с распространенными экссудативными воспалительными изменениями концентрация ЛФ в сыворотке крови, удельная концентрация МПО и показатель ЛКТ существенно выше, чем у больных 2 группы с ограниченными деструктивными процессами (табл. 3.7.3).

Таблица 3.7.3 – Показатели врожденного иммунитета у больных спондилитом различной этиологии

Показатели	Пациенты			Норма
	1 группа	2 группа	3 группа	
СЦК ЛКТ	1,72±0,01 ^О 1,72 ^О (1,71;1,73)	1,58±0,04 [#] 1,57 [#] (1,51; 1,59)	1,59±0,09* 1,57* (1,46; 1,62)	1,56±0,01 1,56 (1,55; 1,57)
ЛФ (нг/мл)	4400±760 ^О 4122 ^О (2420, 5870)	1346±203 [#] 1244 [#] (1110, 1870)	3187±131 ^{**О} 3268 ^{**О} (1880, 4610)	1250±95 1137 (810, 1510)
МПО (нг/мл)	637±52 ^О 590 ^О (518, 790)	453±12 ^О 438 ^О (376, 520)	592±10 ^О 576 ^О (439, 648)	160±12 143 (110, 204)
ЛФ (нг/10 ⁶ клеток)	1414±314 ^О 1178 ^О (755, 1856)	976±94 ^О 794 ^О (562, 1120)	1479±206 ^О 1223 ^О (774, 1925)	416±48 379 (280, 503)
МПО (нг/10 ⁶ клеток)	186±25 ^О 198 ^О (118, 248)	116±10 ^{#О} 92 ^{#О} (78, 176)	188±12 ^{**О} 202 ^{**О} (132, 250)	59±5 47,7 (36,8, 68,0)

– p<0,001 отличие показателей у больных 1 группы от больных 2 группы (по U-критерию Манна-Уитни)

* – p<0,05 отличие показателей у больных 1 группы от больных 3 группы (по U-критерию Манна-Уитни)

** – p<0,05 отличие показателей у больных 2 группы от больных 3 группы (по U-критерию Манна-Уитни)

^О – p<0,05 отличие показателей больных от контрольной группы (по U-критерию Манна-Уитни)

Данные представлены как – среднее±ошибка среднего; медиана (нижний квартиль, верхний квартиль)

Туберкулезный спондилит – длительное хроническое волнообразно протекающее заболевание позвоночника. Стадия обострения может протекать как остро, с фебрильной лихорадкой, резкими болями, так и малосимптомно, с длительным периодом неясного дискомфорта в области позвоночника. Определение активности туберкулезного процесса в позвоночнике необходимо для уточнения стадии заболевания, выбора лечебной тактики и контроля за эффективностью лечения.

Обследовано 39 больных туберкулезным спондилитом в отделении хирургии туберкулеза СПб НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ. 1-ю группу составили 27 больных туберкулезным спондилитом в стадии обострения, 2-ю – 12 больных туберкулезным спондилитом в стадии ремиссии.

Результаты обследования больных первой группы:

- 1) Величина СЦК ЛКТ $\geq 1,6$ (1,6 – 1,99) у 26 больных, у одного – 1,53.
- 2) Концентрация МПО в сыворотке крови выше 200 нг/мл (223 – 951 нг/мл) зарегистрирована у 25 больных, у двух – ниже 200 нг/мл (135 и 162 нг/мл).
- 3) Концентрация ЛФ в сыворотке крови выше 1300 нг/мл (1361 – 6208 нг/мл) выявлена у всех больных.

Результаты обследования второй группы:

- 1) СЦК ЛКТ $< 1,6$ (1,31 – 1,56) выявлен у всех 12 больных.
- 2) Концентрация МПО в сыворотке крови ниже 200 нг/мл (74 – 162 нг/мл) определена у 11 больных, у одного – 207 нг/мл.
- 3) Концентрация ЛФ в сыворотке крови ниже 1300 нг/мл (326 - 1292 нг/мл) обнаружена у 10 пациентов, концентрация ЛФ > 1300 нг/мл – у двух (1531 и 1795 нг/мл).

На основании анализа полученных данных предложена методика 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 $\geq 1,6$, 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 позволит врачам решить вопрос о необходимости хирургического лечения.

Для подтверждения этого заключения можно привести два характерных клинических примера.

1. Больной П., 30 лет, и/б № 78, болен туберкулезным спондилитом 3 года, в течение последних 6 месяцев получал противотуберкулезное лечение с улучшением. Рентгенологически: очаги деструкции в телах Th 7-10 позвонков. В клиническом

анализе крови изменений нет. СЦК ЛКТ – 1,6, концентрация МПО в сыворотке крови – 943 нг/мл, концентрация ЛФ в сыворотке крови – 6208 нг/мл. Процесс признан активным. Во время операции найдены очаги деструкции в телах Th 7-10 с грануляциями и гноем. Больному в послеоперационном периоде проводилось противотуберкулезное лечение в течение 12 месяцев.

2. Больная Б., 53 года, и/б № 82, страдает туберкулезом позвоночника 35 лет, отмечает ухудшение в последние 3 года в виде появления болей и неврологических нарушений. Рентгенологически: очаги деструкции в телах Th 7-12. В клиническом анализе крови без патологии. СЦК ЛКТ – 1,56, концентрация МПО в сыворотке крови – 152 нг/мл, концентрация ЛФ в сыворотке крови – 492 нг/мл. Процесс в позвоночнике признан не активным. Во время операции обнаружены сухие обызвествленные казеозные массы без признаков активации туберкулезного процесса.

На основании результатов исследования подготовлены Методические рекомендации «Определение активности туберкулезного спондилита» для внедрения этого метода в практику лечебных учреждений Минздравсоцразвития РФ, также получен патент РФ «Способ определения активности туберкулезного спондилита» RU 2308723 С2 (опубликовано 20.10.2007).

Таким образом, проведенное исследование показало, что 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.

Следует отметить, что в работе британских исследователей, которые изучали транскрипционный профиль клеток крови больных туберкулезом, наибольшие изменения транскрипционной активности выявлены в нейтрофилах, причем эти профили также отличались от профилей больных со стрептококковой и стафилококковой инфекцией [Berry et al., 2010], что подтверждает особую роль нейтрофильных гранулоцитов в развитии туберкулезной патологии.

3.8 Функциональная активность компонентов врожденного иммунитета у больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей

Функциональная активность нейтрофилов изменяется не только при инфекционных заболеваниях, но и при других формах патологии.

Потенциал защитных функций организма в значительной степени зависит от степени активности нейтрофильных гранулоцитов, а именно, содержания биологически активных соединений в их гранулах и адекватного их реагирования на внешние воздействия – увеличения фагоцитарной и антимикробной активности, выделения (секреции) гранулярного содержимого (миелопероксидазы, лактоферрина и пр.) во внеклеточную среду, генерирования активных форм кислорода.

Генерация активных форм кислорода фагоцитами представляет собой важный элемент защитных реакций организма, с другой стороны, нарушение баланса между интенсивностью образования свободных радикалов и активностью антиоксидантной системы играет существенную роль в патогенезе многих заболеваний. Известно, что свободнорадикальный механизм повреждения тканей играет важную роль при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, атеросклерозе, ишемии миокарда и др. [Martinez-Cayuela, 1995]. В условиях механической травмы и острой кровопотери также может наблюдаться подобный дисбаланс, приводящий к дополнительным повреждениям клеточных структур и образованию токсичных соединений.

Согласно литературным данным исследования уровня генерации свободных форм кислорода при травмах и кровопотерях проводятся на различных моделях. Некоторые исследователи используют изолированные клетки. Так, лимфа павиана, подвергнутого геморрагическому шоку, повышает уровень «окислительного взрыва» нейтрофилов человека, стимулированных фторбол-12-миристан-13-ацетатом [Deitch et al., 2006]. Однако процедура выделения клеток может привести к дополнительной активации, поэтому результаты таких исследований не всегда можно адекватно соотнести с процессами, протекающими в целостном организме. На это указывают и данные авторов, изучающих функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов у больных с различными травмами, в том числе и уровень генерации активных форм кислорода этими клетками. Показано, что стимулированная продукция супероксидного радикала нейтрофильными гранулоцитами больных с травмой, определяемая методом

хемотропности в цельной крови, взятой в течение 2-8 часов после поступления в клинику, отличается от таковой у изолированных нейтрофилов [Pallister et al., 2006; Pallister, Topley, 2004].

Следует подчеркнуть, что миелопероксидаза непосредственно вовлечена в метаболизм активных форм кислорода, высокий уровень содержания этого фермента в тканях может способствовать образованию хлораминов, которые, являясь своеобразными сигнальными молекулами, могут влиять на генерацию макрофагами медиаторов воспаления [Marcinkiewicz et al., 1995].

Исследована спонтанная и стимулированная фторбол-12-мирилат-13-ацетатом генерация супероксидного радикала фагоцитами крови, а также секреторная активность нейтрофильных гранулоцитов и внутриклеточное содержание гранулярных белков нейтрофилов – миелопероксидазы и лактоферрина, у больных со сложной сочетанной травмой и острой кровопотерей. Эти функциональные показатели исследованы у больных с тяжелой сочетанной травмой: 18 человек – в первые сутки поступления в стационар, 13 человек – на 14-е сутки нахождения в стационаре, а также с острой кровопотерей – 13 и 9 человек (в первые сутки поступления в стационар и на 14-е сутки нахождения в стационаре соответственно) и у здоровых добровольцев – 8 человек.

В исследовании использована венозная кровь пациентов с тяжелой сочетанной травмой (без черепно-мозговых травм) и острой кровопотерей, а также кровь здоровых добровольцев. Кровь из вены забирали стандартным методом в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (цитрат и гепарин).

Все пациенты проходили лечение в НИИ Скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург. Забор крови проводили трижды: первый раз – в течение первых суток от момента госпитализации; второй раз – на 7-е сутки; третий раз – на 14-е сутки нахождения в стационаре.

Уровень генерации супероксидного радикала у больных определяли с использованием теста с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в биохимической модификации – этот показатель довольно полно отражает функциональную активность кислород-зависимой антимикробной системы нейтрофилов.

Секреторную активность нейтрофилов оценивали методом иммуноферментного определения миелопероксидазы и лактоферрина в плазме крови. Количество этих белков в крови свидетельствует об интенсивности выброса катионных антимикробных

белков и пептидов во внеклеточную среду при воздействии на организм различных факторов.

Для оценки внутриклеточного содержания этих белков сравнивали содержание миелопероксидазы и лактоферрина в плазме крови больных с содержанием этих же белков в плазме того же образца крови, но после добавления препарата форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА), вызывающего дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов. Чем больше разница в этих показателях, тем выше внутриклеточное содержание антимикробных белков. Дополнительным приемом для оценки внутриклеточного содержания гранулярных белков является нормализация полученных значений концентраций белков в плазме к количеству нейтрофильных гранулоцитов в образце крови.

В течение первой недели после травмы происходит повышение количества нейтрофильных гранулоцитов как у больных с острой кровопотерей, так и при сочетанной травме (рис. 3.8.1).

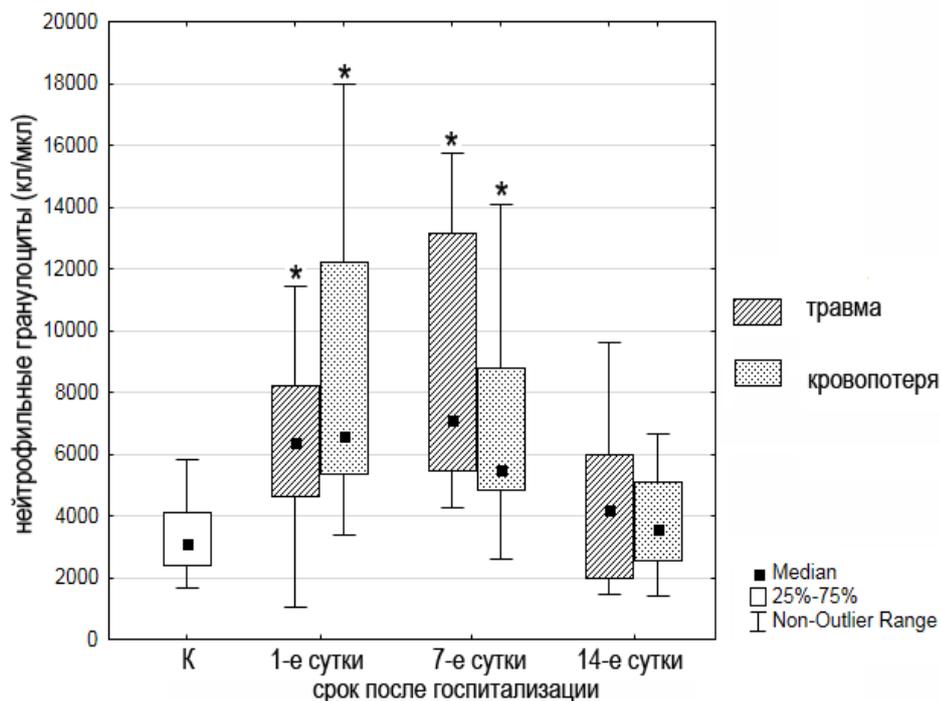


Рисунок 3.8.1 – Количество нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей

К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

Результаты исследования уровня генерации супероксидного радикала у больных с острой кровопотерей, больных с тяжелой сочетанной травмой и здоровых добровольцев (рис. 3.8.2 и 3.8.3) Свидетельствуют о том, что показатели спонтанного НСТ-теста у больных с кровопотерями не отличаются от данных, полученных у здоровых людей на протяжении 14 дней наблюдения, в то время как у больных с сочетанными травмами наблюдается резкое снижение этого показателя в первый день после травмы. В то же время уровень стимулированного НСТ-теста в первый день наблюдений снижен у больных с кровопотерей, и с сочетанной травмой. В дальнейшем у больных с кровопотерей они восстанавливаются до нормальных значений уже к седьмому дню наблюдений, а у больных с сочетанной травмой – к четырнадцатому.

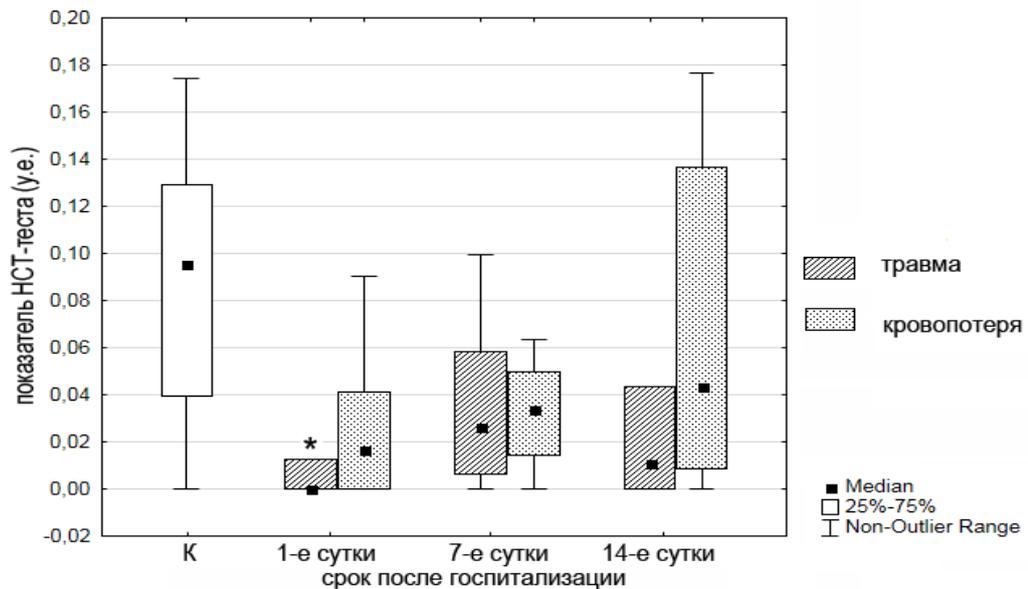


Рисунок 3.8.2 – Показатели спонтанного НСТ-теста (в условных единицах) у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей

К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

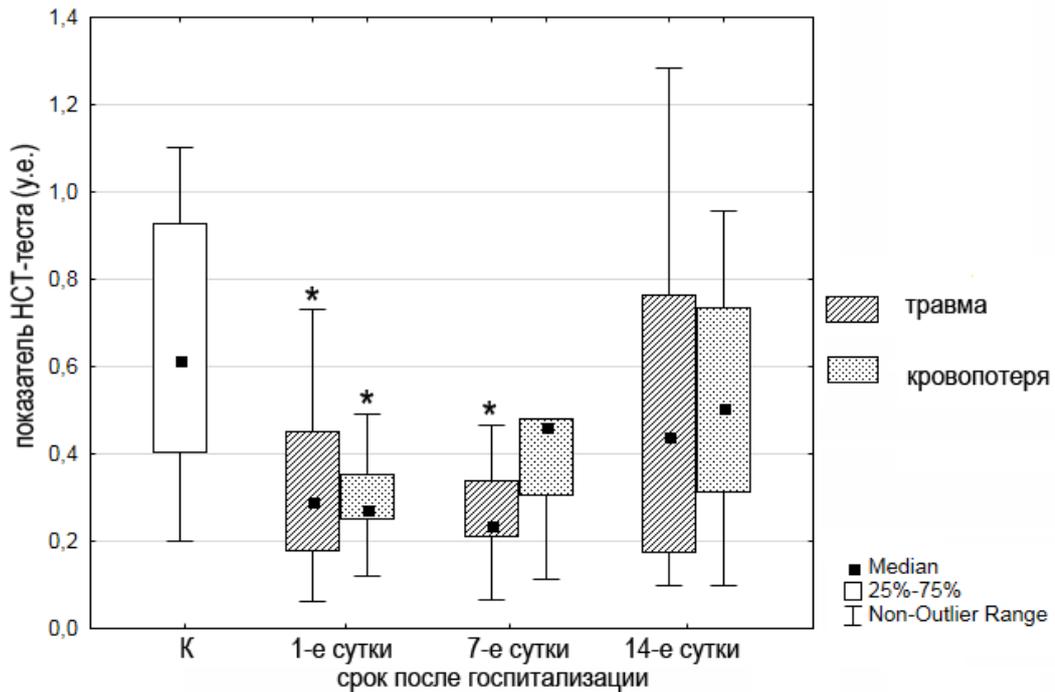


Рисунок 3.8.3 – Показатели стимулированного НСТ-теста (в условных единицах) у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей

К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

Исследование секреторной активности нейтрофильных гранулоцитов и внутриклеточного содержания миелопероксидазы (МПО) и лактоферрина (ЛФ) у больных с острой кровопотерей, больных с тяжелой сочетанной травмой и здоровых добровольцев (рис. 3.8.4-3.8.7) позволило констатировать, что содержание МПО в плазме крови у больных с острой кровопотерей и с тяжелой сочетанной травмой в течение 14 дней наблюдения повышено, что коррелирует с повышением количества нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови больных. В то же время внутриклеточное содержание МПО остается в норме, оно понижается только у пациентов с сочетанной травмой на седьмой день наблюдения.

Содержание лактоферрина в плазмах крови у больных с острой кровопотерей и тяжелой сочетанной травмой не отличается от значений у людей контрольной группы. Особый интерес представляют данные о внутриклеточном содержании ЛФ. Оно снижено у всех больных в течение недели наблюдения, к 14 суткам у больных с сочетанной травмой оно нормализуется, а у больных с кровопотерей остается низким.

