

V. N. KOKRYAKOV

**BIOLOGY
OF ANTIBIOTICS
FROM ANIMAL
SOURCES**



SANKT-PETERBURG
"NAUKA"
1999

В. Н. КОКРЯКОВ

**БИОЛОГИЯ
АНТИБИОТИКОВ
ЖИВОТНОГО
ПРОИСХОЖДЕНИЯ**



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
«НАУКА»
1999

Кокряков В. Н. Биология антибиотиков животного происхождения. — СПб.: Наука, 1999. — 162 с.

ISBN 5-02-026110-6

Книга посвящена истории, современному состоянию и перспективам развития одной из актуальных и стремительно развивающихся в последнее десятилетие медико-биологических проблем — молекулярным основам врожденного иммунитета животных к инфекции. Приведены всеобъемлющие сведения о химической природе, биогенезе, антимикробных и регуляторных свойствах белково-пептидных антибиотиков животного происхождения (дефенсины, цекропины, магейнины, лизоцим, серпроцидины, бактерицидный проницаемость увеличивающий белок, лактоферрин, пероксидазы и др.), обеспечивающих резистентность животных к инфекции в процессах фагоцитоза, воспаления и на поверхности кожных и слизистых покровов. Рассматриваются перспективы применения белково-пептидных антибиотиков животного происхождения в медицинской и ветеринарной практике.

Книга представляет интерес для биохимиков, физиологов, иммунологов, врачей, преподавателей, аспирантов и студентов соответствующих специальностей.

Ответственный редактор академик РАН, проф. Е. А. КОРНЕВА

Рецензент академик РАН, проф. И. П. АШМАРИН

Kokryakov V. N. Biology of antibiotics from animal sources. — St. Petersburg: Nauka, 1999. — 162 p.

ISBN 5-02-026110-6

The book deals with the data reflecting history and modern study in biology of animal antibiotics. It consists of several chapters, describing the structure, biogenesis and physiological action of antibiotic peptides and proteins as a key elements of innate immunity of animals.

Antibiotic peptides (defensins, protegrins, bactenecins, cecropins, magainins) and proteins (lysozyme, serprocidins, bactericidal permeability increasing protein, lactoferrin, myeloperoxidase) play an essential role in the innate immunity of animals against bacteria, fungi, protozoa and enveloped viruses. They are found in granules of phagocytes, mucosal epithelial cells and body fluids. Some of these substances have a multiple roles in phagocytosis, inflammation and stress.

The book is addressed to biochemists, immunologists, physicians, physiologists etc.

Издание осуществлено при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проекту № 97-04-62038



ТП-99-1-№ 178

ISBN 5-02-026110-6

© В. Н. Кокряков, 1999

© А. И. Слепушкин, оформление, 1999

ВВЕДЕНИЕ

Термин «антибиотик», в переводе с греческого означающий «против жизни», был введен в научный обиход выдающимся американским микробиологом и химиком З. А. Ваксманом в 1942 г. По его определению, «антибиотики являются химическими веществами, образуемыми микроорганизмами, которые обладают способностью подавлять рост или даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы». З. А. Ваксман, по-видимому, не случайно ограничивал происхождение антибиотических веществ только микроорганизмами, поскольку предметом его основных научных интересов были антибиотики, продуцируемые микробами (актиномицин, стрептотрицин, стрептомицин, неомицин и др.), которые в той или иной степени являлись ответственными за известный еще с прошлого века феномен антибиоза, т. е. угнетения развития одного микроорганизма другим. Однако уже в конце XIX в. был очевиден тот факт, что антимикробные вещества вырабатываются не только микроорганизмами, но также животными и растениями. В связи с этим более адекватным предмету рассмотрения и анализа настоящей монографии следует считать определение антибиотиков, выдвинутое академиком Ю. А. Овчинниковым (1987): антибиотики — природные вещества микробного, растительного и животного происхождения, способные в низких концентрациях (10^{-3} — 10^2 мкг/мл) подавлять развитие бактерий, низших грибов, простейших, вирусов и клеток злокачественных опухолей. Дополняет его определение формулировка, данная известным отечественным исследователем Н. С. Егоровым (1986): антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, простейшим и водорослям) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост или полностью подавляющие их развитие. Антибиотики независимо от источника их биологического происхождения характеризуются двумя основными признаками: высокой антибиотической активностью по отношению к микробам и чувствительным к ним клеткам, а также избирательностью (селективностью) их действия.

Проблема антибиотиков животного происхождения своими корнями уходит в последнюю треть XIX в. — в период становления иммунологии как самостоятельной биологической науки. Эксперимента-

льно она формировалась в ходе поисков веществ с антибактериальными свойствами, продуцируемых клетками и тканями организма животных, и анализа бактериолитических свойств плазмы крови, проводимого сторонниками концепции гуморального иммунитета.

История изучения клеточно-молекулярных механизмов естественной резистентности организма человека и животных к инфекции (Зильбер, 1958; Адо, 1961; Ашмарин и др., 1972; Пигаревский, 1978; Войно-Ясенецкий, 1981; Маянский А., Маянский Д., 1989; Klebanoff, Clark, 1978; Spitznagel, 1984; Spitznagel, Shafer, 1985) свидетельствует о том, что уже на первых этапах развития этого направления исследований был поставлен вопрос о природе и свойствах антимикробных веществ лейкоцитов, в том числе и локализованных в нейтрофилах (Hankin, 1891; Buchner, 1894; Schattenfroh, 1897). В значительной степени проведение этих работ было стимулировано фагоцитарной теорией иммунитета, выдвинутой в 1883 г. И. И. Мечниковым (1892), в исследованиях школы которого была обоснована ключевая роль микрофагов (в современной терминологии — нейтрофилов) и макрофагов в формировании невосприимчивости к инфекционным заболеваниям бактериальной и грибковой этиологии. Им же была сформулирована концепция о цитазах — бактерицидных соединениях лейкоцитарного происхождения, обеспечивающих инактивацию и переваривание фагоцитированных микроорганизмов (Мечников, 1903). Необходимо, однако, отметить, что все указанные работы носили преимущественно феноменологический характер до тех пор, пока А. Petterson в 1905 г. не выделил из лейкоцитов гноя человека антимикробные субстанции, которые, по заключению автора, представляли смесь щелочных (катионных, основных) протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб. Сравнение физико-химических свойств лейкоцитарных антимикробных веществ с протаминами рыб в его работе было не случайным, поскольку к тому времени уже было известно, что основные ядерные белки соматических клеток — гистоны, открытые Косселем (в 1884 г.), и отличные от них ядерные белки молока рейнского лосося — протамины, открытые Мишером в 1874 г., обладают в условиях *in vitro* заметной антимикробной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов. Работы по изучению антимикробных свойств белков из ядер соматических и половых клеток были продолжены в 30—50-е годы нашего столетия (Hirsch, 1958; Ермольева, 1965; Ашмарин и др., 1972; Ждан-Пушкина, 1973). В нашей стране эти исследования завершились созданием на основе протаминов из молока осетровых рыб медицинского препарата «экмолин» (Ермольева, 1965). Остается, однако, открытым вопрос о том, в какой степени обосновано рассматривать гистоны и протамины в качестве антибиотиков животного происхождения, поскольку ядерная локализация, как правило, исключает их участие в большинстве известных защитных реакций организма. Поиски гистонов в лизосомальном аппарате нейтрофильных гранулоцитов не дали однозначно трактуемых результатов (Ашмарин и др., 1973; Кокряков и др., 1973).

Прямое отношение к рассматриваемому вопросу имеет и открытие А. Флемингом (Fleming, 1922) лизоцима — бактериолитического фермента, продуцируемого многими клетками организма и являющегося неотъемлемым компонентом многих его секретов (слюна, слезы, кишечный сок, пот). Лизоцим можно считать первым белковым антибиотиком животного происхождения с установленной первичной структурой. Однако относительная ограниченность спектра микроорганизмов, чувствительных к действию лизоцима, надолго задержала разработку путей его использования в медицинской и ветеринарной практике с лечебной целью (Бухарин, Васильев, 1974).

Современный этап исследований в области антибиотиков белково-пептидной природы животного происхождения по времени и идеологически сопряжен с открытием и доказательством функциональной роли лизосом в клетках (De Duve et al., 1955), в том числе и лейкоцитах гранулоцитарного ряда (Robineaux, Frederic, 1955; Cohn, Hirsch, 1960). Первоначально антимикробные свойства фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов) пытались связать с активностью кислых гидролаз лизосом этих клеток. Однако уже в первых работах такого направления было продемонстрировано, что бактерицидная активность препаратов «лейкин» (Scarnes, Watson, 1956) и «фагоцитин» (Hirsch, 1956), полученных из нейтрофилов кролика, обусловлена присутствием в них белковых компонентов, являющихся по своим электрохимическим свойствам поликатионами и, по-видимому, не относящихся к ферментам. Строгое доказательство эти наблюдения получили в исследованиях другой группы американских ученых (Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a, 1966b, 1966c, 1966d), которые из смеси кислоторастворимых белков гранул (лизосом) нейтрофилов кролика и морской свинки выделили, очистили и охарактеризовали по физико-химическим свойствам группу катионных белков и полипептидов с молекулярной массой менее 10 кДа. В модельной системе *in vitro* ими были продемонстрированы микробоцидные свойства этих белков, не характерные для параллельно изученных кислых гидролаз (кислая фосфатаза, РНКаза, ДНКаза, β -глюкуронидаза) лейкоцитов (Zeya et al., 1966). Следует отметить, что этим биохимическим исследованиям предшествовали морфологические наблюдения, в которых с использованием красителя прочного зеленого, селективно выявляющего основные по природе полипептиды, была установлена транслокация лизосомных катионных белков на поверхность фагоцитированных микроорганизмов (бактерии, грибы), сопровождающаяся потерей жизнеспособности последними (Spitznagel, Chi, 1963). В своей совокупности данные наблюдения дали основание авторам рассматривать низкомолекулярные лизосомные катионные белки (точнее, полипептиды) нейтрофилов, которые позднее были названы дефенсинами (Ganz et al., 1985), в качестве специализированной группы веществ, проявляющих в отношении фагоцитированных микробов цитотоксическую активность. В нашей стране работы в этом направлении исследований были инициированы профессорами И. П. Ашмариным (Ашмарин и др., 1972, 1977) на кафедре биохимии Ленинградского

государственного университета и В. Е. Пигаревским (Пигаревский, 1975, 1978) в НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, научные коллективы которых плодотворно сотрудничали в течение нескольких десятилетий.

В настоящей монографии нашли отражение результаты исследований по проблеме белково-пептидных антибиотиков животного происхождения, проводимых в НИИ экспериментальной медицины РАМН, на кафедрах биохимии Санкт-Петербургского государственного университета и физиологии человека и животных Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. В проведении этих совместных работ принимали участие Г. М. Алешина, С. А. Анатолий, А. И. Борисов, Г. Е. Викулова, М. А. Данилова, Л. С. Колабская, М. В. Кондашевская, Л. Н. Краева, М. П. Лесникова, С. Н. Лызлова, Л. А. Ляпина, Ю. А. Мазинг, В. И. Морозов, Н. С. Новикова, Д. С. Орлов, Н. П. Раменская, С. В. Слепенков, В. Е. Стефанов, Л. Ю. Тарос, С. Б. Ткаченко, А. С. Толыбеков, В. В. Узбеков, О. В. Шамова, Э. К. Шхинек, М. И. Юнусова, О. Ю. Янковский, которым автор приносит свою искреннюю благодарность. Особую признательность автор выражает ведущему в мире специалисту в этой области исследований профессору Калифорнийского университета Лос-Анджелеса Р. Лереру (R. Lehrer), многостороннее сотрудничество с которым обеспечило возможность проведения работ на качественно новом методологическом и теоретическом уровне.

Автор глубоко признателен за помощь в подготовке рукописи книги к печати своим ближайшим сотрудникам Г. М. Алешинной, Г. Е. Викуловой и О. В. Шамовой. Буду благодарен читателям за любые замечания, конструктивную критику и пожелания по улучшению книги.

ГЛАВА 1

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ЖИВОТНЫХ

Более чем вековой период развития фагоцитарной теории иммунитета, впервые сформулированной И. И. Мечниковым в 1883 г., прошел путь от описания феноменологии процесса до расшифровки его морфобиохимических основ. В обобщающих работах отечественных (Адо, 1961; Покровский, Тутельян, 1976; Роговин и др., 1977; Пигаревский, 1978; Саяев, Романенко, 1979; Фрейдлин, 1984; Глебов, 1987; Маянский А., Маянский Д., 1989) и зарубежных (Klebanoff, Clark, 1978; Spitznagel, 1984; Gleich, Adolphson, 1986; Elsbach, Weiss, 1992; Furth, 1992) исследователей представлен значительный материал по биологии клеток, специализированных на выполнении защитных функций организма человека и животных путем фагоцитоза. В соответствии с современными взглядами к профессиональным фагоцитам относятся нейтрофилы (нейтрофильные гранулоциты), моноциты и их тканевые формы — макрофаги, эозинофилы. Эти клетки объединены в единый функциональный тип благодаря наличию у них ряда общих структурно-метаболических свойств и стереотипности поведения в фагоцитарном процессе. Морфобиохимическая специализация фагоцитов заключается в присутствии у них развитого лизосомного (гранулярного) аппарата (Пигаревский, 1978; Bainton et al., 1971; Baggiolini, Dewald, 1985; Gleich, Adolphson, 1986), являющегося делом физиологически активных веществ антибиотического действия, среди которых ведущую роль в умерщвлении (киллинге) микроорганизмов играет группа катионных белков и полипептидов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидный проникаемость увеличивающий протеин, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефеннины и др.) (Ашмарин и др., 1972, 1977; Роговин и др., 1977; Кокряков и др., 1981, 1997; Ganz et al., 1985; Spitznagel, Shafer, 1985; Elsbach, Weiss, 1988a, 1988b; Klebanoff, 1988).

Рассмотрению природы низкомолекулярных антимикробных веществ различных клеточно-тканевых структур животного организма, механизмов их действия и значению в формировании резистентности к инфекции посвящен настоящий раздел.

1.1. СТРУКТУРА И АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ДЕФЕНСИНОВ

Изучение природы и физиологических свойств антимикробных веществ нейтрофилов привело к открытию в их гранулярном аппарате группы лизосомных катионных белков небольшой молекулярной массы (Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a, 1966b, 1968, 1971), получивших в настоящее время название дефенсинов (от англ. *defense* — защита, оборона) (Ganz et al., 1985). Данный термин отражает основное функциональное назначение рассматриваемых пептидов — способность обеспечивать защиту макроорганизма от возбудителей инфекционных болезней. В свете биохимических (Кокряков и др., 1982, 1988; Кокряков, 1990; Spitznagel, 1984; Lehrer, Ganz, 1990; Elsbach, Weiss, 1992) и морфологических (Пигаревский, 1983, 1988; Мазинг, 1991) данных, накопленных в настоящее время, под лизосомными катионными белками следует понимать обширную группу гранулярных антимикробных протеинов лейкоцитов с основными (щелочными) свойствами их молекул, которая включает в себя в качестве составного ком-

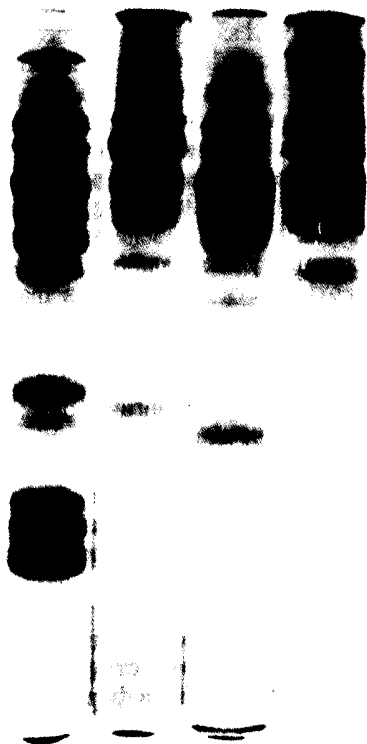


Рис. 1. Электрофореграммы кислоторастворимых белков нейтрофилов кролика, курицы, морской свинки и человека (слева направо).

Электрофоретический анализ осуществлен по методу Panyim, Chalkley (1969).