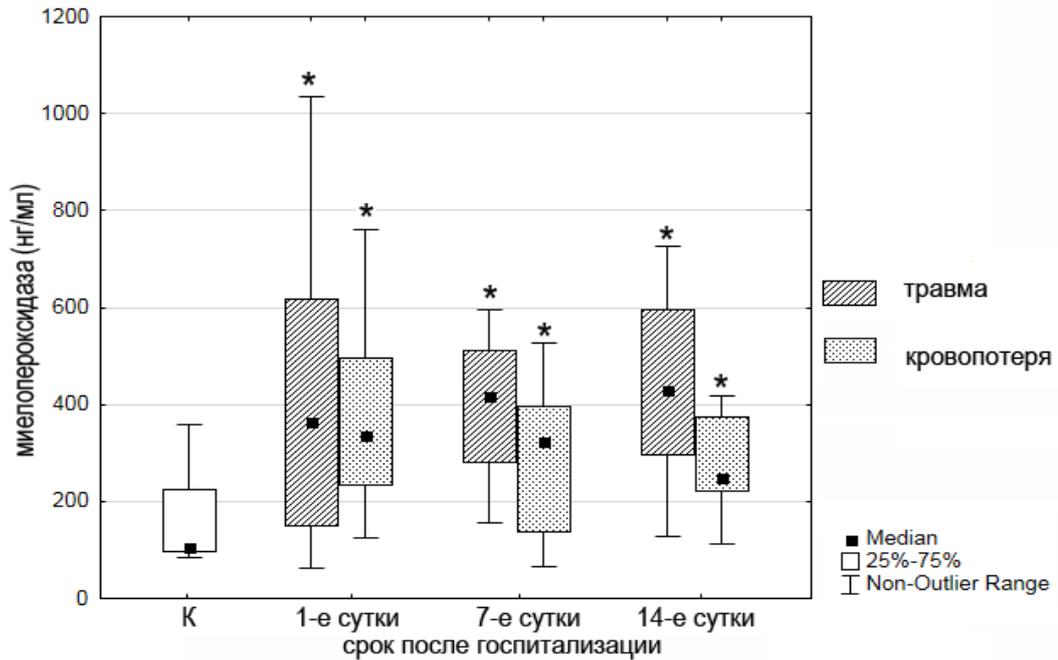


Рисунок 3.8.4 – Содержание миелопероксидазы в плазме крови у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей.

К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

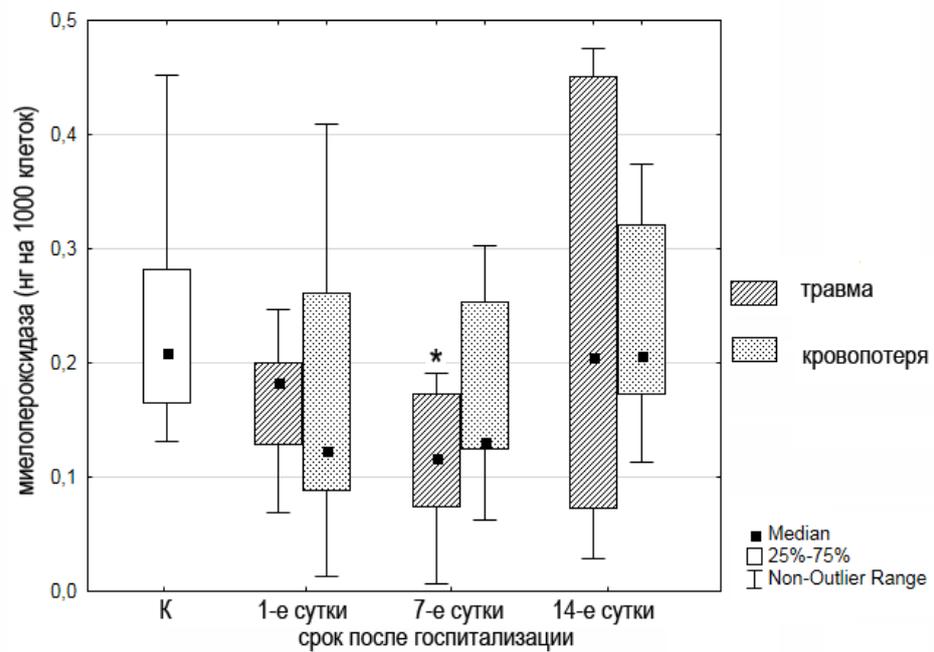


Рисунок 3.8.5 – Количество миелопероксидазы в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых добровольцев и с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей

К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

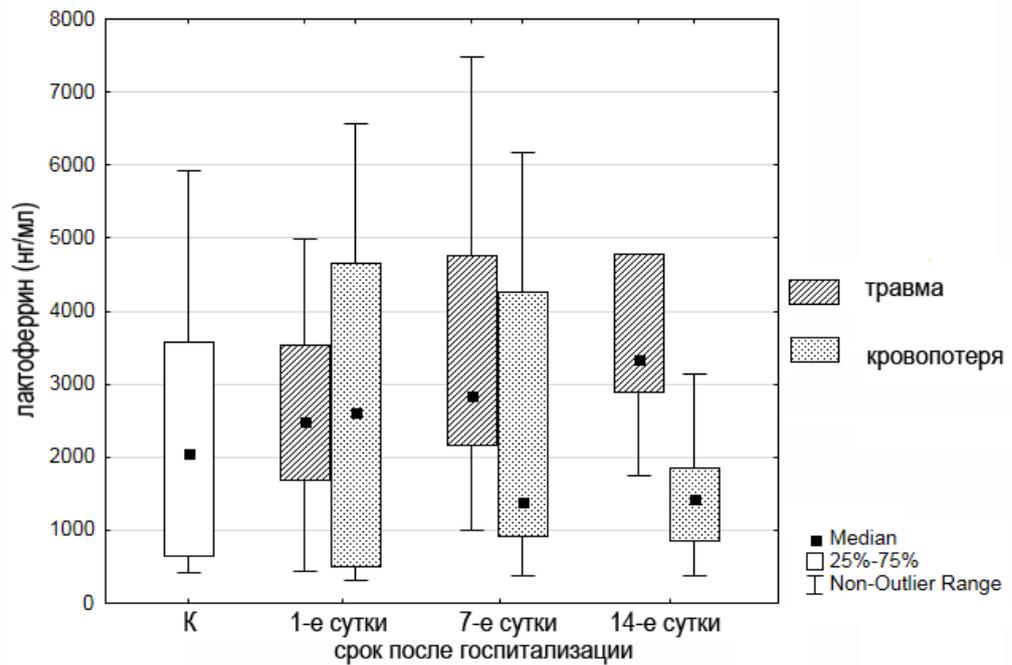


Рисунок 3.8.6 – Количество лактоферрина в плазме крови у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей
К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

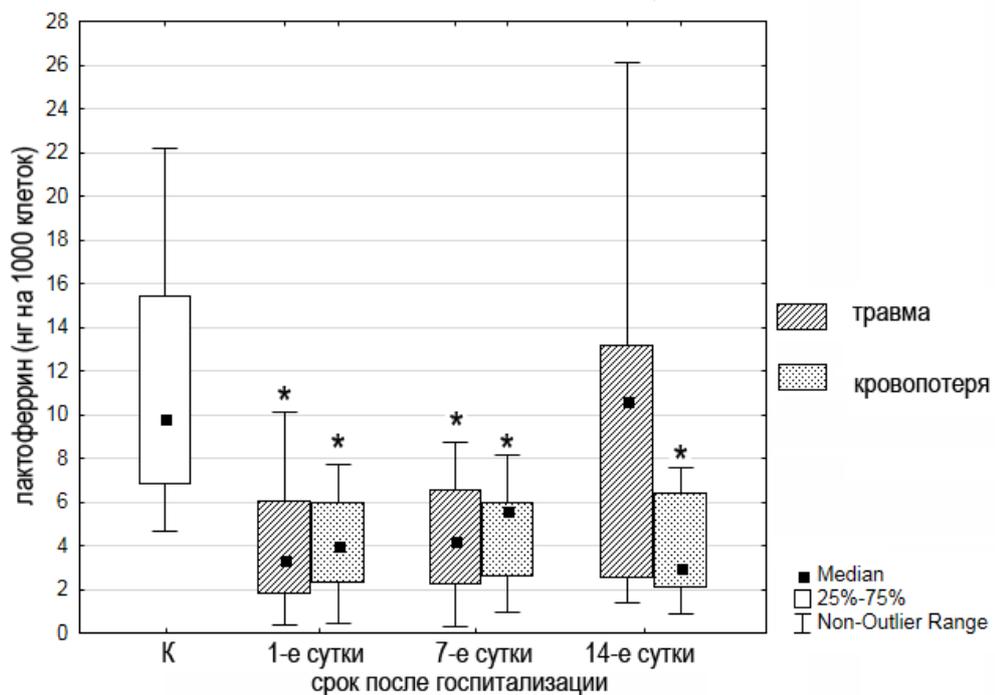


Рисунок 3.8.7 – Количество лактоферрина в нейтрофильных гранулоцитах у здоровых добровольцев и больных с тяжелой сочетанной травмой и острой кровопотерей
К – здоровые добровольцы

* – $p < 0,05$ по сравнению с группой добровольцев (по U-критерию Манна-Уитни)

Полученные результаты позволяют заключить, что в течение суток после травмы происходит снижение интенсивности стимулированного дыхательного взрыва в нейтрофильных гранулоцитах пациентов. У пациентов с тяжелыми сочетанными травмами эти изменения сохраняются в течение недели.

Внутриклеточное содержание лактоферрина у пациентов с тяжелой сочетанной травмой нормализуется через две недели, тогда как у пациентов с острой кровопотерей его количество остается ниже нормы в течение всего времени наблюдения (14 суток после травмы), что может способствовать развитию инфекционных осложнений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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, открывает новые пути и возможности для коррекции этих нарушений и, таким образом, лечения заболеваний различной природы.

В последнее 30-летие произошло несколько важных открытий в исследовании молекулярно-клеточных механизмов врожденного иммунитета, систематизация которых качественно изменила ряд традиционных представлений иммунологической парадигмы. Во-первых, благодаря концепции о патоген-ассоциированных молекулярных паттернах (липополисахариды, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны, двухцепочечная РНК вирусов, неметилированные по цитозину тандемы CpG ДНК бактерий и вирусов) и распознающих их рецепторах (Toll-подобные рецепторы, лектиновые рецепторы, сквенджер-рецепторы), оставлено устаревшее представление о неспецифическом характере защитных реакций врожденного иммунитета [Janeway, 1989; Janeway, Medzhitov, 2002]. Во-вторых, в этот период сформировалась современная концепция о природе молекулярных механизмов, ответственных за реализацию эффекторной, в том числе киллерной, фазы защитных реакций врожденного иммунитета [Кокряков, 1999, 2006; Lehrer, Ganz, 2002; Zasloff, 2002]. Согласно этой концепции представление о совокупности антимикробных пептидов (дефенсины, кателицидины, цекропины, магейнины и др.) и белков (лизоцим, серпроцидины, лактоферрин, пероксидазы и др.) как неотъемлемом молекулярном компоненте противоинфекционного иммунитета животных, является основополагающим.

Антимикробные белки и пептиды присутствуют во всех живых организмов, как у животных (от кишечнополостных до млекопитающих), так и у растений. Они являются частью древнейшей защитной системы жизнедеятельности и эволюционировали вместе с ней, вовлекаясь в регуляцию и реализацию функций, как связанных, так и не связанных напрямую с антимикробной защитой.

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

В настоящей работе охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам открытые нами 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 семейству антимикробных пептидов.

Впервые показано, что циклические θ -дефенсины RTD-2, RTD-3 и RTD-1 лейкоцитов 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 антимикробного действия, могут иметь важное практическое значение. Исследуемые антимикробные белки и пептиды являются перспективными объектами для применения в медицине и ветеринарии в качестве антибиотиков, противовоспалительных и иммуномодулирующих препаратов нового поколения.

В частности, низкая молекулярная масса ареницинов в сочетании с широким спектром их антимикробного действия, эффективностью повреждающего воздействия на клетки микроорганизмов, в том числе грибков и низкой гемолитической активностью [Краснодембская, 2007] делают эти молекулы перспективными объектами для дальнейшего химического синтеза и применения в медицине и ветеринарии. Так, биотехнологическая фирма Adenium Biotech (Дания) уже разрабатывает препараты на основе ареницина-3.

В то же время нельзя сказать, что препараты, созданные на основе антибиотических пептидов успешно внедряются в медицинскую практику [Koo, Seo, 2019]. Возможно, это обусловлено тем, что биологические эффекты действия АМП в условия *in vitro* и *in vivo* могут существенно 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 такое действие зависит не только от способности пептидов связывать ЛПС *in vitro*. Наличие у пептидов эндотоксин-нейтрализующей активности определяли по ингибирующему действию пептидов на экспрессию гена провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в мононуклеарных клетках крови крыс после введения животным ЛПС. Для антибиотических пептидов – дефенсина человека HNP-1, профенина-1, протегрина-1, PR-39 – продемонстрировано наличие эндотоксин-нейтрализующей активности, в то время как введение ареницина-1 не снижало уровень ЛПС-индуцированной экспрессии цитокина ИЛ-1 β , хотя ЛПС-связывающая активность ареницина в условиях *in vitro* была такой же как и у исследуемых кателицидинов свиньи (профенина-1, протегрина-1, PR-39), а у дефенсина человека HNP-1 – на порядок ниже. При этом, в структурном отношении ареницины схожи с протегринами – катионный заряд, молекулярная масса около 2000 Да, вторичные структуры и тех и других молекул представляют из себя амфипатические β -шпильки. По-видимому, этого недостаточно, чтобы пептид беспозвоночных мог воздействовать с тем же успехом на клеточные мишени у высших позвоночных. Можно сказать, что ареницин не эффективен как потенциальный препарат для борьбы с сепсисом, в то же время данные, полученные в настоящей работе, говорят, что таким препаратом может быть профенин.

В условиях *in vitro* антимикробные пептиды – дефенсин человека HNP-1, протегрин-1, PR-39, но не профенин-1, усиливают продукцию супероксидного радикала клетками цельной крови крыс. Аналогичные результаты получены при исследовании действия пептидов *in vivo* – при введении крысам протегрина-1 и PR-39 усиливается продукция супероксидного радикала, оцениваемая по НСТ-тесту, и соответственно повышается уровень перекисного окисления липидов, как в случае предварительного введения животным ЛПС, так и без него. Однако профенин-1 не усиливает спонтанную продукцию супероксидного радикала клетками крови и не повышает уровень

перекисного окисления липидов, в отличие от других испытываемых пептидов. Более того, введение профенина крысам после введения ЛПС не только снижало ЛПС-стимулированную экспрессию гена провоспалительного цитокина ИЛ-1 β в моноцитах, но и уменьшало концентрацию этого цитокина и ИЛ-10 в плазме крови.

Таким образом, профенин-1 обладает оптимальным набором свойств для 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 цитотоксическое действие на эукариотические клетки [Wessely-Szponder et al., 2010].

Возвращаясь к сравнению действия антимикробных пептидов в условиях *in vivo* и *in vitro*, следует отметить, что ЛПС-нейтрализующая активность исследуемых антимикробных пептидов не проявлялась в экспериментах на выделенных моноцитах крови человека. Дефенсин HNP-1 и кателицидины профенин-1 и PR-39 не снижали ЛПС-стимулированную экспрессию гена ИЛ-1 β ни через 2 часа, ни через 24 часа совместной инкубации.

Выявленные различия биологических эффектов пептидов *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, зависимых от нейроэндокриноиммунных взаимодействий.

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, что по предположению авторов было обусловлено конкурентным связыванием дефенсинов с рецептором АКТГ [Solomon, 1993]. Позднее 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]. Эти результаты получили подтверждение в работах американских исследователей, показавших, что введение

химически синтезированного кортикостатина-1 крысы (дефенсин RatNP-1) снижает уровень кортикостерона в крови крыс при стрессе [Cervini, et al., 1995].

В настоящем исследовании впервые показано, что введение крысам дефенсина RatNP-3, не проявляющего кортикостатического действия в модельной системе *in vitro* [Solomon, 1993], снижает стресс-индуцированный уровень кортикостерона в крови экспериментальных животных в той же степени, как и 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.

Повышение уровня глюкокортикоидных гормонов – только одна из ответных реакций организма на стрессирующие воздействия. Еще одной важнейшей реакцией организма при стрессе является нейтрофилез – повышение относительного и абсолютного количества нейтрофильных гранулоцитов в крови. Одновременно увеличивается содержание белков и пептидов, секретируемых нейтрофилами в плазму крови по мерокриновому механизму. Это изменение происходит не только за счет, собственно, нейтрофилеза, но и как показано в настоящем исследовании в результате более интенсивной дегрануляции нейтрофилов в ходе стресс-реакции.

Превентивное введение крысам дефенсинов RatNP-1 и RatNP-3 нормализует процентное содержание нейтрофилов в крови как через 30 минут после стрессирующего воздействия, когда происходит уменьшение процентного содержания нейтрофилов, так и через 3 часа, когда оно увеличивается. Также введение дефенсинов нормализует абсолютное число нейтрофилов. На основании полученных данных можно предположить, что дефенсины, секретируемые нейтрофилами в кровь, вовлечены в формирование механизмов обратной связи, направленных на снижение числа циркулирующих нейтрофилов.

Известно, что стресс влияет на экспрессию генов некоторых цитокинов и их продукцию [Black, Garbutt, 2002; De Miguel et al., 2017]. В проведенном исследовании впервые показано, что в условиях используемой экспериментальной модели плавательного стресса имеет место 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 (модулирующем) 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 структурно-функциональный гомеостаз в процессе развития стресс-реакции.

Другим важным компонентом гранул нейтрофильных гранулоцитов является лактоферрин – один из самых полифункциональных белков в организме млекопитающих. Проведенное исследование показало, что он проявляет также и стресс-протективные свойства. Предварительное введение лактоферрина человека снижает стресс-стимулированное повышение уровня кортикостерона в крови крыс и уровня экспрессии генов ИЛ-4 и TLR4 в селезенке.

Полученные результаты указывают на то, что молекулярные механизмы системы врожденного иммунитета, мобилизующиеся в первые минуты и часы воздействия на организм неблагоприятных факторов, вовлечены не только в противоинфекционную защиту, но и в более широкий круг защитно-приспособительных реакций. В ряде случаев антимикробные белки и пептиды 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 подобных сигнальных систем [Шпаков, 2009].

Для меланокортинового рецептора 2 типа (рецептора АКТГ) такое взаимодействие уже показано на примере кортикостатических дефенсинов. Причем, это кортикостатическое действие *in vitro* на культуре клеток надпочечников, по

предположению авторов обусловлено конкурентным связыванием дефенсинов с рецептором АКТГ, именно благодаря наличию блока остатков аргинина вблизи N-конца молекулы пептида, похожий блок есть и у АКТГ [Solomon, 1993].

Еще в 90-е годы было показано, что эти же кортикостатические дефенсины (α , именно, α -дефенсин кролика NP-3a) ингибируют действие α -меланоцит-стимулирующего гормона на продукцию альдостерона клетками клубочковой зоны коры надпочечников крысы, что подтверждает возможность взаимодействия таких дефенсинов не только с рецептором АКТГ [Zhu et al., 1991; Solomon, 1993].

Для другой формы дефенсинов – β -дефенсинов, было показано, что, по крайней мере, два β -дефенсина человека (hBD1 и hBD3) являются лигандами для меланокортинового рецептора 1 [Kaelin et al., 2008].

Не только кортикостатические α -дефенсины могут модулировать активность альфа-меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH), но и α -дефенсины нейтрофилов, не влияющие на активность рецепторов АКТГ *in vitro*. В частности, HNP-4 (кортикостатический α -дефенсин человека) и HNP-1 (не кортикостатический) снижают супрессивное действие α -меланоцит-стимулирующего гормона (α -MSH) на продукцию ИЛ-1 β мононуклеарными клетками человека [Шамова, 2013]. 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].

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 на N-конце молекулы, схожая конфигурация наблюдается у кортикостатических дефенсинов и АКТГ. Трансгенный лактоферрин человека, у которого вместо четырех остатков аргинина присутствуют только два, не проявляет кортикостатической активности, то есть наше предположение имеет под собой основание.

В свете этих данных можно предположить, что адаптивная значимость нейтрофилеза – неотъемлемого компонента стресс-реакции и инфекционных процессов не ограничивается превентивным усилением антимикробного барьера организма. В

процессе выхода нейтрофилов в кровь и их последующей миграции в ткани наблюдается постоянная секреция антимикробных белков и пептидов, в том числе дефенсинов [Panyutich et al.,1991; Hu et al.,1993] и лактоферрина, во внеклеточную среду. При этом последние уже в роли гуморальных факторов могут проявлять свои свойства адаптогенов и иммунорегуляторов.