Дефенсины человека	1	2	3	4	5	6
HNP-1	AC	YCRIP-ACI	AGERRYGTCI	YQGR	L-WAFCC	
HNP-2	CY	CRIP-ACI	AGERRYGTCI	YQGR	L-WAFCC	
HNP-3	DC	YCRIP-ACI	AGERRYGTCI	YQGR	L-WAFCC	
HNP-4	VC	SCRLV-FC	RRELRVGNCL	IGVS-FTY	CCTRV	
HD-5	AT	CYCR	RTG-RCAT	RESLSG	VEISGR	L-YRLCCR
HD-6	TCH	CR-R-SC	YSTEYSYG	TCTVMGIN	-HRFCCL	

Дефенсины кролика

NP-1 (MCP-1)	VVC	ACRRAL-CL	PLERRAGFC	RIRGRI-HPL	CCRR
NP-2 (MCP-2)	VVC	ACRRAL-CL	PLERRAGFC	RIRGRI-HPL	CCRR
NP-3a	GIC	ACRRR-FC	PNSERFSG	YCRVNGAR	-YVRCCSRR
NP-3b	GR	CVCRKQL	LCYRERRI	GDCKIRGVR	-FPFCCPR
NP-4	VS	CTCRRF-SC	GFGERASG	STVNGVR	-HTLCCRR
NP-5	VF	CTCGFL-CG	SGERASG	CTVNGVR	-HTLCCRR
NP-6	GIC	ACRRR-FCL	NFEQFSG	YCRVNGAR	-YVRCCSRR
DesG1-NP-6	IC	ACRRR-FCL	NFEQFSG	YCRVNGAR	-YVRCCSRR

Дефенсины крысы

RtNP-1	TC	YCRRT-RC	GFRERLSG	ACGYRORI	-YRLCCR
RtNP-2	VT	YCRST-RC	GFRERLSG	ACGYRORI	-YRLCCR
RtNP-3	CS	CRTS-SC	RFGKRLSG	ACRLNGRI	-YRLCC
RtNP-4	AC	YCRIG-AC	VSGERLTG	ACGLNGRI	-YRLCCR

Дефенсины морской свинки

GPCP-1	RRC	ICTTR-TC	RFPYRRLG	TCIFQNRV	-YTFCC
GPCP-2	RRC	ICTTR-TC	RFPYRRLG	TCLFQNRV	-YTFCC

Дефенсины (криптины) мыши

Сгуп-1	LR	DLVYCRSR-G	CKGRERMN	GTCKR-GH	LLYLCCR
Сгуп-2	LR	DLVYCRTR-G	CKRRERMN	GTCKR-GH	LMYLCCR
Сгуп-3	LR	DLVYCRKR-G	CKRRERMN	GTCKR-GH	LMYLCCR
Сгуп-4	GL	LYCRKG-H	CKRGERV	GTCTC---G	-IRFLYCCPRR
Сгуп-5	LS	KKLICVCR	IR-GCKR	RELVFGTCRN	-LFLTFFVCCS
Сгуп-6	LR	DLVYCRAR-G	CKGRERMN	GTCKR-GH	LLMYLCCR

Дефенсины хомячка

HaNP-1	VT	CFRRR-GC	ASRERHIG	YCRF-GNT	IYRLCCRR
HaNP-2	CF	CKRP-VC	DSGETQIG	YCRF-GNT	FYRLCCRQ
HaNP-3	VT	CFRRR-GC	ASRERLIG	YCRF-GNT	IYGLCCRR
HaNP-4	VT	CFCKRP-VC	DSGETQIG	YCRF-GNT	FYRLCCRR

Рис. 2. Первичные структуры дефенсинов млекопитающих.

Жирным шрифтом отмечены инвариантные (консервативные) аминокислотные остатки.

Здесь и на рис. 3—7, 9—15, 19, 24 пробелы в аминокислотных последовательностях ряда пептидов введены с целью оптимального сопоставления структур на степень гомологии (сходства). Однобуквенное обозначение аминокислотных остатков: А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, Е — глутаминовая кислота, рЕ — пироглутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспаргин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин. 1, 2, 3, 4, 5, 6 — порядковые номера цистеиновых остатков в молекуле.

понента и дефенсины. Электрофореграммы кислоторастворимых белков нейтрофилов некоторых видов животных и человека, полученные нами, достаточно полно отражают их гетерогенность (рис. 1). Следует обратить внимание на своеобразие белковых спектров нейтрофилов (морфологически точнее — псевдозозинофилов) кролика (Zeya et al., 1966), морской свинки (Zeya, Spitznagel, 1963, 1966b; Selsted, Harwig, 1987) и кур (Brune, Spitznagel, 1973), которые характеризуются при-

сутствием низкомолекулярных, опережающих по электрофоретической подвижности лизоцим катодных компонентов. Эта группа полипептидов и получила в настоящее время наименование дефенсинов. Сходные катионные полипептиды были обнаружены в нейтрофилах крыс (Hodinka, Modrzakowski, 1983), коров (Gennaro et al., 1983) и хомячка (Mak et al., 1996). Дефенсины как физиологически активные вещества отличаются высокой микробицидной активностью, что и послужило основанием для их всестороннего физико-химического изучения.

В ранней (Zeya, Spitznagel, 1966a, 1966c, 1966d, 1968, 1971; Ranadive, Cochrane, 1968) и последующих (Selsted et al., 1984, 1985a) сериях работ было осуществлено выделение и фракционирование дефенсинов кролика, изучены их структурные и антимикробные свойства. Благодаря использованию методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и гель-фильтрации удалось получить в очищенном состоянии 6 компонентов дефенсинов кролика, полностью установить их первичную структуру (рис. 2).

Отличительным признаком молекул дефенсинов кролика является высокое (от 5 до 10 остатков) содержание в их составе аминокислоты аргинина, что в значительной степени определяет их положительный заряд, высокую изоэлектрическую точку ($pI > 10.5$) и, как следствие, опережающую остальные кислоторастворимые белки нейтрофилов электрофоретическую подвижность в направлении к катоду (рис. 1). Следует обратить внимание на относительно высокое содержание в их составе (до 30 мол%) аминокислот с гидрофобными боковыми цепями (изолейцин, пролин, лейцин, валин), что, по-видимому, имеет немаловажное значение в реализации функциональных свойств дефенсинов. Другая особенность первичной структуры дефенсинов заключается в наличии 6 остатков аминокислоты цистеина, участвующих в образовании 3 внутримолекулярных дисульфидных мостиков, придающих глобулоподобной молекуле пептида повышенную устойчивость к переваривающему действию многочисленных протеиназ гранулярного аппарата нейтрофилов и очагов воспаления и стабилизирующих вторичную структуру пептидной молекулы, которая представлена 3 антипараллельными β -тяжами, образующими β -складчатый слой (Bach et al., 1987; Pardi et al., 1988; Hill et al., 1991). При этом первый цистеин образует S—S-связь с последним цистеином (1—6 S—S-связь), второй — с пятым (2—5 S—S-связь) и третий — с четвертым (3—4 S—S-связь). Благодаря тому что первый цистеин вступает в образование дисульфидной связи с шестым цистеином (1—6 S—S-связь), молекула дефенсина приобретает циклическую структуру. Такая особенность их строения подтверждена кристаллографическим (Stanfield et al., 1988; Hill et al., 1991) и ЯМР-спектроскопическим (Bach et al., 1987; Pardi et al., 1988) исследованиями. В дополнение к этому выявлено пространственное разделение в свернутой глобуле остатков аминокислот, несущих боковые положительно заряженные и гидрофобные группы, что дает основание характеризовать молекулу как амфипатическую. Подобная амфипатическая (амфифильная) структура дефенсинов делает их активными мембрано-

тропными соединениями, способными не только к взаимодействию с фосфолипидами за счет электростатических свойств своей молекулы, но и внедрению в липидный бислой благодаря гидрофобным взаимодействиям (Selsted et al., 1993).

Дефенсины нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов) человека были выделены, очищены и охарактеризованы по структурным и антимикробным свойствам в 1985 г. (Ganz et al., 1985; Selsted et al., 1985b). Общий план их строения сходен с таковым дефенсинов кролика (рис. 2), для которого характерно консервативное расположение шести остатков цистеина, двух — глицина, двух — аргинина и глутаминовой кислоты. Однако основные фракции дефенсинов человека (HNP-1, HNP-2, HNP-3) являются менее катионными (только 4 остатка аргинина) и более гидрофобными (5 остатков ароматических аминокислот, включая триптофан) молекулами по сравнению с гомологичными пептидами из других видовых источников.

Первичная структура дефенсинов человека и кролика была подтверждена в молекулярно-генетических исследованиях по клонированию их генов и изучению закономерностей их экспрессии в клетках (Daher et al., 1988; Michaelson et al., 1992). Дефенсины человека синтезируются в промиелоцитах костного мозга в форме молекулы-предшественницы, состоящей из 94—100 аминокислот (рис. 3). В ходе 6—24-часового процессинга препродефенсина HNP-1 происходит последовательное отщепление от его N-концевой части сначала гидрофобного сигнального пептида (MRTLAILAAILLVALQAQA), затем в 2 этапа анионного профрагмента (EPLQARADEVAAPEQIAADIPEVVVSLAWDESLAPKHPGSRKNNM) с образованием конечной, функционально активной молекулы дефенсина: ACYCRIPACIAGE-RRYGTCTIYQGRLLWAFCC (Valore, Ganz, 1992). По мнению авторов, биологический смысл установленной последовательности посттрансляционного процессинга молекулы препродефенсина заключается в