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

Заболевания инфекционной природы приводят к снижению показателей лизосомально-катионного теста (суммарного показателя содержания катионных антимикробных пептидов и белков в нейтрофилах), интенсивность которого зависит от тяжести течения заболевания. Падение показателей ЛКТ на 50% от уровня возрастной нормы свидетельствует о развитии гнойных осложнений. а снижение более чем на 90% предполагает высокую вероятность летального исхода [Пигаревский, 1988; Мазинг, 1995]. При муковисцидозе количественное определение миелопероксидазы и лактоферрина в очагах воспаления позволяет оценить интенсивность воспалительного процесса и степень тяжести заболевания [Суркова и др., 2004]. По уровню экспрессии различных рецепторов и их соотношениям у нейтрофилов можно провести дифференциальную диагностику инфекций, вызываемых бактериями, ДНК- или РНК-вирусами [Lilius, 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, одновременному повышению концентрации антимикробных белков нейтрофилов (МПО и ЛФ) в сыворотке крови и внутриклеточного содержания катионных антимикробных белков и пептидов. Выраженность изменений зависит от локализации туберкулезного процесса, тяжести течения и характера возбудителя. На основе этих данных получен патент РФ «Способ определения активности туберкулезного спондилита» RU 2308723 C2 (опубликовано 20.10.2007).

Исследование уровня спонтанной и стимулированной форбол-12-миристан-13-ацетатом 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 выявило 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 участвуют в формировании тонко настроенных механизмов поддержания гомеостаза благодаря секреции АМПБ, проявляющих свойства иммуномодуляторов и адаптогенов.

Исследование изменений функциональных особенностей нейтрофильных гранулоцитов, в том числе и содержания АМПБ в биологических жидкостях и клетках организма при инфекционной патологии или травмах позволяют осуществлять дифференциальную диагностику, прогнозировать течение заболевания и способствовать раскрытию звеньев патогенеза заболеваний.

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 мартышковых (*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 целомоцитов 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- A₄₉₂ – абсорбция (оптическая плотность) образца при длине волны 492 нм
- CART – кокаин- и амфетамин-регулируемый транскрипт (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
- CrG-ДНК – ДНК с динуклеотидом цитозин-фосфат-гуанин
- CRF-R1 – кортикотропин-релизинг фактор 1 типа
- CRISP – цистеин-богатый секреторный белок
- FITC – фторизотиоцианат
- FPRL-1 – рецептор формилловых пептидов 1-го типа
- FVC – вирус лейкемии Френда
- ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1-го типа
- IFN – интерферон
- iNKT – инвариантный натуральный киллер
- IκB – ингибитор транскрипционного фактора NFκB
- LQ – нижний квартиль
- MALDI-TOF масс-спектрометр – времяпролетный масс-анализатор на основе матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации
- MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок
- MIP – макрофагальный ингибиторный белок
- NET – нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular trap)
- NFκB – транскрипционный фактор NFκB (ядерный фактор «каппа-би»)
- P2X₇R – P2X-пуриноцептор 7
- pDCs – плазматические дендритные клетки
- PMР – микробицидные белки тромбоцитов (Platelet microbicidal proteins)
- POMC – проопиомеланокортин
- RACE – Rapid Amplification of cDNA Ends
- RANTES – хемокин, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками при активации
- SBA – соевый агар с казеиновым переваром (триптон-соевый агар)
- SDF-1 – стромальный фактор 1
- SMART – Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript

SNAP – ассоциированный с синапсом белок

TLR4 – Toll-подобный рецептор 4

TNFR-1 – рецептор ФНО 1 типа

TRAF – фактор ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей

TRAIL – лиганд семейства ФНО, индуцирующий апоптоз

TRAILR – рецептор лиганда TRAIL

TRIF – TIR-доменсодержащий адаптерный белок, индуцирующий образование интерферона

TSB – триптический гидролизат сои

UQ – верхний квартиль

VAMP – везикуло-ассоциированный мембранный белок

VCAM – молекула адгезии сосудистого эндотелия

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

α -MSH – альфа-меланоцит-стимулирующий гормон

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АМА – антимикробная активность

АМБП – антимикробные белки и пептиды

АМП – антимикробные пептиды

ао – аминокислотные остатки

АТФаза – аденозинтрифосфатаза

АФК – активные формы кислорода

БЦЖ – сокращенное от «Бацилла Кальмета-Герена», (фр. *Bacillus Calmette-Guérin*, VCG), вакцина против туберкулёза

ГАФД – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система

ГТФаза – гуанозинтрифосфатаза

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – 1,4-дителиотриэтол

ЗФР – забуференный "физиологический раствор" (0,01 М Na-фосфатного буфера с 0,14 М NaCl, pH 7,2-7,4)

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ
кДНК – кодирующая ДНК
ЛКТ – лизосомально-катионный тест
ЛПС – липополисахарид
ЛСБ – ЛПС-связывающий белок
ЛФ – лактоферрин
МАРК – митоген-активированная протеинкиназа
МИК – минимальная ингибирующая концентрация
МкР – меланокортиновый рецептор
ММП – матриксная металлопротеиназа
ММР – макрофагальный маннозный рецептор
МПО – миелопероксидаза
НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза
НГ – нейтрофильный гранулоцит
НОММ – номинальная отсекаемая молекулярная масса
НСТ-тест – тест с нитросиним тетразолием
ОА – овальбумин
ОРВИ – острое респираторное вирусное заболевание
ОРЗ – острое респираторное заболевание
ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография
ПААГ – полиакриламидный гель
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПХ – пероксидаза хрена
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РБТЛ – реакция бласттрансформации лимфоцитов
РНК – рибонуклеиновая кислота
СНС – симпатическая нервная система
СЦК – средний цитохимический коэффициент
ТФР- β – трансформирующий фактор роста бета
ТФУ – трифторуксусная кислота
УФ-лазер – ультрафиолетовый лазер
ФГА – фитогемагглютинин

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат

ФНО- α – фактор некроза опухолей альфа

ХГБ – хроническая гранулематозная болезнь

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Однобуквенное и трехбуквенное обозначение аминокислотных остатков:

A (Ala) – аланин, C (Cys) – цистеин, D (Asp) – аспарагиновая кислота, E (Glu) – глутаминовая кислота, pE – пироглутаминовая кислота, F (Phe) – фенилаланин, G (Gly) – глицин, H (His) – гистидин, I (Ile) – изолейцин, K (Lys) – лизин, L (Leu) – лейцин, M (Met) – метионин, N (Asn) – аспарагин, P (Pro) – пролин, Q (Gln) – глутамин, R (Arg) – аргинин, S (Ser) – серин, T (Thr) – треонин, V (Val) – валин, W (Trp) – триптофан, Y (Tyr) – тирозин

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Ашмарин, И.П. Антибактериальные и противовирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования / И.П. Ашмарин, С.М. Ждан-Пушкина, В.Н. Кокряков [и др.] // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1972. – № 4. – С. 502-508.

Ашмарин, И.П. Взаимодействие катионных белков гранул и миелопероксидазы лейкоцитов / И.П. Ашмарин, В.Н. Кокряков, С.Н. Лызлова, Н.П. Раменская // Вопр. мед. химии. – 1977. – № 4. – С.534-537.

Берлов, М.Н. Лактоферрин из нейтрофилов собаки: выделение, физико-химические и антимикробные свойства / М.Н. Берлов, Е.С. Кораблева, Ю.В. Андреева, [и др.] // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 4. – С. 551-559.

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.

Брызжикова, Т.С. Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов у больных рецидивирующим герпесом / Т.С. Брызжикова, Г.М. Алешина, В.А. Исаков, Ю.А. Мазинг // Бюл.эксп.биол. и мед. – 1995. – Т. 120, № 9. – С. 329-331.

Вишневский, Б.И. Основные направления работы лаборатории микробиологии туберкулеза / Б.И. Вишневский // Сборник трудов Всероссийской научно-практической конференции «Туберкулез. Проблемы диагностики, лечения и профилактики». СПб ГУ НИИ фтизиопульмонологии МЗ РФ, СПб. – 2003. – С. 34-38.

Горизонтов, П.Д. Стресс и система крови / П.Д.Горизонтов, О.И. Белоусова, Н.И. Федотова. – М.: Медицина, 1983. – 240с.

Горудко, И.В. Повышенная активность миелопероксидазы – фактор риска ишемической болезни сердца у больных сахарным диабетом / И.В. Горудко, В.А. Костевич, А.В. Соколов, [и др.] // Биомедицинская химия. – 2012. – Т. 58, № 4. – С. 475-484.

Гусев, Е.Ю. Системное воспаление с позиции теории типового патологического процесса / Е.Ю. Гусев, В.А. Черешнев, Л.Н. Юрченко // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т. 6., № 4. – С. 9-21.

Данилова, М.А. Морфологические проявления антимикробного действия катионных белков нейтрофильных гранулоцитов / М.А. Данилова // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л.: Медицина. – 1988. – С.52-75.

Долгушин И.И. Взаимодействие нейтрофилов с иммунокомпетентными клетками/ И.И. Долгушин // Сб. науч. трудов под ред. А.Н. Маянского «Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций». – Горький, 1989. – С.74-81.

Долгушин, И.И. Нейтрофил как "многофункциональное устройство" иммунной системы / И.И. Долгушин, Е.А. Мезенцева, А.Ю. Савочкина, Е.К. Кузнецова // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9, № 1. – С. 9-38.

Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов: [монография] / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина; Российская акад. мед. наук. – Москва: Изд-во РАМН, 2009. – 203 с. ISBN 978-5-7901-0052-9

Жаркова, М.С. Синергизм антибактериального действия антимикробных пептидов и конвенциональных антибиотиков / М.С. Жаркова // Российский иммунологический журнал. – 2014. – Том 8 (17), № 3. – С. 792-795.

Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. / В.С. Камышников – Минск: Беларусь, 2000. Т. 2 – 463 с.

Катаева, Г.В. Реакция восстановления нитросинего тетразолия у больных раком легкого/ Г.В. Катаева, Н.Ш. Лобжанидзе, А.А. Редько [и др.] // Вестник хирургии. – 1988. – № 4. – С. 14-16.

Киселева, Е.П. Метод автоматизированного учета НСТ-теста / Е.П. Киселева, А.В. Полевщиков // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 4. – С. 27-29.

Козлов, В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии / В.К. Козлов. – СПб.: Диалект, 2008. – 296 с. – ISBN 978-5-98230-043-0

Кокряков В.Н. Биология антибиотиков животного происхождения / В.Н. Кокряков. – СПб.: «Наука», 1999. – 162 с.

Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете / В.Н. Кокряков. – СПб.: «Наука», 2006. – 261 с.

Кокряков, В.Н. О степени структурной гомологии лактоферринов молока и нейтрофильных гранулоцитов / В.Н. Кокряков, Г.М. Алешина, С.В. Слепенков [и др.] // Биохимия. – 1988. –Т. 53, № 11. – С. 1837-1843.

Кокряков, В.Н. Синергическое антимикробное действие миелопероксидазы и лактоферрина нейтрофилов свиньи / В.Н. Кокряков, Г.М. Ротова // Иммунология 1985. – 10с. (Деп. Рукопись).

Кокряков, В.Н. Сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств миелопероксидаз свиньи и коровы / В.Н. Кокряков, А.И. Борисов, С.В. Слепенков, С.Н. Лызлова // Биохимия. – 1982. – Т.47, Вып.1. – С. 100-107.

Корнева, Е.А. Клеточно-молекулярные основы изменения нейроиммунного взаимодействия при стрессе / Е.А. Корнева, С.Н. Шанин, Н.С. Новикова, В.А. Пугач // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2017. – Т. 103, № 3. – С. 217-229.

Краснодембская, А.Д. Исследование функциональных свойств новых антимикробных пептидов ареницинов / А.Д. Краснодембская // Российский иммунологический журнал. – 2007. – Т. 1(10), № 1. – С. 3-10.

Кудряшов, Б.А. Эффект многократного внутримышечного введения дефенсина на противосвертывающую систему и ангиоархитектонику скелетной мышцы / Б.А. Кудряшов, М.В. Кондашевская, Л.А. Ляпина, [и др.] // ДАН СССР. – 1989. – Т.304, N2. – С. 494-498.

Кэтти Д., Райкундалиа Ч. Иммуноферментный анализ / Д. Кэтти, Ч. Райкундалиа // в кн. «Антитела. Методы», кн. 2, М.: Мир, 1991. – С. 152-238.

Мазинг, Ю.А. Морфофункциональные основы антимикробной активности фагоцитов: дис. ... д-ра биол.наук 14.00.23 / Мазинг Юрий Андреевич. – Москва., 1995. – 51 с.

Маянский, А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н.Маянский, Д.Н. Маянский. – Новосибирск: Наука, Сиб.отд-ние. 2 изд., 1989. – 344 с.

Мечников, И.И. Невосприимчивость в инфекционных заболеваниях / И.И. Мечников. – СПб.: Издание К.Л.Риккера, 1903. – 604 с.

Мечников, И.И. О целебных силах организма / И.И. Мечников // Полн. собр. соч., т. 6. ред. Л.А. Зильбер – М.: АН СССР, 1950 год. – С. 22-29.

Нестерова, И.В. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на "старых игроков" на иммунологическом поле / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, [и др.] // Иммунология. – 2015. – Т. 36, № 4. – С. 257-265.

Нестерова, И.В. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2. / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Г.А. Чудилова, [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, № 1. – С. 7-18.

Орлов, Д.С. Эффекты действия дефенсинов при стрессе. дисс. ... канд. биолог. наук 14.03.03 / Орлов Дмитрий Сергеевич. – СПб., 1998. – 20 с.

Осидак, Л.В. Госпитальные респираторные инфекции у детей / Л.В. Осидак, Н.Б. Румель, К.К. Милькинт, [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 1994. – № 9. – С. 10-15.

Пигаревский, В.Е. Зернистые лейкоциты и их свойства / В.Е. Пигаревский. – М.: Медицина, 1978. – 128 с.

Пигаревский, В.Е. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике / В.Е. Пигаревский, Ю.А. Мазинг // Лабораторное дело. – 1984. – № 10. – С. 579-582.

Пигаревский, В.Е. Лизосомально-катионный тест (методическое письмо) / В.Е. Пигаревский, Ю.А. Мазинг // Л.: МЗ СССР, АМН СССР, НИИ экспериментальной медицины, 1987 – 13 с.

Пигаревский, В.Е. Новое в клинко-морфологической оценке функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов / В.Е. Пигаревский // В кн. Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л., 1988. – С. 3-11.

Пигаревский, В.Е. О секреторной активности полиморфноядерных лейкоцитов / В.Е. Пигаревский // Архив патологии. – 1982. – Т. 44, вып. 5. – С. 3-12.

Пигаревский, В.Е. Роль гранулоцитов и макрофагов в неспецифической резистентности организма (морфологические аспекты проблемы) / В.Е. Пигаревский // В кн.: Морфо-функциональные аспекты неспецифической резистентности и демиелинизирующих заболеваний. Клеточно-тканевые факторы неспецифической резистентности. Л. 1981. – С. 3-17

Плахова, В.Б. Дефенсин NP-4 уменьшает потенциалочувствительность медленных натриевых каналов сенсорных нейронов / В.Б. Плахова, И.В. Рогачевский, Б.Ф. Щеголев, [и др.] // Сенсорные системы. – 2005. – Т.19, № 2. – С. 123-131.

Суркова, Е.А. Миелопероксидаза и лактоферрин у больных муковисцидозом / Е.А. Суркова, Т.В. Булгакова, Т.С. Сологуб, [и др.] // Медицинская иммунология. – 2004. – Т. 6, № 1-1. – С. 67-74.

Тырнова, Е.В. Изучение экспрессии гена кателицидина LL-37 в слизистой оболочке верхних дыхательных путей / Е.В. Тырнова, Г.М. Алешина, Ю.К. Янов, В.Н. Кокряков // Рос. оторинолар. – 2014а. – №2(69). – С.94-99.

Тырнова, Е.В. Изучение экспрессии гена кателицидина LL-37 в слизистой оболочке носоглотки / Е.В. Тырнова, Г.М. Алешина, Ю.К. Янов, В.Н. Кокряков // Рос. оторинолар. – 2014б. – №3(70). – С.100-106.

Черешнев, В.А. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления / В.А. Черешнев, Е.Ю. Гусев // Медицинская иммунология. – 2012. – Т. 14, № 1-2. – С. 9-20.

Шамова, О.В. Действие дефенсинов на уровень кортикостерона в крови и иммунный ответ при стрессе / О.В. Шамова, М.П. Лесникова, В.Н. Кокряков, [и др.] // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1993. – Т. 115, №6. – С.646-649.

Шамова, О.В. Молекулярно-клеточные основы реализации биологической активности антимикробных пептидов лейкоцитов: дис. ... д-ра биол. наук 14.03.03; 03.01.04 / Шамова Ольга Валерьевна. – СПб., 2013. – 46 с

Шамова, О.В. Отмена дефенсином иммуносупрессии, обусловленной стрессом или введением высоких доз гидрокортизона / О.В. Шамова, Д.С. Орлов, М.П. Лесникова, [и др.] // Успехи физиол. наук. – 1995. – № 1. – С.113-114.

Шпаков, А.О. Поликатионные пептиды как негормональные регуляторы хемосигнальных систем / А.О. Шпаков // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2009. – Т. 45, № 4. – С. 355-367.

Янковский, О.Ю. Комплексообразование миелопероксидазы и фибронектина и его модуляция лигандами фибронектина / О.Ю. Янковский, И.А. Яблуновская, В.Н. Кокряков, [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1996. – Т.42, вып.2. – С. 137-140.

Abi Abdallah, D.S. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation / D.S. Abi Abdallah, C.E. Egan, B.A. Butcher, E.Y. Denkers // Int Immunol. – 2011. – Vol. 23. – P. 317-326.

Abou Alaiwa, M.H. pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials beta-defensin-3 and LL-37 / M.H. Abou Alaiwa, L.R. Reznikov, N.D. Gansemer, [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2014. – Vol. 111. – P. 18703-18708.

Ageitos, J.M. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria / J.M. Ageitos, A. Sánchez-Pérez, P. Calo-Mata, T.G. Villa // *Biochemical Pharmacology*. – 2017. – Vol. 133. – P. 117-138.

Agerberth, B. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis / B. Agerberth, H. Gunne, J. Odeberg, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1995. – Vol. 92. – P. 195-199.

Ainscough, E.W. The chromium, manganese, cobalt and copper complexes of human lactoferrin / E.W. Ainscough, A.M. Brodie, J.E. Plowman // *Inorganica Chimica Acta*. – 1979. – Vol. 33. – P.149-153.

Akira, S. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity / S. Akira, K. Takeda, T. Kaisho // *Nat Immunol*. – 2001. – Vol. 2(8). – P. 675-680.

Anderson, B.F. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution / B.F. Anderson, H.M. Baker, G.E. Norris, [et al.] // *J Mol Biol*. – 1989. – Vol. 209(4). – P. 711-734.

Andersson, M. Interaction of NK lysin, a peptide produced by cytolytic lymphocytes, with endotoxin / M. Andersson, R. Girard, P. Cazenave // *Infect Immun*. – 1999. – Vol. 67. – P. 201–205.

Appelmelk, B.J. Lactoferrin is a lipid A-binding protein / B.J. Appelmelk, Y.Q. An, M. Geerts, [et al.] // *Infect. Immun*. – 1994. – Vol. 62. – P. 2628-2632.

Ashitani, J. Elevated levels of alpha-defensins in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis / J. Ashitani, H. Mukae, T. Hiratsuka, [et al.] // *Chest*. – 2002. – Vol. 121. – P. 519-526.

Ayabe, T. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria / T. Ayabe, D.P. Satchell, C.L. Wilson, [et al.] // *Nat. Immunol*. – 2000. – Vol. 1. – P. 113–118.

Baer, A. Isolation and partial characterization of ovine lactoferrin / A. Baer, M. Oroz, B. Blanc // *Experientia*. – 1979. – Vol. 35(12). – P. 1554-1555.

Bainton, D.F. Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes. Two types derived from opposite faces of the Golgi complex in developing granulocytes / D.F. Bainton, M.G. Farquhar // *J Cell Biol*. – 1966. – Vol. 28(2). – P. 277-301.

Bainton, D.F. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow / D.F. Bainton, J.L. Ulliyot, M.G. Farquhar // *J Exp Med.* – 1971. – Vol. 134(4). – P. 907-34.

Baker, E.N. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin / E.N. Baker, H.M. Baker // *Cell Mol Life Sci.* – 2005. – Vol. 62(22). – P. 2531-2539.

Barnathan, E.S. Immunohistochemical localization of defensin in human coronary vessels / E.S. Barnathan, P.N. Raghunath, J.E. Tomaszewski, [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 1997. – Vol. 150. – P. 1009-1020.

Baroni, A. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells / A. Baroni, G. Donnarumma, I. Paoletti, [et al.] // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30. – P. 267-272.

Bartholomäus, I. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions / I. Bartholomäus, N. Kawakami, F. Odoardi, [et al.] // *Nature.* – 2009. – Vol. 462. – P. 94-98.

Baumann, A. Differential ability of bovine antimicrobial cathelicidins to mediate nucleic acid sensing by epithelial cells / A. Baumann, M.S. Kiener, B. Haigh, [et al.] // *Front. Immunol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1-12.

Baumann, A. Porcine cathelicidins efficiently complex and deliver nucleic acids to plasmacytoid dendritic cells and can thereby mediate bacteria-induced IFN- α responses / A. Baumann, T. Demoulins, S. Python, A. Summerfield // *J. Immunol.* – 2014 – Vol. 193. – P. 364-371.

Baveye, S. Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by CD14-lipopolysaccharide complex / S. Baveye, E. Ellass, D.G. Fernig, [et al.] // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68, No. 12. – P. 6519-6525.

Bdeir, K. Neutrophil α -defensins cause lung injury by disrupting the capillary-epithelial barrier / K. Bdeir, A.A. Higazi, I. Kulikovskaya, [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 181. – P. 935-946.

Bechinger, B. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides / B. Bechinger, K. Lohner // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – Vol. 1758(9). – P. 1529-1539.

Befus, A.D. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action / A.D. Befus, C. Mowat, M. Gilchrist, [et al.] // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 163(2). – P. 947-953.

Belding, M.E. Peroxidase – mediated virucided systems / M.E. Belding, S.J. Klebanoff, C.G. Ray // *Science.* – 1970. – Vol. 167, N 1. – P. 195-196.

Bellamy, W. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericide peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin / W. Bellamy, M. Takase, H. Wakabayashi, [et al.] // *J. Appl. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 73. – P. 472–479.

Bennett, R.M. Lactoferrin turnover in man/ R.M. Bennett, T. Kokocinski // *Clin Sci (Lond).* – 1979. – Vol. 57(5). – P. 453-460.

Beno, D.W. Nonstressed rat model of acute endotoxemia that unmasks the endotoxin-induced TNF-alpha response / D.W. Beno, R.E. Kimura // *Am. J. Physiol.* – 1999. – Vol. 276. – P. H671-H678.

Berry, M.P. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis / M.P. Berry, C.M. Graham, F.W. McNab, [et al.] // *Nature.* – 2010. – Vol. 466. – P. 973-977.

Bezault, J. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice / J. Bezault, R. Bhimani, J. Wiprovnick, P. Furmanski // *Cancer Res.* – 1994. – Vol. 54. – P. 2310-2312.

Bianchi, M. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis / M. Bianchi, A. Hakkim, V. Brinkmann [et al.] // *Blood.* – 2009. – Vol. 114. – P. 2619-2622.

Bierbaum, G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering / G. Bierbaum, H.-G. Sahl // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 2-18.

Black, P.H. Stress, inflammation and cardiovascular disease / P.H. Black, L.D. Garbutt // *J. Psychosom. Res.* – 2002. – Vol. 52. – P. 1-23.

Boman, H.G. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine / H.G. Boman, B. Agerberth, A. Boman // *Infect. Immun.* – 1993. – Vol. 61(7). – P. 2978-2984.

Boman, H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity / H.G. Boman // *Annu. Rev. Immunol.* – 1995. – Vol. 13. – P. 61-92.

- Borregaard, N. Human neutrophil granules and secretory vesicles / N. Borregaard, K. Lollike, L. Kjeldsen, [et al.] // *Eur J Haematol.* – 1993. – Vol. 51(4). – P. 187-198.
- Borregaard, N. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins / Niels Borregaard, Ole E. Sørensen and Kim Theilgaard-Mönch // *TRENDS in Immunology.* – 2007. – Vol. 28, No. 8. – P. 340-345.
- Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes / N. Borregaard // *Immunity.* – 2010. – Vol. 33(5). – P. 657-670.
- Bowdish, D.M.E. Immunomodulatory activities of small host defense peptides / D.M.E. Bowdish, D.J. Davidson, M.G. Scott, R.E.W. Hancock // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49. – P. 1727-1732.
- Brandenburg, K. Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the alpha-helical cationic core-region of NK-lysin / K. Brandenburg, P. Garidel, S. Fukuoka, [et al.] // *Biophys Chem.* – 2010. – Vol. 150. – P. 80–87.
- Brandenburg, K. Peptide-based treatment of sepsis / K. Brandenburg, J. Andrä, P. Garidel, T. Gutschmann // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2011. – Vol. 90. – P. 799-808.
- Bretz, U. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophil polymorphonuclear leukocytes / U. Bretz, M. Baggiolini // *J. Cell Biol.* – 1974. – Vol. 63, N 1. – P. 251-269.
- Brinkmann, V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria / V. Brinkmann U. Reichard, C. Goosmann [et al.] // *Science.* – 2004. – Vol. 303. – P. 1532-1535.
- Britigan, B.E. The role of lactoferrin as an anti-inflammatory molecule / B.E. Britigan, J.S. Serody, M.S. Cohen // *Adv Exp Med Biol.* – 1994. – Vol. 357. – P. 143-56.
- Brock, J.H. Lactoferrin: A multifunctional immunoregulatory protein / J.H. Brock // *Immunol. Today.* – 1995. – Vol. 16. – P. 417-419.
- Brock, J.H. The physiology of lactoferrin / Jeremy H. Brock // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80. – P. 1-6.
- Broekman, D.C. Functional characterization of codCath, the mature cathelicidin antimicrobial peptide from Atlantic cod (*Gadus morhua*) / D.C. Broekman, A. Zenz, B.K. Gudmundsdottir, [et al.] // *Peptides.* – 2011a. – Vol. 32. – P. 2044-2051.
- Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? / K.A. Brogden // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2005. – Vol. 3(3). – P. 238- 250.

Broxmeyer, H.E. The opposing actions in vivo on murine myelopoiesis of purified preparation of lactoferrin and the colony stimulating factors / H.E. Broxmeyer, D.E. Williams, G. Hangoc, [et al.] // *Blood Cells*. – 1987. – Vol. 13, No. 1-2. – P. 31-48.

Bruehl, R.E. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 / R.E. Bruehl, K.L. Moore, D.E. Loran, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 1997. – Vol. 61. – P. 489-499.

Bruhn, O. Antimicrobial properties of the equine alpha-defensin DEFA1 against bacterial horse pathogens / O. Bruhn, J. Cauchard, M. Schlüsselhuber, [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2009. – Vol. 130. – P. 102-106.

Brydon, L. Psychological stress activates interleukin-1beta gene expression in human mononuclear cells / Lena Brydon, Susan Edwards, Haiyan Jia, [et al.] // *Brain Behav Immun.* – 2005. – Vol. 19(6). – P. 540-546.

Buchner, H. Neuere Fortschritte in der Immunitätsfrage / H. Buchner // *Münch. med. Wochschr.* – 1894. – Vol. 41. – P. 497-500.

Buchner, H. Zur Nomenklatur der schützenden Eiweisskörper / H. Buchner // *Centr. Bakteriolog. Parasitenk.* – 1891. – Vol. 10. – P. 699-701.

Bulet, P. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution / P. Bulet, J.L. Dimarcq, C. Hetru, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 14893-14897.

Bulet, P. Antimicrobial peptides in insects; structure and function / P. Bulet, C. Hetru, J.-L. Dimarcq, D. Hoffmann // *Develop. Compar. Immunol.* – 1999. – Vol. 23. – P. 329-344

Bulet, P. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates / P. Bulet, R. Stöcklin, L. Menin // *Immunol. Rev.* – 2004. – Vol. 198. – P. 169-184.

Buscher, K. The transmembrane domains of L-selectin and CD44 regulate receptor cell surface positioning and leukocyte adhesion under flow / K. Buscher, S.B. Riese, M. Shakibaei, [et al.] // *Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 13490-13497.

Buvelot, H. *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease / H. Buvelot, K.M. Posfay-Barbe, P. Linder, [et al.] // *FEMS Microbiol Rev.* – 2017. – Vol. 41. – P. 139-157.

Campos-Salinas, J. Protective role of the neuropeptide U II against experimental sepsis and Leishmaniasis by direct killing of pathogens / J. Campos-Salinas, M. Caro, A. Cavazzuti, [et al.] // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 191(12). – P. 6040-6051.

Casanova-Acebes, M. Neutrophils instruct homeostatic and pathological states in naive tissues / M. Casanova-Acebes, J.A. Nicolás-Ávila, J.L. Li [et al.] // *J Exp Med.* – 2018. – Vol. 215. – P. 2778-2795.

Catania, A. The melanocortin system in control of inflammation / Anna Catania, Caterina Lonati, Andrea Sordi, [et al.] // *The Scientific World Journal.* – 2010. – Vol. 10. – P. 1840-1853

Cervini, L.A. Rat corticostatin R4: synthesis, disulfide bridge assignment, and in vivo activity / Laura A. Cervini, William R. Gray, Ron Kaiser, [et al.] // *Peptides.* – 1995. – Vol.16, No. 5. – P. 837-842.

Chairatana, P. Molecular basis for self-assembly of a human host-defense peptide that entraps bacterial pathogens / P. Chairatana, E.M. Nolan // *J Am Chem Soc.* – 2014. – Vol. 136(38). – P. 13267-13276.

Chaly, Y.V. Neutrophil α -defensin human neutrophil peptide modulates cytoline production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells / Y.V. Chaly, E.M. Paleolog, T.S. Kolesnikova, [et al.] // *European Cytokine Network.* – 2000. – Vol. 11, No 2. – P. 257-266.

Chang, S.H. Anti-inflammatory action of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) in anti-CD3/CD28-mediated spleen and CD4(+)CD25(-) T cells and a partial participation of IL-10 / S.H. Chang, E.J. Jung, D.G. Lim, [et al.]// *Immunol. Lett.* – 2008. – Vol. 118. – P. 44-48.

Charlet, M. Innate Immunity. Isolation of several Cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis* / M. Charlet, S. Chernysh, H. Philippe, [et al.]// *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 21808-21813.

Chattopadhyay, S. Small cationic protein from a marine turtle has β -defensin-like fold and antibacterial and antiviral activity / S. Chattopadhyay, N.K. Sinha, S. Banerjee, [et al.]// *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2006. – Vol. 64. – P. 524-531.

Chen, Q. Increased gene copy number of DEFA1/DEFA3 worsens sepsis by inducing endothelial pyroptosis / Q Chen, Y Yang, J Hou, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – Vol. 116(8). – P. 3161-3170.

Chen, Q. Increased genomic copy number of DEFA1/DEFA3 is associated with susceptibility to severe sepsis in Chinese Han population / Q. Chen, M. Hakimi, S. Wu, [et al.] // *Anesthesiology.* – 2010. – Vol. 112. – P. 1428-1434.

Chen, X. Synergistic effect of antibacterial agents human [beta]-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* / X. Chen, F. Niyonsaba, H. Ushio [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2005. – Vol. 40(2). – P. 123-132.

Cheng, Y. Evolution of the avian β -defensin and cathelicidin genes / Y. Cheng, M.D. Prickett, W. Gutowska, [et al.]// *BMC Evol. Biol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 188. doi: [10.1186/s12862-015-0465-3](https://doi.org/10.1186/s12862-015-0465-3)

Chertov, O. Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T- cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils / O. Chertov, D.F. Michiel, L. Xu, [et al.] // *J Biol Chem.* – 1996. – Vol. 271(6). – P. 2935-2940

Cho, J. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization / J. Cho, C. Park, Y. Yoon, S. Kim // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1998. – Vol. 1408. – P. 67-76.

Cho, Y. Activity of protegrins against yeast-phase *Candida albicans* / Y. Cho, J.S. Turner, N.N. Dinh, R.I. Lehrer // *Infect Immun.* – 1998. – Vol. 66(6). – P. 2486-2493.

Clark, D.P. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic Polymyxin / D.P. Clark, S. Durell, W.L. Maloy, M. Zaslof // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 10849-10855.

Clark, R.A. Myeloperoxidase-mediated platelet release reaction / R.A. Clark, S.J. Klebanoff // *J. Clin. Invest.* – 1979. – Vol.63. – P.177-183

Cole, A.M. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder / A.M. Cole, P. Weis, G. Diamond // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272(18). – P. 12008-12013.

Cole, A.M. Retrocyclins: using past as prologue / A.M. Cole, W. Wang, A.J. Waring, R.I. Lehrer // *Curr Protein Pept Sci.* – 2004. – Vol. 5(5). – P. 373-381

Condon, M.R. Induction of a rat enteric defensin gene by hemorrhagic shock / M.R. Condon, A. Viera, M. D'Alessio, G. Diamond // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 4787-4793.

Connor, T.J. Acute stress suppresses pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 beta independent of a catecholamine-driven increase in IL-10 production / Thomas J. Connor, Charlene Brewer, John P. Kelly, Andrew Harkin // *J Neuroimmunol.* – 2005. – Vol. 159(1-2). – P. 119-128.

Coorens, M. Cathelicidins inhibit *Escherichia coli*-induced TLR2 and TLR4 activation in a viability-dependent manner / M. Coorens, V.A.F. Schneider, A.M. de Groot, [et al.] // *J. Immunol.* – 2017. – Vol. 199. – P. 1418-1428.

Côté, I. Activation of the central melanocortin system in rats persistently reduces body and fat mass independently of caloric reduction / I. Côté, S.M. Green, D. Morgan, [et al.] // *Can J Physiol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 96(3). – P. 308-312.

Cummings, C.J. Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis / C.J. Cummings, T.R. Martin, C.W. Frevert, [et al.] // *J Immunol.* – 1999. – Vol. 162. – P. 2341-2346.

Curran, C.S. Lactoferrin activates macrophages via TLR4-dependent and -independent signaling pathways / C.S. Curran, K.P. Demick and J.M. Mansfield // *Cell. Immunol.* – 2006. – Vol. 242(1). – P. 23-30.

D'Este, F. Modulation of cytokine gene expression by cathelicidin BMAP-28 in LPS-stimulated and unstimulated macrophages / F. D'Este, L. Tomasinsig, B. Skerlavaj, M. Zanetti // *Immunobiology.* – 2012. – Vol. 217. – P. 962-971.

Dale, D.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes / D.C. Dale, L. Boxer, W.C. Liles // *Blood.* – 2008. – Vol. 112. – P. 935-945.

Dantzer, R. Cytokines, sickness behavior, and depression / R. Dantzer, R.M. Bluthé, N. Castanon, [et al.] // In: Ader, R. (Ed.), *Psychoneuroimmunology*. Elsevier, New York. – 2007. – P. 281-318.

Datta, P.C. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and behavior / P.C. Datta, M.G. King // *Neurosci. Biobehav. Rev.* – 1982. – Vol. 6. – P. 297-310.

Daviaud, F. Timing and causes of death in septic shock / F. Daviaud, D. Grimaldi, A. Dechartres, [et al.] // *Ann Intensive Care.* – 2015. – Vol. 5. – P. 16. doi: [10.1186/s13613-015-0058-8](https://doi.org/10.1186/s13613-015-0058-8)

Davis, J.M. Increased neutrophil mobilization and decreased chemotaxis during cortisol and epinephrine infusions / J.M. Davis, J.D. Albert, K.J. Tracy [et al.] // *Journal of Trauma and Acute Care Surgery.* – 1991. – Vol. 31. – P. 725-731.

De Miguel, C. Early life stress induces priming of the immune response in kidneys of adult male rats / C. De Miguel, I.E. Obi, D.H. Ho, A.S. Loria, J.S. Pollock // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2018. – Vol. 314(3). – P. F343-F355.

De Santo, C. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A / C. De Santo, R. Arscott, S. Booth, [et al.] // *Nat Immunol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 1039-1046.

Deitch, E.A. Lymph from a primate baboon trauma hemorrhagic shock model activates human neutrophils / E.A. Deitch, E. Feketeova, J.M. Adams, [et al.] // *Shock.* – 2006. – Vol. 25, No. 5. – P. 460-463.

Derevianko, A. The role of neutrophil-derived oxidants as second messengers in interleukin-1 β -stimulated cells / A. Derevianko, T. Graeber, R. D'Amico, H.H. Simms // *Shock.* – 1998. – Vol. 10, No. 1. – P. 54-61.

Di Biase, A.M. Effect of bovine lactoferricin on enteropathogenic *Yersinia* adhesion and invasion in HEp-2 cells / A.M. Di Biase, A. Tinar, A. Pietrantonio, [et al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 407-412.

Di Nardo, A. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization / A. Di Nardo, M.H. Braff, K.R. Taylor, [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 1829-1834.

Diamond, G. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA / G. Diamond, M. Zasloff, H. Eck, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1991. – Vol. 88. – P. 3952–3956.

Donaldson, D. M. Beta-Lysin of platelet origin / D. M. Donaldson, J.G. Tew // *Bacteriol. Rev.* – 1977. – Vol. 41(2). – P. 501-513.

Dorman, L.C. Solid phase synthesis and antibacterial activity of N-terminal sequences of melittin / L.C. Dorman, L.D. Markley // *J Med Chem.* – 1971. – Vol. 14(1). – P. 5-9.

Dubos, R. J. The antimycobacterial activity of a peptide preparation derived from calf thymus / R. J. Dubos and J. G. Hirsch // *J. Exptl. Med.* – 1954. – Vol. 99. – P. 55-63.

Duplantier, A.J. The human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 as a potential treatment for polymicrobial infected wounds / A.J. Duplantier, M.L. van Hoek // *Front. Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 1-14.

Dürr, U.H.N. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides / U.H.N. Dürr, U.S. Sudheendra, A. Ramamoorthy // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2006. – Vol. 1758. – 1408-1425.

Duthille, I. Lactoferrin stimulates the mitogen-activated protein kinase in the human lymphoblastic T Jurkat cell line / I. Duthille, M. Masson, G. Spik, J. Mazurier // *Adv Exp Med Biol.* – 1998. – Vol. 443. – P. 257-260.

Ehrlich, P. *Studies on immunity. Chap. 2.* (translated by C. Bolduan.) / P. Ehrlich, P. – New York: John Wiley & Sons, 1906.

Eisenhauer, P.B. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils / P.B. Eisenhauer, S.S. Harwig, D. Szklarek, [et al.] // *Infect Immun.* – 1989. – Vol. 57(7). – P. 2021-2027.

Elass-Rochard, E. Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide-binding protein / E. Elass-Rochard, D. Legrand, V. Salmon, [et al.] // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66, No. 2. – P. 486-491.

El-Hag, A. Inmunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system / A. El-Hag, R.A. Clark // *J. Immunol.* – 1987. – Vol.139. – P. 2406-2413

Ellard, D.R. The effect of a short-term mental stressor on neutrophil activation / D.R. Ellard, P.C. Castle, R. Mian // *Int J Psychophysiol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 93-100.

Elssner, A. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 β processing and release / A. Elssner, M. Duncan, M. Gavrillin, M. D. Wewers // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172. – P. 4987-4994.

Embleton, N.D. Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential / N.D. Embleton, J.E. Berrington, W. McGuire, [et al.] // *Semin Fetal Neonatal Med.* – 2013. – Vol. 18. – P. 143-149.

Evans, E.W. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils / E.W. Evans, G.G. Beach, J. Wunderlich, B.G. Harmon // *J. Leukoc. Biol.* – 1994. – Vol. 56. – P. 661-665.