	Сигнальный пептид	Прочась дефенсина	
NP-1	MRTLALLAAILLVALQAQA	EHVSVSVIDEVV-----DQQPQAEQDQVAVIYKENE	
NP-5	MRTLALLAAILLVTLQAQA	ELHSGMADDGV-----DQQPQAEQDQVAVIYKQDE	
NP-3a	MRTLILLAAIILALQAQA	ELFSVNVDEVL-----DQQP-GSDQDLVIHLTGEE	
HNP-1	MRTLAILAAILLVALQAQA	EPLQARADEVAA-----APEQIAADIPEVVVSLAWDE	
HNP-4	MRIIALLAAILLVALQVRA	GPLQARGDE-AP-----GQEQRGPEQDQISISFAWDK	
HD-5	MRTIAILAAILLVALQAQA	ESLQERADE-AT-----TQKQSGEDNQDLAISFGANG	
HD-6	MRTLITLTAIVLVALQAQA	EPLQAEEDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFEDA	
GPCP-1	MRTVPLFAACLILLMAQA	EPLPRAADH-----SDTKMKGDREDHVAIVISFEWEE	
CRYP-1	MKKLVLLFALVLLGFQVQA	DSIQNTDE-----ETKTEEQPGEEDQAVSVSFGDPE	
	Прочась	Зрелый (основной) пептид	
NP-1	SSALEALGVKAG	VVCACRRALCLFRERRAGFCRIRGRHPLCCRR	95
NP-5	TSPLEVLGAKAG	VFCTCRGFLCGSGERASGCTINGVRHTLCCRR	95
NP-3a	SSALQVPDTK	GICACRRRFPNRFSGYCRVNGARYVRCCSRR	93
HNP-1	SLAPKHPGSRKNN	ACYCRI PACIAGERRYGTCIYQGRLLWAFCC	94
HNP-4	SSALQVSGSTRGM	VCSCRLVFCRRTLELVGNCILGGVFTYCSTRVD	97
HD-5	LSALRTSGSQARA	TCYCRTGRCATRESLSGVCEISGRLYRLCCR	94
HD-6	SSSLRALGSTRAF	TCHCR-RSCYSTEYSYGTCTVMGNIHFRCCCL	100
GPCP-1	STSLEDAGAGAG	RRICICTTRTCRFPYRRLGTCIFQNRVYTFCC	93
CRYP-1	GTSLQE-ES	LRDLVCYCRSRGCKGRERMNGTCRKGHLLYLCCRR	93

Рис. 3. Первичные структуры предшественников дефенсинов (препродефенсины).

предупреждении аутоксического действия дефенсинов до момента их упаковки в азурофильные гранулы в аппарате Гольджи.

В настоящее время расшифрованы первичные структуры дефенсинов из нейтрофилов морской свинки (Selsted, Harwig, 1987; Yamashita, Saito, 1989), крысы (Eisenhauer et al., 1989) и хомячка (Mak et al., 1996), молекулы которых построены по единому структурному принципу, что позволяет отнести все рассмотренные полипептиды к одному гомологическому классу веществ (см. рис. 2). По-видимому, к этому семейству дефенсинов можно отнести и пептид из кожных покровов морской миноги *Petromyzon marinus* (принадлежащей к классу круглоротых (Cyclostomata), подтипу позвоночных (Vertebrata), типу хордовых (Chordata)), который был выделен и секвенирован в 1996 г. (Conlon, Sower, 1996). Шервичная структура пептида включает 6 остатков цистеина, образующих 3 внутримолекулярных дисульфидных мостика, и блок из 3 аргинильных остатков: CPCGRRRCCVRLNVYCCF. Эта молекула имеет черты структурного сходства с дефенсинами кролика NP-3a и крысы RtNP-1.

В нейтрофилах человека дефенсины составляют 5—7% клеточного белка (Ganz, 1987), кролика — до 18% (Zeya, Spitznagel, 1968). Эти полипептиды локализованы преимущественно в азурофильных гранулах нейтрофилов человека (Rice et al., 1987) и кролика (Zeya, Spitznagel, 1971), хотя в следовых количествах представлены и в специфических.

Необходимо отметить, что нейтрофильные гранулоциты являются не единственными клетками организма человека и млекопитающих, содержащими дефенсины. Еще в начале 80-х годов два компонента кроличьих дефенсинов NP-1 и NP-2 были выявлены и в альвеолярных макрофагах — MCP-1 и MCP-2 соответственно (Selsted et al., 1983). Позднее была выявлена мРНК дефенсинов (Ouellette et al., 1989a) и расшифрована первичная структура этих полипептидов из клеток Панета, локализованных в покровном эпителии слизистой тонкого кишечника мышей (Eisenhauer et al., 1992; Selsted et al., 1992a). Эти дефенсины получили в литературе наименование криптдинов (Eisenhauer et al., 1992), поскольку они локализованы в клетках кишечных крипт. Структура 6 интестинальных дефенсинов мыши приведена на рис. 2. Есть доказательства присутствия дефенсинов (HD-5 и HD-6) в клетках эпителия тонкой кишки человека (Jones, Bevins, 1992). Клеточно-тканевая топография дефенсинов однозначно свидетельствует в пользу их участия в качестве универсальных антимикробных агентов в формировании неспецифической резистентности организма к инфекции.

В условиях *in vitro* продемонстрированы бактерицидная (Кокряков и др., 1973, 1977; Анатолий и др., 1977; Ашмарин и др., 1977; Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a; Zeya et al., 1966; Selsted et al., 1984), микоцидная (Segal et al., 1985) и вирусоцидная (Lehrer et al., 1985; Daher et al., 1986) активности дефенсинов, что позволяет говорить об этой группе полипептидов как об антибиотиках животного происхождения с широким спектром антимикробного действия (Кокряков, 1988;

Кокряков и др., 1997; Spitznagel, 1984; Ganz et al., 1985; Lehrer et al., 1991a, 1991b, 1993). В специальном иммуногистологическом исследовании была доказана важная роль дефенсинов в инактивации возбудителя экспериментального сифилиса у кроликов (Borenstein et al., 1991a, 1991b).

Обосновывая функциональную значимость дефенсинов в обеспечении резистентности к инфекции, оригинальный подход использовали американские исследователи (Couto et al., 1994). С помощью приемов генной инженерии они встроили в геном макрофагов мыши ген дефенсина человека (HNP-1), экспрессия которого в трансдуцированной клетке была подтверждена определением пептидных молекул иммуноцитохимическим и иммуноферментным методами. Далее авторы оценивали способность исходных и трансдуцированных макрофагов мыши подавлять размножение фагоцитированных дрожжевых клеток грибка *Histoplasma capsulatum*. Ими было установлено, что только в макрофагах, продуцирующих внутриклеточно дефенсин человека HNP-1, наблюдается снижение роста и размножения дрожжевых клеток. Интересно отметить, что этот эффект проявляется при концентрациях дефенсина на 4 порядка меньших, нежели имеющих место в зрелых нейтрофилах человека (~50 мкг/10⁷) и альвеолярных макрофагах кролика (6.5—20 мкг/10⁷).

В морфологических исследованиях, проводимых под руководством профессора В. Е. Пигаревского, неоднократно оценивалась роль дефенсинов как антимикробных агентов нейтрофилов при фагоцитозе и воспалении (Пигаревский, 1975, 1983, 1988; Данилова, 1988; Мазинг, 1988, 1991). В ходе этих исследований был разработан цитохимический тест полуколичественного определения дефенсинов и структурно-родственных им пептидов в нейтрофильных гранулоцитах человека и экспериментальных животных, который получил название лизосомально-катионного теста (Пигаревский, 1975). Тест нашел широкое клиническое применение для оценки состояния внутриклеточной микробицидной активности нейтрофилов при различных формах инфекционной патологии.

Накопленные в настоящее время экспериментальные данные дают основание для следующих представлений о механизмах антибиотического действия дефенсинов. Выявлено несколько общих закономерностей в характере действия дефенсинов на *Staphylococcus aureus* (Walton, Gladstone, 1976; Walton, 1978), *Escherichia coli* (Lehrer et al., 1989) и *Candida albicans* (Lehrer et al., 1988b). Положительный заряд молекул дефенсинов определяет их высокое сродство к отрицательно заряженным компонентам (тейхоевые кислоты, липополисахариды, кислые фосфолипиды) клеточной оболочки микроорганизмов. Благодаря электростатическому взаимодействию происходит адсорбция полипептидов на поверхности микробных клеток. В пользу ведущей роли электростатических сил на первом этапе этого процесса свидетельствуют данные об ослаблении или даже отмене антимикробного действия дефенсинов в присутствии полианионов (ДНК, РНК, полифосфаты, гепарин, липополисахариды) или повышении ионной силы

среды выше значения 0.2. Все эти факторы в той или иной степени подавляют сорбцию пептидов на поверхности клеток-мишеней. В этом отношении поведение дефенсинов сходно с таковым, описанным для ядерных основных белков, — гистонов и протаминов (Ждан-Пушкина, 1973).

Наличие в структуре дефенсинов значительного числа неполярных боковых цепей гидрофобных аминокислот обуславливает возможность их внедрения в липофильную фазу бислоя мембран бактерий и грибов. За счет гидрофобных взаимодействий с углеводородными хвостами жирных кислот осуществляется встраивание антимикробных пептидов в мембраны (Hill et al., 1991; Selsted, 1993). Как было выяснено в экспериментах с использованием дыхательных ядов (цианид, 2-п-гептил-4-гидроксихинолин-N-оксид), состояние обмена веществ микробной клетки заметно сказывается на ее чувствительности к действию дефенсинов (Walton, Gladstone, 1976; Lehrer et al., 1989a). Активно метаболизирующие бактерии и грибы являются лучшей мишенью поражающего действия дефенсинов по сравнению с клетками, находящимися в стационарной фазе роста культуры или в условиях анаэробноза. Этот парадоксальный феномен может свидетельствовать о значении трансмембранного потенциала клеток-мишеней в реализации антимикробного действия дефенсинов. По-видимому, в процессе пенетрации полипептидов через мембраны важную роль играют ориентация электрического поля плазмалеммы и величина ее мембранного потенциала. Благодаря тому что внутренняя поверхность мембран по отношению к внешней заряжена отрицательно, возможен электрофорез катионных (особенно амфипатических) веществ через цитоплазматическую мембрану внутрь микробной клетки. Это свойство электрического поля мембран является третьим важным фактором, определяющим эффективность антимикробного действия дефенсинов. Процесс внедрения и прохождения дефенсинов через мембрану сопровождается нарушением ее структурной целостности с образованием пор, что имеет следствием изменение осмотического барьера клеток-мишеней, вытекание из них жизненно важных компонентов (ионов K, Ca, фосфорсодержащих соединений, аминокислот, нуклеотидов, коферментов), диссипацию мембранного потенциала. Дезорганизация при этом мультиферментных комплексов, встроенных в мембрану, приводит к подавлению дыхания, окислительного фосфорилирования, репликации, транскрипции и синтеза белков, т. е. ключевых метаболических процессов микробных клеток. В условиях нарушения структурной целостности мембран вода имеет тенденцию накапливаться в клетках и вызывает набухание, которое может привести к разрыву клеток. Результатом всех этих структурно-метаболических изменений, происходящих под действием дефенсинов, является гибель микроорганизмов.

Мы сознательно остановились на рассмотрении механизмов антимикробного действия дефенсинов, поскольку они в значительной степени свойственны многим природным (Bashford et al., 1986; Bernheimer, Rudy, 1986; Kini, Evans, 1989; Raynor et al., 1991; Maloy, Kari,

1995) и синтетическим (Афиногенов, Панарин, 1993) положительно заряженным полимерам, несмотря на наличие у последних ряда специфических структурных свойств.

Наряду с антимикробным действием дефенсины в культуральных условиях могут проявлять и цитотоксические свойства в отношении опухолевых (Lichtenstein et al., 1986a, 1986b) и нормальных клеток (тимоцитов, спленоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, эндотелиоцитов и эритроцитов) собственного организма (Lichtenstein et al., 1988a, 1988b; Okrent et al., 1990). Предполагается (Lehrer et al., 1993), что дефенсины являются одним из молекулярных агентов, ответственных за реализацию антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении герпес-инфицированных клеток (Siebens et al., 1979). В какой степени цитотоксическая активность дефенсинов реализуется в условиях организма — это вопрос, который является предметом проводимых в последние годы исследований (Ganz et al., 1992). Внеклеточная локализация части дефенсинов при фагоцитозе и воспалении является убедительно документированным фактом (Ganz, 1987; Panyutich et al., 1991, 1993b). Однако благодаря быстрому и избирательному взаимодействию их с некоторыми плазменными белками, являющимися ингибиторами сериновых протеиназ и получившими в литературе название серпинов (Panyutich, Ganz, 1991), цитотоксичность дефенсинов вне клетки может быть нейтрализована. В этих условиях они могут оказывать на структуры организма другие воздействия, не приводящие уже к повреждающим эффектам. Другим фактором, определяющим преимущественное воздействие внеклеточно локализованных дефенсинов на микроорганизмы очагов воспаления, кожи и слизистых поверхностей, а не на клетки собственного организма, является липидный состав плазмалеммы бактерий. В частности, в ее составе находится большое количество кислых фосфолипидов (фосфатидилглицерола и кардиолипина), которые практически отсутствуют в плазмалемме эукариотических клеток. Эти фосфолипиды не только маркируют поверхность мембраны бактерий, но и «притягивают» к ней дефенсины за счет более сильных электростатических взаимодействий между положительно заряженными группами пептида и фосфатными группами фосфолипидов. Таким образом реализуется относительная селективность воздействия дефенсинов на микроорганизмы (Hristova et al., 1997) при внеклеточной локализации антибиотического пептида (АП). В фаголизосомах же нейтрофилов дефенсины однозначно участвуют в инактивации (киллинге) фагоцитированных микроорганизмов, что является одним из молекулярных факторов, обеспечивающих завершенность фагоцитоза (Пигаревский, 1978, 1988; Spitznagel, Chi, 1963).

1.2. β -ДЕФЕНСИНЫ

Первый представитель семейства β -дефенсинов был выделен из ресничного эпителия трахеи крупного рогатого скота и в литературе известен под названием трахеального антимикробного пептида

	1	2	3	4	56
BNBD-1	DFASCHTNGGICLPNRC	PGHMIQIGICFRPRV	KCCRSW		
BNBD-2	VRNHVTCRINRGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRI	KCCRSW		
BNBD-3	PEGVRNHVTCRINRGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRI	KCCRSW		
BNBD-4	PERVRNPQSCRWNMGVCI	PFLCRVGMQRQIGTCFGPRV	PCCRR		
BNBD-5	PEVVRNPQSCRWNMGVCI	PISCFGNMRQIGTCFGPRV	PCCRR		
BNBD-6	PEGVRNHVTCRIYGGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRV	KCCRRW		
BNBD-7	PEGVRNFVTCRINRGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRI	KCCRR		
BNBD-8	VRNFVTCRINRGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRI	KCCRR		
BNBD-9	EGVRNFVTCRINRGFCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRI	KCCRR		
BNBD-10	PEGVRSYLSGWNMGICLLNRC	CPGMRQIGTCFLAPV	KCCRR		
BNBD-11	GPLSCRRNGGVCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRV	KCCRSW		
BNBD-12	GPLSCGKNGGVCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRV	KCCRSW		
BNBD-13	SGISGPLSCGRNGGVCVPI	RCFGRTRQIGTCFGPRV	KCCRSW		
LAP	OGVRNSOSCRNKGICVPI	RCFGRTRQIGTCFLGAQV	KCCRRK		
EBD	NPLSCLNRGICVPI	RCFGRTRQIGTCFTPV	SKCCRRW		
TAP	NPVSCVRNKGICVPI	RCFGRTRQIGTCVGRAV	KCCRRK		
hTAP	NPVSCVRNKGICVPI	RCFGRTRQIGTCVGRAV	KCCRRK		
hBD-1	DHYNCSVSSGGQCLYSAC	PIFTKIQTCTYRGKAK	CKCK		
hBD-2	TCLKSGAICHVFC	PRRYKQIGTCGLP	TCKCKK		
mBD-1	DQYKCLQHGGFC	LRSSCFPSNTKLGQ	TCKPKPNCCKS		
Gal-1	GRKSDCFRKS	GFCAFLKCFSLTLISGK	SRFYLCCKRIW		
Gal-1 α	GRKSDCFRKN	GFCAFLKCFYLTLISGK	SRFHLCCCKRIW		
Gal-2	LFC--KGGSC	HFGGCPSHLIKVGSC	FGFRS--CKWPWNA		
CHP-1	GRKSDCFRKS	GFCAFLKCFSLTLISGK	SRFYLCCKRIW		
CHP-2	GRKSDCFRKN	GFCAFLKCFYLTLISG	LCSXFHLCC		
THP-1	GKREKCLRRNG	FCALKCFTL	SLVSI	SGTCSR	RFQV--CC

Рис. 4. Первичные структуры β -дефенсинов позвоночных животных.

Жирным шрифтом отмечены консервативные аминокислотные остатки.

(TAP — *tracheal antimicrobial peptide*) (Diamond et al., 1991) (рис. 4). Большая группа пептидов этого семейства (BNBD-1—BNBD-13) была выделена и структурно охарактеризована из нейтрофилов крупного рогатого скота (Selsted et al., 1993). Расположение цистеинов и их сочетание в образовании дисульфидных связей (1—5, 2—4, 3—6) оказались отличными от таковых для ранее охарактеризованных дефенсинов из нейтрофилов кролика, морской свинки, человека и крысы, а потому было решено выделить пептиды с подобными структурными особенностями в отдельное семейство β -дефенсинов (Tang, Selsted, 1993). Необходимо подчеркнуть, что по своим вторичным и третичным структурам β -дефенсин, несмотря на ряд особенностей их аминокислотной последовательности и аранжировки дисульфидных связей, оказались идентичными классическим, или α -дефенсинам (Zimmerman et al., 1995). Поэтому не случайно они обладают, как правило, сходной с α -дефенсинами антимикробной активностью (Selsted et al., 1993; Harwig et al., 1994b; Bals et al., 1998).