Faurschou, M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation / M. Faurschou, N. Borregaard // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5, No. 14. – P. 1317-1327.

Faurschou, M. Prodefensins are matrix proteins of specific granules in human neutrophils / M. Faurschou, S. Kamp, J.B. Cowland, [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2005. – Vol. 78(3). – P. 785-793.

Fehlbaum, P. Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog skin antimicrobial peptides / P. Fehlbaum, P.

Bulet, S. Chernysh, [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. – 1996. – Vol. 9. – P.1221-1225.

Fennell, J.F. Antibacterial action of melittin, a polypeptide from bee venom / J.F. Fennell, W.H. Shipman, L.J. Cole // Exp. Biol. Med. – 1968. – Vol. 127. – P. 707-710.

Fernandez de Caleyá, R. Susceptibility of phytopathogenic bacteria to wheat purothionins in vitro / R. Fernandez de Caleyá, B. Gonzalez-Pascual, F. García-Olmedo, P. Carbonero // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 23. – P. 998-1000.

Few, A.V. The absorption of polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action / A.V. Few, J.H. Schulman // J. Gen. Microbiol. – 1953. – Vol. 9. – P. 454-466.

Fillebeen, C. Lactoferrin is synthesized by activated microglia in the human substantia nigra and its synthesis by the human microglial CHME cell line is upregulated by tumor necrosis factor alpha or 1-methyl-4-phenylpyridinium treatment / C. Fillebeen, M.M. Ruchoux, V. Mitchell, [et al.] // Brain Res Mol Brain Res. – 2001. – Vol. 96. – P. 103-113.

Fink, M.P. Animal models of sepsis / M.P. Fink // Virulence. – 2014. – Vol. 5. – P. 143-153.

Fleischmann, J. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2, cationic peptides from rabbit alveolar macrophages / J. Fleischmann, M.E. Selsted, R.I. Lehrer // Diagn Microbiol Infect Dis. – 1985. – Vol. 3(3). – P. 233-242.

Fleming, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions / A. Fleming // The Journal of Biological Chemistry. – 1922. – Vol. 93. – P. 306-317.

Flynn, J.A. Immunology of tuberculosis / J.A. Flynn, J. Chan // Annu. Rev. Immunol. – 2001. – Vol.19. – P.93-129.

Fodor, J. Die Fahigkeit des Blutes Bakterien zu vernichten / J. Fodor // Deut. med. Wochschr. – 1887. – Vol. 13. – P. 745-747.

Fuchs, T.A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps / T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann [et al] // J. Cell Biol. – 2007. – Vol. 176. – P. 231-241.

Fujiwara, S. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin // S. Fujiwara, J. Imai, M. Fujiwara, [et al.] // J Biol Chem. – 1990. – Vol. 265(19). – P. 11333-11337.

Gahr, M. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. / M. Gahr, C.P. Speer, B. Damerau, G. Sawatzki // *J Leukoc Biol.* – 1991. – Vol. 49(5). – P. 427-433.

Ganz, T. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils / T. Ganz, M.E. Selsted, D. Szklarek, [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1985. – Vol. 76. – P. 1427-1435.

Garcia, A.E. Isolation, synthesis, and antimicrobial activities of naturally occurring theta-defensin isoforms from baboon leukocytes. / A.E. Garcia, G. Osapay, P.A. Tran, [et al.] // *Infect Immun.* – 2008. – Vol. 76(12). – P. 5883-5891.

García, J.R. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity / J.R. García, A. Krause, S. Schulz, [et al.] // *FASEB J.* – 2001. – Vol. 15. – P. 1819-1821.

Garré, C. Lactoferrin binding sites and nuclear localization in K562(S) cells. / C. Garré, G. Bianchi-Scarrá, M. Sirito, [et al.] // *J Cell Physiol.* – 1992. – Vol. 153(3). – P. 477-482.

Gazit, E. Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles / E. Gazit, A. Boman, H.G. Boman, Y. Shai // *Biochemistry.* – 1995. – Vol. 34(36). – P. 11479-11488.

Gennaro, R. Purification, composition, and activity of two bactenecins, antibacterial peptides of bovine neutrophils / R. Gennaro, B. Skerlavaj, D. Romeo // *Infect. Immun.* – 1989. – Vol. 57, N 10. – P. 3142-3146.

Giacometti, A. Antiendotoxin activity of protegrin analog IB-367 alone or in combination with piperacillin in different animal models of septic shock / A. Giacometti, O. Cirioni, R. Ghiselli, [et al.] // *Peptides.* – 2003. – Vol. 24. – P. 1747-1752.

Giacometti, A. Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide 29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock / A. Giacometti, O. Cirioni, R. Ghiselli, [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2004a. – Vol. 169. – P. 187-194.

Giacometti, A. The antimicrobial peptide BMAP-28 reduces lethality in mouse models of staphylococcal sepsis / A. Giacometti, O. Cirioni, R. Ghiselli, [et al.] // *Crit. Care Med.* – 2004b. – Vol. 32. – P. 2485-2490.

Gordon, J. The relationship between the bactericidal power of normal guinea pig serum and complement activity / J. Gordon, A. Wormald // *J. Pathol. Bacteriol.* – 1928. – Vol. 31. – P. 753-768.

Goujon, E. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice / E. Goujon, P. Parnet, S. Laye, [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 1995. – Vol. 9. – P. 292-303.

Groves, M.L. The isolation of a red protein from milk. / M.L. Groves // *J.Fmer.Chem.Soc.* – 1960. – Vol. 82, N 12. – P. 3345-3350.

Guillén, C. Enhanced Th1 response to *Staphylococcus aureus* infection in human lactoferrin-transgenic mice. / C. Guillén, I.B. McInnes, D.M. Vaughan, [et al.] // *J Immunol.* – 2002. – Vol. 168(8). – P. 3950-3957.

Hakim, A. Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation / A. Hakim, T.A. Fuchs, N.E. Martinez [et al.] // *Nat. Chem. Biol.* – 2011. – Vol. 7. – P. 75-77.

Hale, J.D.F. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria / John D.F. Hale and Robert E.W. Hancock // *Expert Review of Anti-infective Therapy.* – 2007. – Vol. 5(6). – P. 951-959.

Hancock, R.E.W. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials / R.E.W. Hancock // *Lancet Infect Dis.* – 2001. – Vol. 1(3). – P. 156-164.

Hancock, R.E.W. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics / R.E.W. Hancock, A. Patrzykat // *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* – 2002. – Vol. 2(1). – P. 79-83.

Hancock, R.E.W. Peptide antibiotics / R.E.W. Hancock // *Lancet.* – 1997. – Vol. 349(9049). – P. 418-422.

Haneke, E. The Papillon-Lefevre syndrome: keratosis palmoplantaris with periodontopathy. Report of a case and review of the cases in the literature / E. Haneke // *Hum. Genet.* – 1979. – Vol. 51. – P. 1-35.

Hansen, N.E. Plasma myeloperoxidase and lactoferrin measured by radioimmunoassay: relations to neutrophil kinetics. / N.E. Hansen, J. Malmquist, J. Thorell // *Acta Med Scand.* – 1975. – Vol. 198(6). – P. 437-443.

Hansson, M. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase / M. Hansson, I. Olsson, W.M. Nauseef // *Arch Biochem Biophys.* – 2006. – Vol. 445(2). – P. 214-224.

Hao, X. Amphibian cathelicidin fills the evolutionary gap of cathelicidin in vertebrate / X. Hao, H. Yang, L. Wei, [et al.] // *Amino Acids.* – 2012. – Vol. 43. – P. 677-685.

Harder, J. A peptide antibiotic from human skin / J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.-M. Schröder // *Nature*. – 1997. – Vol. 387. – P. 861-861.

Harder, J. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic / J. Harder, J. Bartels, E. Christophers, J.M. Schröder // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 5707-5713.

Harvey, L.E. Defensin DEFB103 bidirectionally regulates chemokine and cytokine responses to a pro-inflammatory stimulus. / L.E. Harvey, K.G. Kohlgraf, L.A. Mehalick, [et al.] // *Sci Rep*. – 2013. – Vol. 3. –P. 1232. doi: [10.1038/srep01232](https://doi.org/10.1038/srep01232)

Harwig, S.S. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antivicrobial peptide from porcine leukocytes / S.S. Harwig, V.N. Kokryakov, K.M. Swiderek [et al.] // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 362, N 1. – P. 65-69.

Harwig, S.S. Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis / S.S. Harwig, N.P. Chen, A.S.K. Park, R.I. Lehrer // *Anal. Biochem.* – 1993. – Vol. 208. – P. 382-386.

Harwig, S.S.L. Gallinacins: Cystein - rich antimicrobial, peptides of chicken leukocytes / S.S.L. Harwig, K.M. Swiderek, V.N. Kokryakov, [et al.] // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 342. – P. 281-285.

Haukland, H.H. The antimicrobial peptides lactoferricin B and magainin 2 cross over the bacterial cytoplasmic membrane and reside in the cytoplasm / H.H. Haukland, H. Ulvatne, K. Sandvik, L.H. Vorland // *FEBS Lett.* – 2001. – Vol. 508(3). – P. 389-393.

Håversen, L. Lactoferrin down-regulates the LPS-induced cytokine production in monocytic cells via NF- κ B. / L. Håversen, B.G. Ohlsson, M. Hahn-Zoric, [et al.] // *Cell. Immunol.* – 2002. – Vol. 220(2). – P. 83-95.

Hayes, T.G. Phase I trial of oral talactoferrin alfa in refractory solid tumors. / T.G. Hayes, G.F. Falchook, G.R. Varadhachary, [et al.] // *Investigational New Drugs*. – 2006. – Vol. 24(3). – P. 233-240.

He, J. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. / J. He, P. Furmanski // *Nature*. – 1995. – Vol. 373(6516). – P. 721-724.

Higazi, A.A. Defensin stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells / A.A. Higazi, E. Lavi, K. Bdeir, [et al.] // *Blood*. – 1997. – Vol. 89. – P. 4290-4298.

Higazi, A.A. The alpha-defensins stimulate proteoglycan-dependent catabolism of low-density lipoprotein by vascular cells: a new class of inflammatory apolipoprotein and a possible contributor to atherogenesis / A.A. Higazi, T. Nassar, T. Ganz, [et al.] // *Blood*. – 2000. – Vol. 96. – P. 1393-1398.

Hiramoto, K. Mild exercise suppresses exacerbation of dermatitis by increasing cleavage of the β -endorphin from proopiomelanocortin in NC/Nga mice / Keiichi Hiramoto, Hiromi Kobayashi, Atsuo Sekiyama, [et al.] // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2013. – Vol. 52, No. 1. – P. 58–63

Hirsch, J. G. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes / J. G. Hirsch // *J. Exptl. Med.* – 1956. – Vol. 103. – P. 589-611.

Hoffmann, J.A. The immune response of *Drosophila*. / J.A. Hoffmann // *Nature*. – 2003. – Vol. 426(6962). – P. 33-38.

Hollox, E.J. Psoriasis is associated with increased β -defensin genomic copy number. / E.J. Hollox, U. Huffmeier, P.L. Zeeuwen, [et al.] // *Nat. Genet.* – 2008. – Vol. 40. – P. 23-25.

Hong, R.W. Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A / R.W. Hong, M. Shchepetov, J.N. Weiser, P.H. Axelsen // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47(1). – P. 1-6.

Hu, J. Localization and measurement of corticostatin-1 in nonpregnant and pregnant rabbit tissues during late gestation / J. Hu, S. Jothy, S. Solomon // *Endocrinology*. – 1993. – Vol.132, N 6. – P. 2351-2359.

Huang, H.-J. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide / H.-J. Huang, C.R. Ross, F. Blecha // *J. Leukoc. Biol.* – 1997. – Vol. 61. – P. 624-629.

Hunter, H.N. Human lactoferricin is partially folded in aqueous solution and is better stabilized in a membrane mimetic solvent. / H.N. Hunter, A.R. Demcoe, H. Jenssen, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49(8). – P. 3387-3395.

Hurtado, P. LL-37 promotes rapid sensing of CpG oligodeoxynucleotides by B lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells / P. Hurtado, C.A. Peh // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184. – P. 1425-1435.

Hwang, P.M. Three-dimensional solution structure of lactoferricin B, an antimicrobial peptide derived from bovine lactoferrin. / P.M. Hwang, N. Zhou, X. Shan, [et al.] // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37(12). – P. 4288-4298.

Hwang, S.A. Lactoferrin augments BCG vaccine efficacy to generate T helper response and subsequent protection against challenge with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. / S.A. Hwang, M.L. Kruzel, J.K. Actor // *Int Immunopharmacol.* – 2005. – Vol. 5(3). – P. 591-599.

Ichinose, M. Enhancement of phagocytosis by corticostatin I (CSI) in cultured mouse peritoneal macrophages. / M. Ichinose, M. Asai, K. Imai, M. Sawada // *Immunopharmacology.* – 1996. – Vol. 35(2). – P. 103-109.

Ikeda, Y. PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion / Y. Ikeda, L.H. Young, R. Scalia, [et al.] // *Cardiovasc. Res.* – 2001. – Vol. 49. – P. 69-77.

Ivanov, I.B. Comparative activities of cattle and swine platelet microbicidal proteins / I.B. Ivanov, V.A. Gritsenko // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* – 2009. – Vol. 1. – P. 148-151.

Jacobs, A.A. Mycoplasmacidal activity of peroxidase-H₂O₂-halide systems / A.A. Jacobs, J.E. Lew, B.B. Paul // *Infect. Immun.* – 1972. – Vol.5, No 1. – P.127-131.

Jain, A. Marine antimicrobial peptide tachyplesin as an efficient nanocarrier for macromolecule delivery in plant and mammalian cells / A. Jain, B.K. Yadav, A. Chugh // *FEBS J.* – 2014. – Vol. 282. – P. 732-745.

James, P.E. Tissue hypoxia during bacterial sepsis is attenuated by PR-39, an antibacterial peptide / P.E. James, M. Madhani, C. Ross, [et al.] // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2003. – Vol 530. – P. 645-652

Janeway, C.A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology / C.A. Janeway // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* – 1989. – Vol. 54. – P. 1-13.

Janeway, C.A. Innate immunity recognition / C.A. Janeway, R. Medzhitov // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – Vol. 20. – P. 197-216.

Janeway, Ch. Jr. A trip through my life with an immunological theme / Ch. Janeway // *Annu. Rev. Immunol.* – 2002. – No. 20. – P. 1-28.

Janssens, W. Genomic copy number determines functional expression of β -defensin 2 in airway epithelial cells and associates with chronic obstructive pulmonary disease. / W. Janssens, H. Nuytten, L.J. Dupont, [et al.] // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – Vol. 182. – P. 163-169.

Jenne, C.N. Neutrophils recruited to sites of infection protect from virus challenge by releasing neutrophil extracellular traps / C.N. Jenne, C.H. Wong, F.J. Zemp [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2013. – Vol. 13. – P. 169-180.

Jenssen, H. Peptide antimicrobial agents / H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock // Clin. Microbiol. Rev. – 2006. – Vol. 19(3). – P. 491-511.

Johanson, B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk. / B. Johanson // Acta Chem.Scand. – 1960. – Vol. 14, N 2. – P. 510-512.

Johnson, J.D. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production / J.D. Johnson, K.A. O'Connor, T. Deak, [et al.]// Brain Behav. Immun. – 2002. – Vol. 16. – P. 461-476.

Johnston, B. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1 / B. Johnston, A.R. Burns, M. Suematsu, [et al.] // J Clin Invest. 1999. – Vol. 103. – P. 1269-1276.

Jolles, J. Mare lactotransferrin: purification, analysis, and N-terminal sequence determination. / J. Jolles, A. Donda, P. Amiguet, P. Jolles // FEBS Lett. – 1984. – Vol. 176, N 1. – P. 185-188.

Joly, S. Human β -defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms / S. Joly, C. Maze, P.B. McCray, J.M. Guthmiller // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 1024-1029.

Jung, S. Macin family of antimicrobial proteins combines antimicrobial and nerve repair activities. / S. Jung, F.D. Sönnichsen, C.W. Hung, [et al.] // J Biol Chem. – 2012. – Vol. 287(17). – P. 14246-14258.

Kaelin, C.B. New ligands for melanocortin receptors / C.B. Kaelin, S.I. Candille, B. Yu, [et al.]// International Journal of Obesity. – 2008. – Vol. 32. – P. S19-S27.

Kaiser, V. Expression of mammalian defensin genes / V. Kaiser, G. Diamond // J. Leukoc. Biol. – 2000. – Vol. 68. – P. 779-784.

Kamemori, N. Suppressive effects of milk-derived lactoferrin on psychological stress in adult rats / N. Kamemori, T. Takeuchi, K. Hayashida, E. Harada // Brain Res. – 2004. – Vol. 1029(1). – P. 34-40.

Kamp, V.M. Human suppressive neutrophils CD16bright/CD62Ldim exhibit decreased adhesion / V.M. Kamp, J. Pillay, J.W. Lammers [et al.] // J Leukoc Biol. – 2012. – Vol. 92. – P. 1011-1020.

Kelkar, D.A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein / D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1768. – P. 2011-2025.

Khanfer, R. Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress / R. Khanfer, A.C. Phillips, D. Carroll, J.M. Lord // *Psychosomatic Medicine*. – 2010. – Vol. 72. – P. 636-640.

Kimak, E. Myeloperoxidase level and inflammatory markers and lipid and lipoprotein parameters in stable coronary artery disease / E. Kimak, B. Zięba, D. Duma, J. Solski // *Lipids Health Dis*. – 2018. – Vol. 17(1). – P. 71. doi: 10.1186/s12944-018-0718-4.

Kinkade, J.M. Isolation and characterization of murine lactoferrin. / J.M. Kinkade, W. Miller, F. Segars // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1976. – Vol. 446. – P. 407-418.

Klebanoff S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxidase antibacterial system / S.J. Klebanoff // *J. Bacteriol.* – 1968. – Vol. 96 (5), No 10. – P.2131-2138.

Klebanoff, S.J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism / S.J. Klebanoff // *J. Exp. Med.* – 1967. – Vol.126, No 6. – P.1063-1078.

Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms / Seymour J. Klebanoff, Anthony J. Kettle, Henry Rosen, [et al.]// *J Leukoc Biol.* – 2013. – Vol. 93(2). – P. 185-198.

Klebanoff, S.J. Role of myeloperoxidase-mediated system in intact leukocytes / Klebanoff S.J., Hamon C.B.// *J. Reticuloendothel. Soc.* – 1972. – Vol. 12, No. 2. – P.170-196.

Klebanoff, S.J. The neutrophil: function and clinical disorders. / S.J. Klebanoff, R.A. Clark // – Amsterdam, 1978. – 810 p.

Knutson, M.D. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin / M.D. Knutson, M. Oukka, L.M. Koss, [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2005. – Vol. 102. – P. 1324-1328.

Kobayashi, S.D. An apoptosis differentiation programme in human polymorphonuclear leucocytes. / S.D. Kobayashi, F.R. DeLeo // *Biochem Soc Trans.* – 2004. – Vol. 32. – P. 474-476.

Kobayashi, S.D. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils / S.D. Kobayashi, K.R. Braughton, A.R. Whitney, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003a. – Vol. 100. – P. 10948-10953.

Kobayashi, S.D. Downregulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes / S.D. Kobayashi, J.M. Voyich, K.R. Braughton, F.R. DeLeo // *J Immunol.* – 2003b. – Vol. 170. – P. 3357-3368.

Koczulla, R. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 / R. Koczulla, G. von Degenfeld, C. Kupatt, F. [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111. – P. 1665-1672.

Kokryakov, V.N. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins / V.N. Kokryakov, S.S. Harwig, E.A. Panyutich, [et al.] // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 327, N2. – P. 231-236.

Koo, H. B. Antimicrobial peptides under clinical investigation / H.B. Koo, J. Seo // *Peptide Science.* – 2019. – P. e24122.

Korneva, E.A. Defensins: antimicrobial peptides with a broad spectrum of biological activity / E.A. Korneva, V.N. Kokryakov // *Neuroimmune Biology.* – 2003. – Vol. 3. – P.451-462.