В 1995 г. β -дефенсин был выделен из эпителия языка коров (Schonwetter et al., 1995), продукция этого пептида возрастала при воспалении органа, вызванного его повреждением. Его структура оказалась гомологичной, но не идентичной TAP и β -дефенсинам из нейтрофилов коров, в связи с чем он был назван антимикробным пептидом языка (LAP — *lingual antimicrobial peptide*). Авторы показали, что мРНК этого пептида обнаруживается в эпителиях кожи лица, респираторно-

го (трахеи, бронхов, легких) и репродуктивного трактов самцов и самок, мочеполовой и пищеварительной системах.

В настоящее время молекулярно-генетическими методами выявлены, выделены и охарактеризованы гены, ответственные за индуцибельный синтез энтеральных дефенсинов (EBD) эпителия тонкой кишки коров, которые хотя и относятся к β -семейству, но по своей первичной структуре отличны от ранее описанных дефенсинов из нейтрофилов (Tarver et al., 1998). Картину разнообразия структур дефенсинов и особенностей их продукции в различных клеточно-тканевых структурах у крупного рогатого скота дополняют последние данные о конститутивном синтезе BNBD-4 и BNBD-5 в альвеолярных макрофагах (Ryan et al., 1998). Методом полимеразной цепной реакции выявлена экспрессия гена β -дефенсина в эпителиальных клетках тонкой кишки (Tarver et al., 1998), легких и мочеполового тракта (Bals et al., 1998) мыши, а молекулярно-генетическими методами — присутствие генов β -дефенсинов в клетках свиньи (Zang et al., 1998) и овцы (Huttner et al., 1998).

Структурно-родственные β -дефенсинам коров пептиды были выделены и секвенированы нами совместно с американскими исследователями из псевдоэозинофилов (клетки структурно и функционально гомологичные нейтрофилам млекопитающих) кур *Gallus gallus* (Harwig et al., 1994a, 1994b).

Первые сведения об антимикробных пептидах гетерофилов кур были получены еще в 70-е годы (Brune, Spitznagel, 1973). Было установлено, что в их гранулярном аппарате содержится по меньшей мере три низкомолекулярных основных пептида, инактивирующих в условиях *in vitro*, — *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* и *Staphylococcus albus*. Первичная структура этих пептидов оставалась нерасшифрованной. Мы заинтересовались данной группой веществ в процессе изучения резистентности кур породы Бройлер-6 к инфекции и зависимости ее от белкового спектра псевдоэозинофилов. В совместных исследованиях с сотрудниками Всесоюзного научно-исследовательского института ветеринарного птицеводства (Колабская и др., 1983) нами была установлена интересная закономерность во взаимодействии хозяин—паразит: резистентность кур к кишечной инфекции находилась в прямой зависимости от содержания в их гетерофилах дефенсиноподобных пептидов. Группы животных с дефицитом рассматриваемых веществ характеризовались сниженной резистентностью к инфекции, в этих партиях наблюдался максимальный падеж птицы. Нами совместно с американскими коллегами было осуществлено выделение и изучение структурно-функциональных свойств рассматриваемых пептидов (Harwig et al., 1994a, 1994b).

Кислотный экстракт из экссудатных псевдоэозинофилов кур фракционировали геле-фильтрацией на акрилексе P-10. В одном из пиков электрофоретически были выявлены дефенсиноподобные пептиды, разделение которых осуществляли далее путем сочетанного применения методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и preparative электрофореза в полиакриламидном геле. Удалось полу-

чить в высокоочищенном виде 3 полипептида, аминокислотный состав которых характеризовался наличием большого количества остатков основных аминокислот (лизина, аргинина) и цистеина.

Секвенирование пептидов выявило следующие особенности их структуры: высокое содержание остатков лизина и аргинина, наличие 6 остатков цистеина, образующих 3 дисульфидных мостика (см. рис. 4). Структурная организация этих полипептидов отлична от таковой классических дефенсинов человека, кролика и крысы (см. рис. 2). Галлинацины (Gal), как были названы секвенированные полипептиды, на основании характера расположения цистеиновых остатков в молекуле следует отнести к группе β -дефенсинов — антибиотических полипептидов, выделенных впервые из эпителия трахеи (Diamond et al., 1991) и нейтрофилов коров (Selsted et al., 1993). Первичные структуры наиболее основных компонентов Gal-1 α и Gal-1 различаются только по 3 позициям: в положениях 10 и 20 у первого вместо серина располагается аспарагин и тирозин соответственно, а в положении 32 тирозин заменен на гистидин. Подобные замещения определяют более катионный характер молекулы Gal-1 α по сравнению с Gal-1 и их опережающую электрофоретическую подвижность по направлению к катоду.

Все 3 полипептида оказались активными антибактериальными агентами. Антигрибковую активность проявили в условиях тестирования только Gal-1 α и Gal-1. Можно предположить, что отсутствие микоцидной активности у Gal-2 обусловлено менее катионным зарядом его молекул. В свете полученных данных об антимицробной активности галлинацинов находит частичное объяснение факт повышенной чувствительности тех кур к инфекции, для которых установлен дефицит этих антибиотических полипептидов в гетерофилах.

В том же году независимо от нас другая группа американских ученых выделила и секвенировала 2 пептида из гетерофилов кур (CHP-1 и CHP-2), которые по структуре оказались практически идентичны галлинацинам Gal-1 и Gal-1 α , а также 3 пептида из гетерофилов крови индюшки (THP-1, THP-2, THP-3) (Evans et al., 1994). Различие между структурами Gal-1 и CHP-1 выявлено только на одной С-концевой аминокислоте (аргинин вместо выявленного нами триптофана). Не исключено, что подобные расхождения в результатах сиквенса являются следствием не технических ошибок, а связаны с существующими в природе особенностями их структуры, характерными для различных пород кур. Ранее подобная структурная микрогетерогенность

```

mBD-1 MKTHYEDLVVICFLFSQMEPGVGIILTSLGRRTDQYKCLQHGGLRSLSSCPNKLQGTCKPDKPNCCKS
hBD-1 MRTSYLLPTLCLLLSEMASGGNFLTGLGHRSDHYNCVSSGGQCLYSACPIFTRIQGTCTYRGKAKCKK
hBD-2 MRVLYLLFSLFIFILM-PLPG--VFGGIGDPV---TCLKSGAICHPVFCPRRYKQIGTCGLPGTKCKKPK
hTAP MRLHLLALLLFLVLSAW-SGFTQGVG----NPVSCVRNKGICVPIRCPSGSMKQIGTCVGRAVKCCRKK
TAP MRLHLLALLLFLVLSAW-SGFTQGVG----NPVSCVRNKGICVPIRCPSGSMKQIGTCVGRAVKCCRKK
EBD MRLHLLALLLFLVLSAG-SGFTQGIS----NPLSCLRNKGICVPIRCPSGSLRQIGTCFTPSVKCCRWR
LAP MRLHLLALLLFLVLSAG-SGFT----OGVRSOSCRRNKGICVPIRCPSGSHRQIGTCLGAQVKKCRRK
  
```

Рис. 5. Первичные структуры предшественников β -дефенсинов (препро- β -дефенсина).

Подчеркнута структура зрелого (основного) пептида.

в пределах отдельных фракций была установлена для дефенсинов, выделенных из нейтрофилов разных линий и пород крыс.

Новый всплеск исследований, связанных с выделением и анализом структурно-функциональных свойств β -дефенсинов, был инициирован обнаружением в плазме крови человека (Bensch et al., 1995) пептида (hBD-1) рассматриваемого семейства (рис. 5). Далее методом RT-PCR было показано, что ген hBD-1 экспрессируется как минимум на уровне транскрипции (образования мРНК) во многих органах: слюнных железах, трахее, простате, плаценте, тимусе, тестикулах, тонком кишечнике (Zhao et al., 1996). мРНК дефенсина hBD-1 продуцируется непрерывно в культуре эпителиальных нормальных клеток человека из трахеи, бронхов, легких и молочной железы.