Kosciuczuk, E.M. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review, / E.M. Kosciuczuk, P. Lisowski, J. Jarczak, N. [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39(12). – P. 10957-10970.

Kougias, P. Neutrophil antimicrobial peptide alpha-defensin causes endothelial dysfunction in porcine coronary arteries / P. Kougias, H. Chai, P.H. Lin, [et al.]// *J. Vasc. Surg.* – 2006. – Vol. 43. – P. 357-363.

Krijgsveld, J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines / J. Krijgsveld, S.A Zaat, J. Meeldijk, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275. – P. 20374-20381.

Kruger, P. Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. / P. Kruger, M. Saffarzadeh, A.N. Weber, [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11. – P. e1004651. doi:10.1371/journal.ppat. 1004651.

Kubes, P. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. / P. Kubes, J. Hunter, D.N. Granger // *Gastroenterology.* – 1992. – Vol. 103. – P. – 807-812.

Kubes, P. The enigmatic neutrophil: what we do not know / P. Kubes // *Cell Tissue Res.* – 2018. – Vol. 371. – P. 399-406.

Kumar, V. Is neuroimmunomodulation a future therapeutic approach for sepsis? / V. Kumar a, A. Sharma // *International Immunopharmacology.* – 2010. – Vol. 10. – P. 9-17.

Kuwata, H. Direct evidence of the generation in human stomach of an antimicrobial peptide domain (lactoferricin) from ingested lactoferrin. / H. Kuwata, T.T. Yip, M. Tomita, T.W. Hutchens // *Biochim Biophys Acta*. – 1998. – Vol. 1429(1). – P. 129-141.

Kuwata, H. Functional fragments of ingested lactoferrin are resistant to proteolytic degradation in the gastrointestinal tract of adult rats. / H. Kuwata, K. Yamauchi, S. Teraguchi, [et al.] // *J Nutr*. – 2001. – Vol. 131(8). – P. 2121-2127.

Lai, Y. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense / Y. Lai, R.L. Gallo // *Trends Immunol*. – 2009. – Vol. 30. – P. 131-141.

Lambert, J. Insect immunity: isolation from immune hemolymph of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence similarity to rabbit lung macrophages bacterial peptides / J. Lambert, E. Keppi, J. L. Dimarcq [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1989. – Vol. 86. – P.262-266.

Lande, R. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide / R. Lande, J. Gregorio, V. Facchinetti, [et al.] // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 564-569.

Landzberg, M. Quantifying oral inflammatory load: oral neutrophil counts in periodontal health and disease / M. Landzberg, H. Doering, G.M. Aboodi, [et al.] // *J Periodontal Res*. – 2015. – Vol. 50. – P. 330-336.

Lee, S.H. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. / S.H. Lee, H.K. Jun, H.R. Lee, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2010. – Vol. 35(2). – P. 138-145.

Lee, W.Y. An intravascular immune response to *Borrelia burgdorferi* involves Kupffer cells and iNKT cells / W.Y. Lee, T.J. Moriarty, CH Wong, [et al.] // *Nat Immunol*. – 2010. – Vol. 11. – P. 295-302.

Lefkowitz, D.L. The endothelium and cytokine secretion: The role of peroxidases as an immunoregulator / D.L. Lefkowitz, E. Roberts, K. Grattendick [et al.] // *Cell Immunol*. – 2000. – Vol. 202. – P. 23-30.

Legrand, D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes / D. Legrand // *Biochem Cell Biol*. – 2012. – Vol. 90(3). – P. 252-268.

Legrand, D. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. / D. Legrand, K. Vigie, E.A. Said, [et al.] // *Eur. J. Biochem*. – 2004. – Vol. 271(2). – P. 303-317.

Lehrer, R.I. Antifungal effects of peroxidase systems / R.I. Lehrer // J. Bacteriol. – 1969. – Vol.99, No 2. – P.361-365.

Lehrer, R.I. Defensins of vertebrate animals / R.I. Lehrer, T. Ganz // Curr. Opin. Immunol. – 2002. – Vol.14. – P. 96-102

Lehrer, R.I. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells / R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, T. Ganz // Annu. Rev. Immunol. – 1993. – Vol. 11. – P. 105-128.

Lehrer, R.I. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells / R.I. Lehrer, A.K. Lichtenstein, T. Ganz // Annu. Rev. Immunol. – 1993. – Vol. 11. – P. 105-128.

Lehrer, R.I. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides / Robert I. Lehrer, Tomas Ganz // Annals New York Academy of Sciences. – 1996. – Vol. 797. – P. 228-239

Lehrer, R.I. Increased content of microbicidal cationic peptides in rabbit alveolar macrophages elicited by complete Freund adjuvant / R.I. Lehrer, D. Szklarek, M.E. Selsted, J. Fleischmann // Infect.Immun. – 1981. – Vol. 33. – P .775-778.

Lehrer, R.I. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / R.I. Lehrer, M. Rosenman, S.S. Harwig, [et al.] // J.Immunol.Methods. – 1991. – Vol.137. – P.167-173.

Lehrer, R.I. α -Defensins in human innate immunity / R.I. Lehrer, W. Lu // Immunol. Rev. – 2012. – Vol. 245. – P. 84-112.

Lehrer, R.I. θ -Defensins: cyclic peptides with endless potential. / R.I. Lehrer, A.M. Cole, M.E. Selsted // J Biol Chem. – 2012b. – Vol. 287(32). – P. 27014-27019

Leitgeb, B. The history of Alamethicin: A review of the most extensively studied peptaibol / B. Leitgeb, A. Szekeres, L. Manczinger, C. [et al.] // Chem. Biodivers. – 2007. – Vol. 4. – P. 1027-1051.

Li, W. A novel antimicrobial peptide from skin secretions of the earthworm, *Pheretima guillelmi* (Michaelsen) / W. Li, S. Li, J. Zhong, [et al.] // Peptides. – 2011. – Vol. 32. – P. 1146-1150.

Liew, P.X. iNKT cells orchestrate a switch from inflammation to resolution of sterile liver injury / P.X. Liew, W.Y. Lee, P. Kubes // Immunity. – 2017. – Vol. 47. – P. 752-765.e5.

Liew, P.X. The neutrophil's role during health and disease. / Pei Xiong Liew and Paul Kubes // Physiol Rev. – 2019. – Vol. 99. – P. 1223-1248.

Lilius, E-M. Bacterial infections, DNA virus infections, and RNA virus infections manifest differently in neutrophil receptor expression / Esa-Matti Lilius and Jari Nuutila // *The Scientific World Journal*. – 2012. – Vol. 2012. – Article ID 527347. doi: 10.1100/2012/527347

Lishko, V. Identification of human cathelicidin peptide LL-37 as a ligand for macrophage integrin $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ (MAC-1, CD11b/CD18) that promotes phagocytosis by opsonizing bacteria / V. Lishko, B. Moreno, N. Podolnikova, T. Ugarova // *Res. Rep. Biochem.* – 2016. – Vol. 6. – P. 39-55.

Liu, J. The melanocortinergetic pathway is rapidly recruited by emotional stress and contributes to stress-induced anorexia and anxiety-like behavior / Jing Liu, Jacob C. Garza, Ha V. Truong, [et al.] // *Endocrinology*. – 2007. – Vol. 148(11). – P. 5531-5540.

Liu, L. The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry / L. Liu, C. Zhao, H.H. Heng, T. Ganz // *Genomics*. – 1997. – Vol. 43. – P. 316-320.

Lord, B.I. The kinetics of human granulopoiesis following treatment with granulocyte colony-stimulating factor in vivo / B.I. Lord, M.H. Bronchud, S. Owens, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1989. – Vol. 86(23). – P. 9499-9503.

Lu, L. Protective influence of lactoferrin on mice infected with the polycythemia-inducing strain of Friend virus complex / L. Lu, G. Hangoc, A. Oliff, [et al.] // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47. – P. 4184-4188.

Lyadova, I.V. Neutrophils in tuberculosis: heterogeneity shapes the way? / Irina V. Lyadova // *Mediators of Inflammation*. – 2017. – Article ID 8619307, 11 pages. – <https://doi.org/10.1155/2017/8619307>

Maacks, S.Y.H. Development and evaluation of luminescence based sandwich assay for plasma lactoferrin as a marker for sepsis and bacterial infections in pediatric medicine. / S.Y.H. Maacks, W.G. Wood // *J Biolumin Chemilumin*. – 1989. – Vol. 3. – P. 221–226.

Maekawa, Y. Lactoferrin ameliorates corticosterone related acute stress and hyperglycemia in rats / Yuta Maekawa, Akihiko Sugiyama and Takashi Takeuchi // *J. Vet. Med. Sci.* – 2017. – Vol. 79(2). – P. 412-417.

Maffei, F.A. Levels of antimicrobial molecules defensin and lactoferrin are elevated in the cerebrospinal fluid of children with meningitis / F.A. Maffei, R.P. Heine, M.J. Whalen, [et al.] // *Pediatrics*. – 1999. – Vol. 103, No.5 (Pt 1). – P. 987-992.

Mak, P. Isolation, antimicrobial activities, and primary structures of hamster neutrophil defensins / P. Mak, K. Wójcik, I.B. Thogersen, A. Dubin // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64. – P. 4444-4449.

Manna, S.K. α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF- κ B activation induced by various inflammatory agents / Sunil K. Manna and Bharat B. Aggarwal. // *J. Immunol.* – 1998. – Vol. 161. – P. 2873-2880.

Marchand, C. Covalent binding of the natural antimicrobial peptide indolicidin to DNA abasic sites / C. Marchand, K. Krajewski, H.F. Lee [et al.] // *Nucl. Acids Res.* – 2006. – Vol. 34(18). – P. 5157-5165.

Marchini, D. Purification and primary structure of ceratotoxin-a and ceratotoxin-b, 2 antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta, Diptera) / D. Marchini, P.C. Giordano, R. Amons [et al.]. // *Insect Biochem. Molec. Dial.* – 1993. – Vol.23. – P.591-598.

Marcinkiewicz, J. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators / J. Marcinkiewicz, A. Grabowska, J. Bereta, T. Stelmaszynska // *J. Leucocyte Biol.* – 1995. – Vol. 58. – P. 667-674.

Martin, C. Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence / C. Martin, P.C. Burdon, G. Bridger, [et al.] // *Immunity.* – 2003. – Vol. 19(4). – P. 583-593.

Martinez-Cayuela, M. Oxygen free radicals and human disease / M. Martinez-Cayuela // *Biochimie.* – 1995. – Vol. 77, No. 3. – P. 147-161.

Masson P.L. La lactoferrine. Proteine des secretionsexternes et des leucocyte neutrophiles / P.L. Masson. – Bruxelles: Aracia, 1970. – 232 p.

Masson, P.L. Immunohistochemical localization and bacteriostatic properties of an iron-binding protein from bronchial mucus. / P.L. Masson, J.F. Heremans, J.J. Prignot, G. Wauters // *Thorax.* – 1966. – Vol. 21(6). – P. 538-544.

Masson, P.L. Lactoferrin in milk from different species. / P.L. Masson, J.F. Heremans // *Comp Biochem Physiol B.* – 1971. – Vol. 39(1). – P. 119-129.

Masson, P.L. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. / P.L. Masson, J.F. Heremans, E. Schonne // *J. Exp. Med.* – 1969. – Vol. 130, N 3. – P. 643-658.

Matsuda, A. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses / Akihisa Matsuda, Asha Jacob, Rongqian Wu, [et al.] // *J Nippon Med Sch.* – 2012. – Vol. 79. – P. 4-18.

Matsuzaki, K. An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation / K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima // *Biochemistry.* – 1996. – Vol. 35(35). – P. 11361-11368.

McDonald, B. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis / B. McDonald, R. Urrutia, B.G. Yipp, [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2012. – Vol. 12. – P. 324-333.

McManus, B. Compared to casein, bovine lactoferrin reduces plasma leptin and corticosterone and affects hypothalamic gene expression without altering weight gain or fat mass in high fat diet fed C57/BL6J mice / B. McManus, R. Korpela, P. O'Connor, [et al.] // *Nutrition & Metabolism.* – 2015. – Vol. 12. – P. 53. doi: 10.1186/s12986-015-0049-7

Meilinger, M. Removal of lactoferrin from plasma is mediated by binding to low density lipoprotein receptor-related protein/a 2-macroglobulin receptor and transport to endosomes. / M. Meilinger, M. Haumer, K.A. Szakmary, [et al.] // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 360(1). – P. 70-74.

Meltzer, J.C. Stress-induced suppression of in vivo splenic cytokine production in the rat by neural and hormonal mechanisms / Jonathan C. Meltzer, Brian J. MacNeil, Veronica Sanders, [et al.] // *Brain Behav. Immun.* – 2004. – Vol. 18(3). – P. 262-273.

Menegazzi, R. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? / R. Menegazzi, E. Decleva & P. Dri // *Blood.* – 2012. – Vol. 119. – P. 1214-1216.

Mercado, A.M. Restraint stress alters the expression of interleukin-1 and keratinocyte growth factor at the wound site: an in situ hybridization study / Ana M. Mercado, Ning Quan, David A. Padgett, [et al.] // *J Neuroimmunol.* – 2002. – Vol. 129(1-2). – P. 74-83.

Metzler, K.D. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity / K.D. Metzler, T.A. Fuchs, W.M. Nauseef [et al.] // *Blood.* – 2011. – Vol. 117. – P. 953-959.

Mikkelsen, T.L. Sialic acid-containing milk proteins show differential immunomodulatory activities independent of sialic acid. / T.L. Mikkelsen, S. Bakman, E.S. Sørensen, [et al.] // *J Agric Food Chem.* – 2005. – Vol. 53(20). – P.7673-7680.

Milona, P. The chicken host peptides, gallinacins 4, 7, and 9 have antimicrobial activity against *Salmonella* serovars / P. Milona, C.L. Townes, R.M. Bevan, J. Hall // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 356(1). – P. 169-174.

Mitta, G. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity / G. Mitta, F. Vandenbulcke, P. Roch // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 486. – P. 185-190.

Mohri, M. Suppression of the TNF α -induced increase in IL-1 α expression by hypochlorite in human corneal epithelial cells / M. Mohri, P.S. Reinach, A. Kanayama, [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2002. – Vol. 43, No. 10. – P. 3190-3195.

Mookherjee, N. Bovine and human cathelicidin cationic host defense peptides similarly suppress transcriptional responses to bacterial lipopolysaccharide / N. Mookherjee, H.L. Wilson, S. Doria, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2006a – Vol. 80. – P. 1563-1574.

Mookherjee, N. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37 / N. Mookherjee, K.L. Brown, D.M.E. Bowdish, [et al.] // *J. Immunol.* – 2006b – Vol. 176. – P. 2455–2464.

Mor, A. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin / A. Mor, P. Nicolas // *Eur. J. Biochem.* – 1994. – Vol. 219. – P. 145-154.

Morikawa, N. Brevinin-I and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog *Rana brevipoda porsa* / N. Morikawa, K. Hagiwara, T. Nakajima // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1992. – Vol.189. – P.184-190.

Motzkus, D. The novel beta-defensin DEFB123 prevents lipopolysaccharide-mediated effects in vitro and in vivo / D. Motzkus, S. Schulz-Maronde, A. Heitland, [et al.] // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20(10). – P. 1701-1702.

Murray, J. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro / J. Murray, J.A. Barbara, S.A. Dunkley, [et al.] // *Blood.* – 1997. – Vol. 90(7). – P. 2772-2783.

Mygind, P.H. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus / P.H. Mygind, R.L. Fischer, K.M. Schnorr, [et al.]// *Nature.* – 2005. – Vol. 437. – P. 975-980.

Nauseef, W.M. Neutrophils at work / William M Nauseef, Niels Borregaard // *Nature Immunology.* – 2014. – Vol. 15. – P. 602-611.

Nauseef, W.M. Roles of heme insertion and the mannose-6-phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, myeloperoxidase / W.M. Nauseef, S. McCormick, H. Yi // *Blood*. – 1992. – Vol. 80(10). – P. 2622-2633.

Neubauer, O. Transcriptome analysis of neutrophils after endurance exercise reveals novel signaling mechanisms in the immune response to physiological stress / Oliver Neubauer, Surendran Sabapathy, Ross Lazarus, [et al.] // *J Appl Physiol*. – 2013. – Vol. 114. – P. 1677-1688.

Nguyen, T.X. Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth. / T.X. Nguyen, A.M. Cole, R.I. Lehrer // *Peptides*. – 2003. – Vol. 24(11). – P. 1647-1654.

Nijnik, A. The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. / A. Nijnik, R.E. Hancock // *Curr Opin Hematol*. – 2009. – Vol. 16. – P. 41-47.

Niyonsaba, F. Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. / F. Niyonsaba, H. Ushio, N. Nakano, [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 2007. – Vol. 127(3). – P. 594-604.

Niyonsaba, F. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins- 1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells / F. Niyonsaba, A. Someya, M. Hirata, [et al.] // *Eur J Immunol*. – 2001. – Vol. 31(4). – P. 1066-1075.

Nizet, V. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. / V. Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 414. – P. 454-457.

Nys, M. Nitric oxide-related products and myeloperoxidase in bronchoalveolar lavage fluids from patients with ALI activate NF-kappa B in alveolar cells and monocytes / M. Nys, J.C. Preiser, G. Deby-Dupont, [et al.] // *Vascul. Pharmacol*. – 2005. – Vol. 43(6). – P. 425-433.

O'Connor, K.A. Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor / Kevin A. O'Connor, John D. Johnson, Michael K. Hansen, [et al.] // *Brain Res*. – 2003– Vol. 991(1-2). – P 123-132.

Ogawa, Y. Peripherally administered orexin improves survival of mice with endotoxin shock / Y. Ogawa, Y. Irukayama-Tomobe, N. Murakoshi, [et al.] // *Elife*. – 2016. – Vol. 5. – P. e21055. doi: 10.7554/eLife.21055.

- Ohta, K. Additive effects of orexin B and vasoactive intestinal polypeptide on LL-37-mediated antimicrobial activities / K. Ohta, M. Kajiya, T. Zhu, [et al.] // *J Neuroimmunol.* – 2011. – Vol. 233(1-2). – P. 37-45.
- Oram, J.D. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents / J.D. Oram, B. Reiter // *Biochim Biophys Acta.* – 1968. – Vol. 170(2). – P. 351-365.
- Orwa, J.A. Isolation and structural characterization of polymyxin B components / J.A. Orwa, C. Govaerts, R. Busson, [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2001. – Vol. 912. – P. 369-373.
- Osborn, R.W. Isolation and characterisation of plant defensins from seeds of *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Hippocastanaceae* and *Saxifragaceae* / R.W. Osborn, G.W. De Samblanx, K. Thevissen, [et al.] // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 368. – P. 257-262.
- Ouellette, A.J. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine / A.J. Ouellette // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2004. – Vol. 18. – P. 405-419.
- Ouellette, A.J. Mouse Paneth cell defensins: Primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms / A.J. Ouellette, M.M. Hsieh, M.T. Nosek, [et al.] // *Infect. Immun.* – 1994. – Vol. 62. P. – 5040-5047.
- Ouellette, A.J. Paneth cell α -defensins in enteric innate immunity / A.J. Ouellette // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2011. – Vol. 68. – P. 2215-2229.
- Ovchinnikova, T.V. Aurelin, a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins / T.V. Ovchinnikova, S.V. Balandin, G.M. Aleshina, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Vol. 348, No. 2. – P. 514-523.
- Overhage, J. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation / J. Overhage, A. Campisano, M. Bains, [et al.] // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76. – P. 4176-4182.
- Owen, C.A. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis / Owen C.A., Campbell E.J. // *J Leukoc Biol.* – 1999. – Vol. 65(2). – P. 137-150.
- Pallister, I. Alteration of polymorphonuclear neutrophil surface receptor expression and migratory activity after isolation: comparison of whole blood and isolated PMN preparations from normal and postfracture trauma patients / I. Pallister, R. Bhatia, G. Katpalli, [et al.] // *J Trauma.* – 2006. – Vol. 60, No. 4. – P. 844-850.