Другими группами исследователей молекулярно-генетическими методами выявлены транскрипты гена hBD-1 в эпителии легких (McCray, Bantley, 1997) и гена, экспрессируемого в эпителии трахеи человека (hTAP), который ответствен за синтез пептида, практически идентичного трахеальному пептиду (TAP) из эпителия крупного рогатого скота (Ko et al., 1997). Кроме того, в кератиноцитах кожи человека выявлена мРНК, ответственная за возможный синтез дефенсина hBD-2, гомологичного, но не идентичного пептиду hBD-1 (Harder et al., 1997). Все эти данные свидетельствуют о том, что барьерные эпителии многих органов и тканей человека потенциально способны продуцировать дефенсины преимущественно β -семейства. Это, по-видимому, свойственно и клеткам эпителия языка, и мочеполового тракта мышей (mBD-1) (Huttner et al., 1997; Bals et al., 1998), языка, респираторного и пищеварительного трактов свиньи (Zhang et al., 1998), а также речного буйвола и овцы (Iannuzzi et al., 1996).

1.3. ДЕФЕНСИНЫ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

1.3.1. ДЕФЕНСИНЫ НАСЕКОМЫХ

Дефенсины насекомых были открыты независимо друг от друга двумя группами исследователей. Первоначально они были обнаружены в культуральной среде клеток NIH Sape-4, которые представляют собой поддерживаемую *in vitro* линию эмбриональных клеток серой мясной мухи *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama, Natori, 1988). Эти пептиды в литературе получили название сапесины (sarpesin). В 1989 г. французские исследователи выделили из гемолимфы личинки падальной мухи *Phormia terranova* два антибактериальных пептида, получивших название формицин А и формицин В (*phormicin*), которые имели частичное структурное сходство с дефенсином NP-1

```
ATCDLLSGTGINHNSACA-AHCLLGNRGGYCNKGVQVCVRN (1)
```

```
VVCCRRALCLPRERRAGFCRIRGRINPLCCRR (2)
```

Рис. 6. Сравнение первичной структуры формицина, выделенного из гемолимфы личинки падальной мухи (*Phormia terranova*) (1), и дефенсина NP-1 из нейтрофилов кролика (2).

Дефенсини двукрылых
(отряд Diptera)

	1	2	3	4	5	6
<i>Phormia terranovae</i>	ATCDLLS----	GTGINHSACAANCLLR-	GNR-GGYCN-	---	KGVCVCRN	
<i>Phormia terranovae</i>	ATCDLLS----	GTGINHSACAANCLLR-	GNR-GGYCN-	---	KGVCVCRN	
<i>Eristalis tenax</i>	ATCDLLS----	FLNVNHAACAANCLSK-	Gyr-GGYCDG-	---	KKVCNCR	
<i>Sarcophaga peregrina</i>	ATCDLLS----	GTGINHSACAANCLLR-	GNR-GGYCN-	---	KAVCVCRN	
<i>Sarcophaga peregrina</i>	LTCEIDR-----	SLCLLRCRLK-	GylRA-YC-SQQ-	K-	VCRCVQ	
<i>Sarcophaga peregrina</i>	ATCDLLS----	GIGVQHSACALRCVFR-	GNR-GGYCTG-	---	KGICVCRN	
<i>Drosophila melanogaster</i>	ATCDLLS----	KWNWNHTACAGNCIAK-	GFK-GGYCN-	---	KAVCVCRN	
<i>Aedes aegypti</i>	ATCDLLS----	GFGVGDSCAACAIAR-	GNR-GGYCN-	---	KKVCVCRN	

Дефенсини (роялизин) пчелы
(отряд Hymenoptera)

<i>Apis mellifera</i>	VTCDLLSF--	KG-QVND	SACAANCLSL-	GKA-GCHCE----	KGVCICRXX
-----------------------	------------	---------	-------------	---------------	-----------

Дефенсини жуков
(отряд Coleoptera)

<i>Zophobas atratus</i>	FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAECLAL-	GRR-GGYCN-	---	RSVCVCR
<i>Zophobas atratus</i>	FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAECLAL-	GRT-GGYCN-	---	RVCVCR
<i>Allomyrina dichotoma</i>	VTCDDLSFEAKGFAANHSCLAANCLAI-	GRR-GGYCN-	---	GVCICR
<i>Tenebrio molitor</i>	VTCDILSVEAKGVKLNDAACAANCLFR-	GRS-GGYCN-	---	KRVVCR

Дефенсини полужесткокрылых
(отряд Hemiptera)

<i>Pyrrhocoris apterus</i>	ATCDILSFQSQWVTPNHAGCALRCVIK-	GyK-GGCKI----	TVCHCRR
<i>Palomena prasina</i>	ATCDALSFSSKWLTVNHSACAIHCLFK-	GyK-GGCKV-----	TICNCRN

Дефенсини стрекозы
(отряд Odonata)

<i>Aeschna cyanea</i>	GFGCP-L-----	DQMQRHRCQTITGRS-	GGYCN-	SGPLKLTCTCYR
-----------------------	--------------	------------------	--------	--------------

Рис. 7. Первичные структуры дефенсинов насекомых.

Жирным шрифтом отмечены консервативные аминокислотные остатки.
X - С-концевая часть роялизина: TSFKDLWDKYF.

(MCP-1) из псевдозоиофилов и альвеолярных макрофагов кролика (рис. 6) (Lambert et al., 1989).

В дальнейшем выяснилось, что эта гомология носит случайный характер и, как правило, не свойственна пептидам, принадлежащим к семейству дефенсинов насекомых, которых сейчас уже известно более десятка. В частности, из представителей отряда двукрылых (Diptera) кроме формицинов и сапединов были выделены и секвенированы дефенсины из мухи-пчеловидки *Eristalis tenax* (Hoffmann, Hetru, 1992), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Dimarcq et al., 1994), комара *Aedes aegypti* (Lowenberger et al., 1995); из отряда жесткокрылых, или жуков (Coleoptera), — из *Zophobas atratus* (Bulet et al., 1991), *Tenebrio molitor* (Moon et al., 1994), *Allomyrina dichotoma* (Miyanooshita et al., 1996); из отряда полужесткокрылых (Hemiptera) — из бескрылого красного клопа *Pyrrhocoris apterus* (Cociancich et al., 1994b), зеленого древесного клопа *Palomena prasina* (Chernysh et al., 1996); из отряда перепончатокрылых (Hymenoptera) — из медоносной пчелы *Apis mellifera* (Fujiwara et al., 1990; Casteels-Josson et al., 1994) и шмеля (Rees et al., 1997); из отряда Odonata таким представителем является стрекоза *Aeschna cyanea* (Bulet et al., 1992).

Первичная структура большинства представителей дефенсинов насекомых характеризуется заметной гомологией на всех участках молекул (рис. 7). Несколько особняком в сравниваемом ряду гомологичных пептидов стоит структура дефенсина из стрекозы *Aeschna cyanea* — представителя одного из наиболее эволюционно древних отрядов насекомых (Odonata). Однако среди дефенсинов, выделенных из гемолимфы представителей «молодых» отрядов, также встречаются исключения, как в случае сапедина В из серой мясной мухи *Sarcophaga peregrina*. Дефенсины насекомых являются катионными (основными) молекулами, состоящими из 38—43 аминокислотных остатков. Исключение из этого правила составляют 2 пептида: — сапедин В (34 аминокислоты) и роялизин (51 аминокислота). Последний выделен как из маточного молочка пчел (откуда и получил свое экзотическое название), так и гемолимфы взрослого животного (имаго). Для всех дефенсинов насекомых характерно присутствие 6 консервативно расположенных (инвариантных) цистеиновых остатков, образующих стереотипно 3 внутримолекулярных дисульфидных мостика (1—4, 2—5, 3—6) (Hoffman, Hetru, 1992). Изучение надпервичной структуры формицина А методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) выявило в его молекуле 3 различно организованных участка в пептидной цепи: гибкий и малоупорядоченный N-концевой, включающий аминокислотные остатки от 1-го до 13-го, центральный (от 14-й до 24-й аминокислоты), представленный амфипатической α-спиралью, и третий — С-концевой, являющийся β-слоем, сформированным 2 антипараллельными β-тяжами, которые связаны β-изгибом (Vopnatin et al., 1992). Дисульфидные мостики являются фактором, стабилизирующим вторичные структуры пептидов и поддерживающим их третичную (глобулярную) структуру, которая необходима для максимальной реализации антимикробных свойств дефенсиновой молекулы. На основании сравнения первичных структур дефенсинов насекомых (рис. 7) можно допустить, что для большинства из них характерна подобная надпервичная структура, подтвержденная экспериментально, однако, только в случае сапединов (Hanzava et al., 1990). Она отлична от вторичной структуры α- и β-дефенсинов (Pardi et al., 1988), которая представлена 3 антипараллельными β-тяжами. Отличная от α- и β-дефенсинов аранжировка дисульфидных связей дефенсинов насекомых наряду с особенностями их первичной и вторичной структур определяет различия третичных структур рассматриваемых пептидов. У дефенсинов насекомых она ближе к трехмерной структуре пептидного нейротоксина из яда скорпиона — харибдотоксина, который является ингибитором K⁺-каналов (Bontems et al., 1991). В связи с этим, по-видимому, не случайным является факт обнаружения у сапедина В (дефенсина из гемолимфы мясной мухи *Sarcophaga peregrina*) способности ингибировать K⁺-каналы в клетках Пуркиньи из мозжечка крысы (Lee et al., 1995).