Pallister, I. Chemiluminescence: comparison of whole blood with isolated polymorphonuclear leukocytes after major trauma / I. Pallister, N. Topley // *J. Trauma.* – 2004. – Vol. 57, No. 2. – P. 347-351.

Pan, W. Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aibuhitensis grube* and its partial characterization / W. Pan, X. Liu, F. Ge, [et al.] // *J. Biochem.* – 2004. – Vol. 135 (3). – P. 297-304.

Panyim, S. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones / S. Panyim, R. Chalkley // *Arch. Biochem. and Biophys.* – 1969. – Vol. 130, N 2. – P. 337-346.

Panyutich, A.V. An enzyme immunoassay for human defensins / A.V. Panyutich, N.N. Voitenok, R.I. Lehrer, T. Ganz // *J. Immunol. Methods.* – 1991. – Vol.141. – P. 149-155.

Panyutich, A.V. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis / A.V. Panyutich, E.A. Panyutich, V.A. Krapivin, [et al/] // *J. Lab. Clin. Med.* – 1993. – Vol. 122, No. 2. – P. 202-207.

Papayannopoulos, V. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / V. Papayannopoulos, K.D. Metzler, A. Hakkim, A. Zychlinsky // *J. Cell Biol.* – 2010. – Vol. 191. – P. 677-691.

Park, C.B. A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans* / C.B. Park, M.S. Kim, S.C. Kim // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1996. – Vol. 218(1). – P. 408-413.

Park, C.B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions / C.B. Park, H.S. Kim, S.C. Kim // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1998. – Vol. 244(1). – P. 253-257.

Park, C.B. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II / C.B. Park, K.S. Yi, K. Matsuzaki, [et al.] // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol. 97(15). – P. 8245-8250.

Park, C.H. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver / C.H. Park, E. V. Valore, A.J. Waring, T. Ganz // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 7806-7810.

Park, J.M. Antimicrobial peptides from the skin of a Korean frog, *Rana rugosa*. / J.M. Park, J.E. Jung, B.J. Lee // *Biochemistry Biophysical Research Communication.* – 1994. – Vol. 205. – P. 948-954.

Park, S. Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from *Rana nigromaculata* / S. Park, S.H. Park, H.C. Ahn, [et al.] // FEBS Lett. – 2001. – Vol. 507. – P. 95-100.

Park, Y.S. Antioxidant binding of caeruloplasmin to myeloperoxidase: myeloperoxidase is inhibited, but oxidase, peroxidase and immunoreactive properties of caeruloplasmin remain intact / Y.S. Park, K. Suzuki, S. Mumby, [et al.] // Free Radic Res. – 2000. – Vol. 33, No. 3. – P. 261-265.

Patil, A.A. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract / A.A Patil, Y. Cai, Y. Sang, [et al.]// Physiol. Genomics. – 2005. – Vol. 23. – P. 5-17.

Patrzykat, A. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli* / A. Patrzykat, C.L. Friedrich, L. Zhang, [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46(3). – P. 605-614.

Paulsen, F.P. Detection of natural peptide antibiotics in human nasolacrimal ducts / F.P. Paulsen, T. Pufe, U. Schaudig, [et al.] // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2001. – Vol. 42(10). – P. 2157-2163.

Pawlica-Gosiewska, D. The use of selected neutrophil protein plasma concentrations in the diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis – a preliminary report. / D. Pawlica-Gosiewska, B. Solnica, K. Gawlik, [et al.] // Postepy Hig Med Dosw (Online). – 2017. – Vol. 71. – P. 243-253.

Payne, J.W. The primary structure of alamethicin / J.W. Payne, R. Jakes, B.S. Hartley // Biochem J. – 1970. – Vol. 117(4). – P. 757-766.

Pazgier, M. Human β -defensins / M. Pazgier, D.M. Hoover, D. Yang, [et al.]// Cell. Mol. Life Sci. – 2006. – Vol. 63. – P. 1294-1313.

Pedrosa, J. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice / J. Pedrosa, B.M. Saunders, R. Appelberg, [et al.] // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – P. 577-583.

Perregaux, D.G. Antimicrobial peptides initiate IL-1 beta posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity / D.G. Perregaux, K. Bhavsar, L. Contillo, [et al.] // J Immunol. – 2002. – Vol. 168(6). – P. 3024-3032.

Peschel, A. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance / A. Peschel, H.G. Sahl // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2006. – Vol. 4(7). – P. 529-536.

Petrov, V. Human beta defensin-3 induces chemokines from monocytes and macrophages: diminished activity in cells from HIV-infected persons. / V. Petrov, N. Funderburg, A. Weinberg, S. Sieg // *Immunology.* – 2013. – Vol. 140(4). – P. 413-420

Pettersson A. Ueber die bacterizierten Leukocyten taffe und ihre Beziehung zur Immunität. / A. Pettersson // *Bacteriol. Parasitenk.* – 1905. – Vol. 139. – P. 423-437.

Pettersson, A. Ueber die wärmebeständigen keimtötenden Substanzen, die beta-Lysine der Tiersera und die von diesen beeinflussten Bakterien / A. Pettersson // *Z. Immunitätsforsch.* – 1926. – Vol. 48. – P. 233-296.

Piccinini, A.M. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling / A.M. Piccinini, K.S. Midwood // *Mediators of Inflammation.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-22.

Pillay, J. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1 / J. Pillay, V.M. Kamp, E. van Hoffen, [et al.] // *J Clin Invest.* – 2012. – Vol. 122. – P. 327-336.

Pillay, J. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia / J. Pillay, B.P. Ramakers, V.M. Kamp, [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2010. – Vol. 88. – P. 211-220.

Pirenne, Y. Recherches sur les alexines et les substances microbicides du sérum normal / Y. Pirenne // *Centr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. 1.* – 1904. – Vol. 36. – P. 256-266.

Powers, J.P. The relationship between peptide structure and antibacterial activity / J.P. Powers, R.E.W. Hancock // *Peptides.* – 2003. – Vol. 24(11). – P. 1681-1691.

Prantner, D. The θ -defensin retrocyclin 101 inhibits TLR4- and TLR2-dependent signaling and protects mice against influenza infection / D. Prantner, K.A. Shirey, W. Lai, [et al.] // *J Leukoc Biol.* – 2017. – Vol. 102(4). – P. 1103-1113.

Prohaszka, Z. Defensins purified from human granulocytes bind C1q and activate the classical complement pathway like the transmembrane glycoprotein gp41 of HIV-1 / Z. Prohaszka, K. Nemet, P. Csermely, [et al.] // *Mol Immunol.* – 1997. – Vol. 34(11). – P. 809-816.

Pryzwansky, K.B. Immunocytochemical localization of myeloperoxidase, lactoferrin, lysosyme and neutral proteases in human monocytes and neutrophilic granulocytes / K.B.

Pryzwansky, L.E. Martin, J.K. Spitznagel // *J. Reticuloendothel.Soc.* – 1978. – Vol. 24. – P. 295-310.

Puddu, P. Bovine lactoferrin counteracts Toll-like receptor mediated activation signals in antigen presenting cells. / P. Puddu, D. Latorre, M. Carollo, [et al.] // *PLoS ONE.* – 2011. – Vol. 6. – P. e22504.

Puddu, P. Immunomodulatory effects of lactoferrin on antigen presenting cells. / P. Puddu, P. Valenti, S. Gessani // *Biochimie.* – 2009. – Vol. 91. – P. 11-18.

Puga, I. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen / I. Puga, M. Cols, C.M. Barra, [et al.] // *Nat Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – P. 170-180.

Quan, N. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock / N. Quan, R. Avitsur, J.L. Stark, [et al.] // *J. Neuroimmunol.* – 2001. – Vol. 115. P. 36-45.

Radulovic, M. Corticotropin-releasing factor receptor 1 in mouse spleen: expression after immune stimulation and identification of receptor-bearing cells / Marko Radulovic, Frank M. Dautzenberg, Sabine Sydow, [et al.] // *The Journal of Immunology.* – 1999. – Vol. 162. – P. 3013-3021.

Radulovic, M. The effect of acute immobilization stress on the abundance of corticotropin-releasing factor receptor in lymphoid organs / Marko Radulovic, Claudia Weber, Joachim Spiess // *Journal of Neuroimmunology.* – 2000. – Vol. 103. – P. 153-164.

Reddy, R.C. Effects of sepsis on neutrophil chemotaxis / R.C. Reddy, T.J. Standiford // *Curr Opin Hematol.* – 2010. – Vol. 17. – P. 18-24.

Retegui, L.A. Uptake of lactoferrin by the liver. I. Role of the reticuloendothelial system as indicated by blockade experiments. / L.A. Retegui, N. Moguilevsky, C.F. Castracane, P.L. Masson // *Lab Invest.* – 1984. – Vol. 50(3). – P. 323-328.

Roberts, K.D. Antimicrobial activity and toxicity of the major lipopeptide components of Polymyxin B and Colistin: last-line antibiotics against multidrug-resistant gram-negative bacteria / K.D. Roberts, M.A.K. Azad, J. Wang, [et al.] // *ACS Infect. Dis.* – 2015. – Vol. 1. – P. 568-575.

Roberts, T.K. The isolation and characterization of lactoferrin from sow milk and boar seminal plasma. / T.K. Roberts, J.C. Bournsnel // *J. Reprod. Fert.* – 1975. – Vol. 42, N 3. – P. 579-582.

Romeo, D. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils / D. Romeo, B. Skerlavaj, M. Bolognesi, R. Gennaro // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 9573-9575.

Rousseau, E. The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis. / E. Rousseau, P.P. Michel, E.C. Hirsch // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 84(6). – P. 888-898.

Ruangsi, J. A novel beta-defensin antimicrobial peptide in atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity / J. Ruangsi, Y. Kitani, V. Kiron, [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8(4). – P. e62302. doi: 10.1371/journal.pone.0062302

Sai, K.P. Tigerinins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina* / K.P. Sai, M.V. Jagannadham, M. Vairamani, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 2701-2707.

Saito, H. Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH. / H. Saito, H. Miyakawa, Y. Tamura, [et al.] // *J Dairy Sci.* – 1991. – Vol. 74(11). – P. 3724-3730.

Saitoh, T. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1 / T. Saitoh, J. Komano, Y. Saitoh [et al.] // *Cell Host Microbe.* – 2012. – Vol. 12. – P. 109-116.

Sakai, T. Pepsin-digested bovine lactoferrin induces apoptotic cell death with JNK/SAPK activation in oral cancer cells. / T. Sakai, Y. Banno, Y. Kato, [et al.] // *J. Pharmacol. Sci.* – 2005. – Vol. 98. – P. 41-48.

Salzman, N.H. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. / Y. Salzman, N.H., D. Ghosh, K.M. Huttner, [et al.] // *Nature.* – 2003. – Vol. 422. – P. 522-526.

Sangaletti, S. Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity / S. Sangaletti, C. Tripodo, C. Chiodoni, [et al.] // *Blood.* – 2012. – Vol 120. – P. 3007-3018.

Sathyanesan, M. Restraint stress differentially regulates inflammation and glutamate receptor gene expression in the hippocampus of C57BL/6 and BALB/c mice / M. Sathyanesan, J.M. Haiar, M.J. Watt, S.S. Newton // *Stress.* – 2017 – Vol. 20(2). – P. 197-204.

Scapini, P. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils / P. Scapini, F. Bazzoni, M.A. Cassatella // *Immunol Lett.* – 2008. – Vol. 116. – P. 1-6.

Schaal, J.B. Rhesus macaque theta defensins suppress inflammatory cytokines and enhance survival in mouse models of bacteremic sepsis. / J.B. Schaal, D. Tran, P. Tran, [et al.] // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7(12). – P. e51337.

Schagger, H. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa / H. Schagger, G. von Jagow // *Anal. Biochem.* – 1987. – Vol. 166. – P. 368-379.

Schikorski, D. Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia / D. Schikorski, V. Cuvillier-Hot, M. Leippe, [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – P. 1083-1095.

Schittek, B. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands / B. Schittek, R. Hipfel, B. Sauer, [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 1133-1137.

Schittek, B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense / B. Schittek // *J. Innate Immun.* – 2012. – Vol. 4. – P. 349-360.

Schneider, J.J. Human defensins / J.J. Schneider, A. Unholzer, M. Schaller, [et al.] // *J. Mol. Med.* – 2005. – Vol. 83. – P. 587-595.

Schneider, R. Die bakterizide und hämolytische Wirkung der tierischen Gewebsflüssigkeiten und ihre Beziehungen zu den Leukozyten / R. Schneider // *Arch. Hyg.* – 1909. – Vol. 70. – P. 40-162.

Schröder, B.O. Reduction of disulphide bonds unmasks potent antimicrobial activity of human β -defensin 1 / B.O. Schröder, Z. Wu, S. Nuding, [et al.] // *Nature.* – 2011. – Vol. 469. – P. 419-423.

Scott, M.G. Cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein / M.G. Scott, A.C.E. Vreugdenhil, W.A. Buurman, [et al.] // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 164. – P. 549-553.

Scott, M.G. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses / M.G. Scott, D.J. Davidson, M.R. Gold, [et al.] // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 3883-3891.

Segal, A.W. How neutrophils kill microbes / A.W. Segal // *Annu Rev Immunol.* – 2005. – Vol. 23. – P. 197-223.

Selsted, M.E. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils / M.E. Selsted, M.J. Novotny, W.L. Morris, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1992. – Vol. 267. – P. 4292-4295.

Selsted, M.E. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages / M.E. Selsted, D.M. Brown, R.J. DeLange, R.I. Lehrer // *J Biol Chem.* – 1983. – Vol. 258(23). – P. 14485-14489.

Selsted, M.E. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils / M.E. Selsted, D.M. Brown, R.J. De Lange [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1985. – Vol.260. – P.4579-4584.

Selsted, M.E. Primary structures of three human neutrophil defensins / M.E. Selsted, S.S. Harwig, T. Ganz [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1985a. – Vol.76. – P.1436-1439.

Selsted, M.E. Purification, primary structure and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin / M.E. Selsted, S.S. Harwig // *Infect. Immun.* – 1987. – Vol.55, N 9. – P. 2281-2286.

Selsted, M.E. Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils / M.E. Selsted, Y.Q. Tang, W.L. Morris, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 6641-6648.

Selye, H. Syndrome-produced by diverse nocuous agents / H. Selye // *Nature.* – 1936. – Vol. 138, No 3479. – P. 32.

Semple, C.A. Duplication and selection in the evolution of primate beta-defensin genes / C.A. Semple, M. Rolfe, J.R. Dorin // *Genome Biol.* – 2003. – Vol. 4. – R31. doi:10.1186/gb-2003-4-5- r31.

Sessa, R. Effect of bovine lactoferrin on *Chlamydia trachomatis* infection and inflammation. / R. Sessa, M. Di Pietro, S. Filardo, [et al.] // *Biochem. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 95. – P. 34-40.

Shah, B. Chapter 11 – Neutrophils / Binita Shah, Nathalie Burg, Michael H. Pillinger // Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology (Tenth Edition), Editor(s): Gary S. Firestein, [et al.] Elsevier. 2017. – Pages 169-188.e3, ISBN 978032331696

Shai, Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides / Y. Shai // *Trends Biochem. Sci.* – 1995. – Vol. 20(11). – P. 460-464.

Shamova, O. ChBac3.4: A novel proline-rich antimicrobial peptide from goat leukocytes / O. Shamova, D. Orlov, V. Kokryakov, [et al.] // *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. – 2009. – Vol. 15, No 1. – P. 31-42.

Shamova, O.V. Acipensins – novel antimicrobial peptides from leukocytes of the russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. / O.V. Shamova, D.S. Orlov, S.V. Balandin, [et al.]// *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6(4). – P. 99-109.

Shamova, O.V. Effect of defensins on the blood level of corticosterone and the immune response during stress / O.V. Shamova, M.P. Lesnikova, V.N. Kokryakov, [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 1993. – Vol. 115, No 6. – P. 728-731.

Shamova, O.V. Minibactenecins ChBac7.N α and ChBac7. N β – antimicrobial peptides from leukocytes of the goat *Capra hircus* / O.V. Shamova, D.S. Orlov, M.S. Zharkova, [et al.] // *Acta Naturae*. – 2016. – Vol. 8(3). – P. 136-146.

Shamova, O.V. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes / O.V. Shamova, K.A. Brogden, C. Zhao [et al.] // *Infection and Immunity*. – 1999. – Vol. 67, № 8. – P. 4106-4111.

Shepherd, V.L. Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by macrophage mannose receptor / V.L. Shepherd, J.R. Hoidal // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol*. – 1990. – Vol. 2. – P. 335-340

Shi, J. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: regulation of IL-1 β secretion / Jishu Shi, Shelly Aono, Wuyuan Lu, [et al.] // *The Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 179. – P. 1245-1253.

Shi, J. Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analogous to PR-39, an antibacterial peptide from the small intestine / J. Shi, C.R. Ross, M.M. Chengappa, F. Blecha // *J. Leukoc. Biol*. – 1994. – Vol. 56(6). – P. 807-811.

Shi, J. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src-homology 3 domains of p47 phox / J. Shi, C.R. Ross, T.L. Leto [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93. – P. 6014-6018.

Shinjo, T. Oral lactoferrin influences psychological stress in humans: A single-dose administration crossover study / T. Shinjo, K. Sakuraba, A. Nakaniida, [et al.] // *Biomed Rep*. – 2018. – Vol. 8(5). – P. 426-432.

- Shumake, J. Behavioral effects of bovine lactoferrin administration during postnatal development of rats / J. Shumake, D.W. Barrett, M.A. Lane, A.J. Wittke // *Biometals*. – 2014. – Vol. 27(5). – P. 1039-1055.
- Sica, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas / A. Sica, A. Mantovani // *J Clin Invest*. – 2012. – Vol. 122. – P. 787-795.
- Silva, M.T. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections / M.T. Silva, M.N. Silva, R. Appelberg // *Microb. Pathog.* – 1989. – Vol. 6. – P. 369-380.
- Simmaco, M. Antimicrobial Peptides from Skin Secretions of *Rana esculenta* / M. Simmaco, G. Mignogna, D. Barra, F. Bossas // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 11956-11961.
- Simmaco, M. Barra, Bombinins, antimicrobial peptides from *Bombina* species / M. Simmaco, G. Kreil, D. Barra // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2009. – Vol. 1788. – P. 1551-1555.
- Simmaco, M. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta* / M. Simmaco, G. Mignogna, D. Barra, F. Bossa // *FEBS Lett.* – 1993. – Vol. 324. – P.159-161.
- Singh, P.K. Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. / P.K. Singh, B.F. Tack, P.B. McCray Jr, M.J. Welsh // *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. – 2000. – Vol. 279(5). – P. L799-805.
- Skarnes, R.C. Characterization of an antibacterial peptide from calf thymus / R.C. Skarnes, D.W. Watson // *Proc. Exptl. Biol. Med.* – 1956. – Vol. 93. – P. 267-269.
- Soehnlein, O. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. / O. Soehnlein, S. Steffens, A. Hidalgo, C. Weber // *Nat Rev Immunol*. – 2017. – Vol. 17(4). – P. 248-261.
- Sokolov, A.V. Identification and properties of complexes formed by myeloperoxidase with lipoproteins and ceruloplasmin / A.V. Sokolov, K.V. Ageeva, O.S. Cherkalina, [et al.]// *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2010. – Vol. 163. – P. 347-355.
- Sokolov, A.V. Interaction of ceruloplasmin, lactoferrin, and myeloperoxidase / A.V. Sokolov, M.O. Pulina, K.V. Ageeva, [et al.] // *Biochemistry (Mosc)*. – 2007. – Vol. 72 (4). – P. 409-415.

Sokolov, A.V. Lactoferrin, myeloperoxidase, and ceruloplasmin: complementary gearwheels cranking physiological and pathological processes / Alexey V. Sokolov, Elena T. Zakhrova, Valeria A. Kostevich, [et al.] // *Biometals*. – 2014b. – Vol. 27. – P. 815-828.

Sokolov, A.V. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase / A.V. Sokolov, V.A. Kostevich, O.L. Runova, [et al.] // *Chemistry and Physics of Lipids*. – 2014a. – Vol. 180. – P. 72-80.

Solomon, S. Corticostatins / Samuel Solomon // *Trends Endocrinol Metab*. – 1993. – Vol. 4(8). – P. 260-264.

Son, K.N. Human lactoferrin activates transcription of IL-1beta gene in mammalian cells. / K.N. Son, J. Park, C.K. Chung, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2002. – Vol. 290(1). – P. 236-241.

Sorensen M., Sorensen J.P.L. The proteins in whey. // *C.R. Trav Lab. Carlsberg*. – 1939. – Vol. 23, N 1. – P. 55-99.

Spitznagel, J.K. Cationic protein and antibacterial properties of infected tissues and leukocytes/ J.K. Spitznagel, H.-J. Chi // *Am. J. Pathol*. – 1963. – Vol. 43, No 4. – P. 697-711.

Stahl, P.D. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense / P.D. Stahl, R.A. Ezekowitz // *Curr Opin Immunol*. – 1998. – Vol. 10(1). – P. 50-55.

Stegmaier, M. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface / M. Stegmaier, E. Borges, J. Berger, [et al.] // *J. Cell Sci*. – 1997. – Vol. 110. – P. 687-694.

Stegemann, Ch. Isolation, purification and de novo sequencing of TBD-1, the first beta-defensin from leukocytes of reptiles / Ch Stegeman., A.A. Kolobov, Yu.A. Leonova, [et al.] // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9. – P. 1364-1373.

Stein, E. Inflammatory responses in Annelids / E. Stein, E. Cooper // *Amer. Zool*. – 1983. – Vol. 23. – P. 145-156.

Steinberg, D.A. Protegrin-1: A broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity / D.A. Steinberg, M.A. Hurst, C.A. Fujii, [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother*. – 1997. – Vol. 41. – P. 1738-1742.

Steiner, H. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity / H. Steiner, D. Hultmark, A. Engstrom, [et al.] // *Nature*. – 1981.– Vol. 292. – P. 246–248.

Subbalakshmi, C. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin / C. Subbalakshmi, N. Sitaram // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – Vol. 160(1). – P. 91-96.

Subramanian, H. Mas-related gene x2 (mrgx2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells P. Resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization / H. Subramanian, K. Gupta, Q. Guo, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286. – P. 44739-44749.

Sugiarto, H. Identification of three novel ostricacins: An update on the phylogenetic perspective of β -defensins / H. Sugiarto, P.L. Yu // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2006. – Vol. 27. – P. 229-235.

Suzuki, Y.A. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. / Y.A. Suzuki, V. Lopez and B. Lönnnerdal // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62(22). – P. 2560-2575.

Szczepanik, A.M. IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line / Ann Marie Szczepanik, Sandrine Funes, Wayne Petko, Garth E Ringheim // J Neuroimmunol. – 2001. – Vol. 113. – P. 49-62.

Takeuchi, T. Antidepressant-like effect of milk-derived lactoferrin in the repeated forced-swim stress mouse model / Takashi Takeuchi, Kana Matsunaga, Akihiko Sugiyama // J Vet Med Sci. – 2017. – Vol. 79(11). – P. 1803-1806.

Tam, J.P. An unusual structural motif of antimicrobial peptides containing end-to-end macrocycle and cystine-knot disulfides / J.P. Tam, Y.A. Lu, J.L. Yang, K.W. Chiu // Proc Natl Acad Sci U S A. – 1999. – Vol. 96. – P. 8913-8918.

Tanabe, H. Paneth cell alpha-defensins from rhesus macaque small intestine / H. Tanabe, J. Yuan, M.M. Zaragoza, [et al.] // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72. – P. 1470-1478.

Tang, Y.-Q. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the legation of the two truncated α -defensins / Y.-Q. Tang, J. Yuan, G. Osapay et al. // Science. – 1999. – Vol. 286. – P. 498-502.

Tang, Y.-Q. Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of α -defensins from rhesus macaque leukocytes / Y.-Q. Tang, J. Yuan, C.J. Miller, M.E. Selsted // Infect. Immun. – 1999a. – Vol. 67. – P. 6139-6144.

Tasiemski, A. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum* / A. Tasiemski, F.

Vandenbulcke, G. Mitta, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2004. – Vol. 279, No 30. – P. 30973-30982.

Terlau, H. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides / H. Terlau, B.M. Olivera // Physiol. Rev. – 2004, – Vol. 84. – P. 41-68.

Territo, M.C. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils / M.C. Territo, T. Ganz, M.E. Selsted, R. Lehrer // J Clin Invest. – 1989. – Vol. 84(6). – P. 2017-2020.

Thompson R. Lysozyme and the antibacterial properties of tears / R. Thompson // Arch. Ophthalmol. (Chicago). – 1941. – Vol. 25. – P. 491-509.

Thouzeau C., Y. Le Maho, G. Froget, [et al.] Spheniscins, avian β -defensins in preserved stomach contents of the king penguin, *Aptenodytes patagonicus* / C. Thouzeau, Y. Le Maho, G. Froget, [et al.] // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278. – P. 51053-51058.

Tjabringa, G.S. Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors / G.S. Tjabringa, D.K. Ninaber, J.W. Drijfhout, [et al.] // Int. Arch. Allergy Immunol. – 2006. – Vol. 140. – P. 103-112.

Tomita, M. Antimicrobial peptides of lactoferrin. / M. Tomita, M. Takase, H. Wakabayashi, W. Bellamy // Adv Exp Med Biol. – 1994. – Vol. 357. – P. 209-218.

Tongaonkar, P. Rhesus macaque θ -defensin isoforms: expression, antimicrobial activities, and demonstration of a prominent role in neutrophil granule microbicidal activities. / P. Tongaonkar, P. Tran, K. Roberts, [et al.] // J Leukoc Biol. – 2011. – Vol. 89(2). – P. 283-290.

Tortorella, C. Spontaneous and Fas-induced apoptotic cell death in aged neutrophils / C. Tortorella, G. Piazzolla, F. Spaccavento, [et al.] // J Clin Immunol. – 1998. – Vol. 18(5). – P. 321-329.

Tosello Boari, J. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils / J. Tosello Boari, M.C. Amezcua Vesely, D.A. Bermejo, [et al.] // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8. – P. e1002658.

Townsley, L.E. Structures of gramicidins A, B, and C incorporated into sodium dodecyl sulfate micelles / L.E. Townsley, W.A. Tucker, S. Sham, J.F. Hinton // Biochemistry. – 2001. – Vol. 40. – P. 11676-11686.

Tran, D. Microbicidal properties and cytotoxic selectivity of rhesus macaque theta defensins. / D. Tran, P. Tran, K. Roberts, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52(3). – P. 944-953.

Treacy, O. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation / O. Treacy, A.E. Ryan, T. Heinzl [et al.] // *PLoS ONE.* – 2012. – Vol. 7, No. 8. – e42662.

Treffers, L.W. Neutrophils in cancer. / L.W. Treffers, I.H. Hiemstra, T.W. Kuijpers, [et al.] // *Immunol Rev.* – 2016. – Vol. 273(1). – P. 312-328

Tsuda, H. Cancer prevention by bovine lactoferrin and underlying mechanisms—a review of experimental and clinical studies. / H. Tsuda, K. Sekine, K. Fujita, M. Ligo // *Biochem. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 80. – P. 131–136.

Tsuda, Y. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / Y. Tsuda, H. Takahashi, M. Kobayashi, [et al.] // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21. – P. 215-226.

Uchida T, Nemoto T, Yui T, [et al.] Use of technetium-99m as a radioactive label to study migratory patterns of leukocytes / T. Uchida, T. Nemoto, T. Yui, [et al.] // *J Nucl Med.* – 1979. – Vol. 20. – P. 1197-1200.

Umnyakova, E.S. Modulation of human complement system by antimicrobial peptide arenicin-1 from *Arenicola marina*. / Ekaterina S. Umnyakova, Nikolay P. Gorbunov, Alexander V. Zhakhov, [et al.] // *Mar Drugs.* – 2018. – Vol. 16(12). – P. E480. doi: 10.3390/md16120480.

Urban, C.F. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms / C.F. Urban, U. Reichard, V. Brinkmann, A. Zychlinsky // *Cell. Microbiol.* – 2006. – Vol. 8. – P. 668-676.

Valenti, P. Lactoferrin: An important host defence against microbial and viral attack. / P. Valenti, G. Antonini // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62. – P. 2576-2587.

Valore, E.V. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells / E.V. Valore, T. Ganz // *Blood.* – 1992. – Vol. 79. P. 1538-1544.

Van den Berg, R.H. Inhibition of activation of the classical pathway of complement by human neutrophil defensins. / R.H. van den Berg, M.C. Faber-Krol, S. van Wetering, [et al.] // *Blood.* – 1998. – Vol. 92(10). – P. 3898-3903.

- Van der Poll, T. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets / T. Van der Poll, F.L. van de Veerdonk, B.P. Scicluna, M.G. Netea // *Nat Rev Immunol.* – 2017. – Vol. 17. – P. 407-420.
- van Dijk, A. Avian defensins / A. van Dijk, E.J.A. Veldhuizen, H.P. Haagsman // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2008. – Vol. 124. – P. 1-18.
- van Hoek, M.L. Antimicrobial peptides in reptiles / M.L. van Hoek // *Pharmaceuticals.* – 2014. – Vol. 7. – P. 723-753.
- Van Snick, J.L. The involvement of lactoferrin in the hyposideremia of acute inflammation. / J.L. Van Snick, P.L. Masson, J.F. Heremans // *J Exp Med.* – 1974. – Vol. 140(4). – P. 1068-1084.
- Varkey, J. Antibacterial activity of human neutrophil defensin HNP-1 analogs without cysteines / J. Varkey, R. Nagaraj // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49(11). – P. 4561-4566.
- Vasilyev, N. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction / N. Vasilyev, T. Williams, M.L. Brennan, [et al.] // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, No. 18. – P. 2812-2820.
- Veldhuizen, E.J. Antimicrobial and immunomodulatory activities of PR-39 derived peptides / E.J. Veldhuizen, V.A. Schneider, H. Agustiandari, [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – P. e95939
- Venkataraman, N. Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1. / N. Venkataraman, A.L. Cole, P. Ruchala, [et al.] // *PLoS Biol.* – 2009. – Vol. 7(4). – P. e95. doi: 10.1371/journal.pbio.1000095.
- von Behring, E.A. Über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität and der Tetanus-Immunität bei Thieren / E.A. von Behring, S. Kitasato // *Deutsche medizinische Wochenschrift.* – 1890. – Vol. 16. – P. 1113-1114.
- Wakabayashi, H. Cooperative anti-Candida effects of lactoferrin or its peptides in combination with azole antifungal agents. / H. Wakabayashi, S. Abe, T. Okutomi, [et al.] // *Microbiol Immunol.* – 1996. – Vol. 40(11). – P. 821-825.
- Wan, M. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages / M. Wan, A.M. van der Does, X. Tang, [et al.] // *J. Leukoc. Biol.* – 2014. – Vol. 95. – P. 971-981.

Wan, W. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain / Weihua Wan, Lisa Wetmore, Craig M. Sorensen, Arnold H. Greenberg, Dwight M. Nance // *Brain Res. Bull.* – 1994. – Vol. 34. – P. 7-14.

Wang, X. An antimicrobial peptide of the earthworm *Pheretima tschiliensis*: cDNA cloning, expression and immunolocalization / X. Wang, X. Wang, Y. Zhang, X. Qu, S. Yang // *Biotechnology Lett.* – 2003. – Vol. 25. – P. 1317-1323.

Wehkamp, J. The Paneth cell alpha-defensin deficiency of ileal Crohn's disease is linked to Wnt/Tcf-4 / J. Wehkamp, G. Wang, I. Kubler, [et al.] // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 3109-3118.

Weiss, J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria / J. Weiss // *Biochem Soc Trans.* – 2003. – Vol. 31. – P. 785–791.

Weiss, L. Transmural cellular passage in vascular sinuses of rat bone marrow / L. Weiss // *Blood.* – 1970. – Vol. 36(2). – P. 189–208.

Wessely-Szponder, J. Analysis of antimicrobial peptides from porcine neutrophils / J. Wessely-Szponder, B. Majer-Dziedzic, A. Smolira // *J. Microbiol. Methods.* – 2010. – Vol. 83(1). – P. 8-12.

Wilson, C.L. Regulation of intestinal α -defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. / C.L. Wilson, A.J. Ouellette, D.P. Satchell, [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 286. – P. 113-117.

Wright, C.D. Candidacidal activity of myeloperoxidase: therapeutic influence of the enzyme *in vivo* / C.D. Wright, R.D. Nelson // *Infect. Immun.* – 1985. – Vol.47, N2. – P. 363-365

Xiao, Y. Antimicrobial peptides from amphibians / Y. Xiao, C. Liu, R. Lai // *Biomol. Concepts.* –2011. – Vol. 2. – P. 27–38.

Xiao, Y. Identification and functional characterization of three chicken cathelicidins with potent antimicrobial activity / Y. Xiao, Y. Cai, Y.R. Bommineni, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 2858-2867.

Yamaguchi, Y. β -Defensin overexpression induces progressive muscle degeneration in mice. / Y. Yamaguchi, T. Nagase, T. Tomita, [et al.] // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2007. – Vol. 292. – P. C2141-C2149.

Yan, H. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides / H. Yan, R.E.W. Hancock // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45(5). – P. 1558-1560.

Yang, D. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. / D. Yang, Q. Chen, O. Chertov, J.J. Oppenheim // *J Leukoc Biol.* – 2000a. – Vol. 68(1). P. 9-14.

Yang, D. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells / D. Yang, Q. Chen, A.P. Schmidt, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2000b. – Vol. 192. – P. 1069-1074.

Yang, D. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal / D. Yang, A. Biragyn, L. Kwak, J.J. Oppenheim // *Trends in immunology.* – 2002. – Vol. 23, No 6. – P. 291-296.

Yang, D. β -Defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. / D. Yang, O. Chertov, S.N. Bykovskaia, [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 286(5439). – P. 525-528.

Yang, L. Neutron off-plane scattering of aligned membranes. I. Method of measurement / L. Yang, T.A. Harroun, W.T. Heller, [et al.] // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75(2). – P. 641-645.

Yeaman, M.R. Platelets in defense against bacterial pathogens / Michael R. Yeaman // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – Vol. 67. – P. 525-544.

Yeaman, M.R. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins / M.R. Yeaman, Y.I.Q. Tang, A.J. Shen, [et al.] // *Infect. Immun.* – 1997. – Vol. 65. – P. 1023-1031.

Yoshimaki, T. Bone regeneration with systemic administration of lactoferrin in non-critical-sized rat calvarial bone defects. / T. Yoshimaki, S. Sato, K. Tsunori, [et al.] // *J Oral Sci.* – 2013. – Vol. 55(4). – P. 343-348.

Yount, N.Y. Selective reciprocity in antimicrobial activity versus cytotoxicity of hBD-2 and crotamine / N.Y. Yount, D. Kupferwasser, A. Spisni, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2009. – Vol. 106. – P. 14972-14977.

Yu, Y. LL-37-induced human mast cell activation through g protein-coupled receptor mrgx2 / Y. Yu, Y. Zhang, Y. Zhang, [et al.] // *Int. Immunopharmacol.* – 2017. – Vol. 49. – P. 6-12.

Zagulski, T. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo. / T. Zagulski, P. Lipiński, A. Zagulska, [et al.] // *Br J Exp Pathol.* – 1989. – Vol. 70(6). – P. 697-704.

Zakharova, E.T. Erythropoietin and NRF2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin / E.T. Zakharova, A.V. Sokolov, N.N. Pavlichenko, [et al.] // *BioMetals.* – 2018. – Vol. 31, № 3. – P. 425-443.

Zakharova, E.T. Human apo-lactoferrin as a physiological mimetic of hypoxia stabilizes hypoxia-inducible factor-1 alpha. / E.T. Zakharova, V.A. Kostevich, A.V. Sokolov, [et al.] // *Biometals.* – 2012. – Vol. 25(6). – P. 1247-1259.

Zanetti, M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity / M. Zanetti // *J Leukoc Biol.* – 2004. – Vol. 75(1). – P. 39-48.

Zanetti, M. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain / M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 374. – P. 1-5.

Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature.* – 2002. – Vol. 415, № 6870. – P. 389-395.

Zasloff, M. Magainins. a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor / M. Zasloff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1987. – Vol. 84. – P. 5449-5453.

Zeng, F. Constitutive expression of antimicrobial peptide PR-39 in transgenic mice significantly enhances resistance to bacterial infection and promotes growth / F. Zeng, R. Dong, C. Zhao [et al.] // *Transgenic Res.* – 2018. – Vol. 27(5). – P. 409-422. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0084-z>

Zeya, H.I. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification / H.I. Zeya, J.K. Spitznagel // *Science.* – 1963. – Vol. 142. – P. 1085-1087.

Zgliczynski, J.M. Chloramines as intermediates of oxidative reaction of amino acids by myeloperoxidase / J.M. Zgliczynski, T. Stelmaszynska, J. Domanski, W. Ostrowski // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. – Vol. 235, N 3. – P. 419-424.

Zhang, G. Avian antimicrobial host defense peptides: From biology to therapeutic applications / G. Zhang, L.T. Sunkara // *Pharmaceuticals.* – 2014. – Vol. 7. – P. 220-247.

Zhang, Y.-Y. The modulatory effect of TLR2 on LL-37-induced human mast cells activation / Y.-Y. Zhang, Y.-Y. Yu, Y.-R. Zhang, [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2016 – Vol. 470. – P. 368-374.

Zhao, C. Gallinacin-3, an inducible epithelial β -defensin in the chicken / C. Zhao, T. Nguyen, L. Liu, [et al.] // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 2684-2691.

Zhao, C. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells // C. Zhao, I. Wang, R.I. Lehrer // *FEBS Lett.* – 1996. – Vol. 396. – P. 319-322.

Zhao, H. Identification and characterization of novel reptile cathelicidins from elapid snakes / H. Zhao, T.X. Gan, X.D. Liu, [et al.] // *Peptides.* – 2008. – Vol. 29. – P. 1685-1691.

Zhao, J. Low-copy number polymorphism in DEFA1/DEFA3 is associated with susceptibility to hospital-acquired infections in critically ill patients / J. Zhao, Q. Gu, L. Wang, [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2018. – Vol. 2018. – Article ID 2152650. doi: 10.1155/2018/2152650.

Zhu, L.-M. Multidrug-resistant tuberculosis is associated with low plasma concentrations of human neutrophil peptides 1-3 / L.-M. Zhu, C.-H. Liu, P. Chen, [et al.] // *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease.* – 2011. – Vol. 15, No. 3. – P. 369-374.

Zhu, Q. Alpha-MSH, a hormone for the adrenal zona glomerulosa / Q. Zhu, J. Hu, S. Solomon // *Proceedings of the 73rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington DC. Bethesda, MD, Endocrine Society.* – 1991. – abst 9151

Zhu, Q. Isolation and structure of corticostatic peptides from rabbit fetal and adult lung / Qinzhang Zhu, Jing Hu, Shree Mulay, [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – № 85. – P. 592-596.

Zimecki, M. Effects of lactoferrin on the immune response modified by the immobilization stress. / M. Zimecki, J. Artym, G. Chodaczek, [et al.] // *Pharmacol Rep.* – 2005. – Vol. 57(6). – P. 811-817.

Zimecki, M. Endogenous steroids are responsible for lactoferrin-induced myelopoiesis in mice. / M. Zimecki, J. Artym and M. Kocieba // *Pharmacol. Rep.* – 2009. – Vol. 61(4). – P. 705–710.

Zimecki, M. Human lactoferrin induces phenotypic and functional changes in murine splenic B cells / M. Zimecki, J. Mazurier, G. Spik, J.A. Kapp // *Immunology.* – 1995. – Vol. 86(1). – P. 122-127.

Zimecki, M. Lactoferrin inhibits proliferative response and cytokine production of TH1 but not TH2 cell lines. / M. Zimecki, J. Mazurier, G. Spik, J.A. Kapp // Arch Immunol Ther Exp (Warsz). – 1996. – Vol. 44(1). – P. 51-56.