Различия в структурах дефенсинов насекомых, с одной стороны, и α- и β-дефенсинов — с другой, ответственны, по всей видимости, за особенности их антимикробной активности. Так, если дефенсины

млекопитающих и птиц являются универсальными антибиотическими пептидами, инактивирующими грамположительные и грамотрицательные бактерии, низшие грибы и оболочечные вирусы, то этого нельзя сказать о дефенсинах насекомых, последние действуют преимущественно только на грамположительные бактерии. Необходимы на 1—2 порядка большие концентрации для проявления антимикробной активности дефенсинов насекомых в отношении грамотрицательных бактерий и еще более значительные — в случае воздействия на грибки. Ограниченная функциональная активность дефенсинов насекомых в отношении отдельных групп микробов компенсируется на уровне организма продукцией других антибиотических пептидов, таких как цекропины (*cecropins*) (Steiner et al., 1981; Voman, 1995), апидацины (Casteels et al., 1989), дрозозин (Bulet et al., 1993), металниковины (Chernysh et al., 1996), которые эффективно инактивируют грамотрицательные бактерии, и дрозомидин, направленно действующий на грибки (Fehlbaum et al., 1994).

Клонирование генов, ответственных за синтез дефенсинов мясных мух, и анализ продуктов их транскрипции свидетельствуют о том, что дефенсины насекомых, как и α - и β -дефенсины, синтезируются в пре-проформе (рис. 8).

Изучение механизмов антимикробного действия дефенсинов насекомых (Cociancich et al., 1993a) выявило в принципе все те же закономерности проявления их активности, которые были установлены для α - и β -дефенсинов (Lehrer et al., 1993; Selsted, 1993). Основной мишенью их поражающего действия на бактерии является цитоплазматическая мембрана. Перфорируя плазмалемму бактерий, дефенсины насекомых нарушают структурную целостность клетки, ее ионный гомеостаз, вызывают частичную деполаризацию мембраны и уменьшение концентрации цитоплазматического аденозинтрифосфата (АТФ) вследствие ингибирования окислительного фосфорилирования. Остается, однако, не совсем ясным вопрос, почему при столь общих проявлениях воздействия на цитоплазматическую мембрану дефенсины насекомых по сравнению с дефенсинами млекопитающих и птиц характеризуются столь слабой антимикробной активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Может быть, фактором, ограничивающим антимикробную активность дефенсинов насекомых в отношении грамотрицательных бактерий, является наружная мембрана последних, которая слабо проницаема именно для рассматриваемого типа пептидных молекул.

	Сигнальная часть и прочаясть		
Формицин А	MKFFMVVVTFCLAVCFVVSQSLAIPADAANDAHFVDGVQALKEIEPELHGRYKRA	54	
Сапещин А	MKSFIVLAVTLCLAAFFMGQSVASPAAAAEESEKFDVGLHALKTIPELHGRYKRA	54	
	Зрелый (основной) пептид		
	1 2 3 4 5 6		
Формицин А	ATCDLLSGTGINHSACAANCLLRNRRGGYCNKGVCVCRN	94	
Сапещин А	ATCDLLSGTGINHSACAANCLLRNRRGGYCNKAVCVCRN	94	

Рис. 8. Первичные структуры препродефенсинов насекомых.

У большинства изученных видов насекомых содержание антимикробных пептидов в гемолимфе находится на фоновом уровне. Это касается и присутствия таких пептидов, как цекропины (саркотоксины) и дефенсины насекомых (формицин, сапещин и др.). Синтез дефенсинов у насекомых, как и большинства других антибиотических пептидов, носит преимущественно индуцибельный характер (Hoffmann, Netru, 1992; Hoffmann, Reichhart, 1997). Попадание бактерий и грибов, а также липополисахаридов и продуктов их метаболизма во внутреннюю среду животных инициирует защитный процесс продукции жировым телом насекомых (функциональный аналог печени позвоночных) широкого спектра антимикробных пептидов, секретируемых в гемолимфу. Меньший вклад в биосинтез этих пептидов вносят гемоциты и другие клеточно-тканевые структуры организма (перикардальные клетки, мальпигиевы клубочки, клетки кишечника насекомых). Антимикробные пептиды продуцируются также эпидермальными клетками в ответ на повреждение или инфицирование кутикулы насекомых (Brey et al., 1993). В этом наблюдается существенное сходство данного процесса с биосинтезом и продукцией β -дефенсинов эпителием трахеи крупного рогатого скота (Diamond et al., 1993, 1996). Более того, существует удивительное совпадение ряда молекулярно-генетических процессов в эпителиях у насекомого и млекопитающего, выражающееся в вовлечении в индуктивный синтез пептидов сходных генетических структур и, в частности, так называемых κ B-подобных промоторных участков генов, которые ответственны за синтез антибиотических пептидов у столь эволюционно удаленных видов животных. Необходимо, однако, отметить, что если для насекомых подобный индуцибельный характер биосинтеза антибиотических пептидов является правилом, то для млекопитающих феномен индуцибельного синтеза β -дефенсинов в эпителии трахеи и кератиноцитах кожи человека (Harder et al., 1997) — это пока, скорее всего, исключение. Для высших животных свойствен конститутивный синтез лейкоцитарных и эпителиальных антимикробных пептидов и белков только на определенной стадии их клеточного развития, с последующей упаковкой этих защитных соединений в гранулы на уровне аппарата Гольджи и сохранения их в соответствующих клетках в преформированном, но уже, как правило, готовом для функционирования состоянии. Повреждения, инициирующие фагоцитоз или воспалительную реакцию, запускают процесс мобилизации депонированных в виде предшественников антибиотических пептидов и белков.

Контроль активности иммунных генов насекомых сходен с таковым генов иммуноглобулинов и острофазовых белков позвоночных. Они имеют в промоторной области генов энхансерные последовательности, получившие наименование κ B-мотивов, поскольку первые были обнаружены в структуре генов, ответственных за синтез κ -цепи иммуноглобулинов млекопитающих (Nolan, Baltimore, 1992). κ B-Мотив является элементом гена, с которым избирательно связывается регуляторный транскрипционный фактор NF κ B, обычно находя-

щийся в цитоплазме в связанном с ингибитором (IkB) состоянии. Воздействия на организм, запускающие иммунный ответ или воспалительный процесс, приводят к распаду функционально неактивного комплекса NFκB/IκB, освобождению NFκB и его транслокации в ядро, где он взаимодействует с соответствующей промоторной областью генов острофазовых белков и иммуноглобулинов, активируя транскрипционный процесс. Для дефенсинов млекопитающих подобный механизм регуляции активности их генов описан пока только для дефенсина трахеи крупного рогатого скота, в то время как для процессов регуляции биосинтеза миелоидных и энтеральных дефенсинов свойственны другие закономерности.

В настоящее время описана структура нескольких генов, ответственных за кодирование индуцибельных антибактериальных пептидов у *Drosophila melanogaster* (Meister et al., 1994), *Hyalophora cecropia* и *Sarcophaga peregrina* (Hultmark, 1993). Как правило, это — «молчащие» гены в условиях, когда отсутствуют клетки и вещества, инициирующие иммунный ответ. Активация таких генов при повреждении кутикулы или инфицировании насекомых происходит в течение получаса. Пик транскрипции наблюдается в течение 12—48 ч и зависит от характера и природы факторов, инициирующих иммунную реакцию. Некоторые из этих генов содержат небольшие интроны, хотя большинство генов не включают в свою структуру таковых. Как правило, антибиотические пептиды синтезируются в форме больших молекул, состоящих из 3 частей: сигнальной (пречаст), прочаст и конечного зрелого пептида.

Проксимальная (5'-концевая) область данных генов содержит несколько последовательностей, имеющих структурную гомологию с цисрегуляторными элементами промоторов генов, ответственных за синтез острофазовых белков у млекопитающих (Hoffman et al., 1993; Hultmark, 1993; Georgel et al., 1993). Чаще всего в таких структурах идентифицируется κB-родственный элемент. Его существование у насекомых доказано и генетическими методами. В качестве дополнительных регуляторных элементов проксимальной области промотора выступают последовательности ДНК, гомологичные элементам млекопитающих, ответственных за реагирование к IL-6 и γ-интерферону. Из клеток *Hyalophora cecropia* были выделены белки, относящиеся к Rel/NF-κB-семейству, которые избирательно связываются с соответствующей областью промотора при инициации иммунного ответа у насекомых. Это, в частности, так называемый фактор, ответственный за иммунную реакцию у цекропии (*Cecropia immune-responsiveness factor* (Cif); Sun, Faye, 1992a, 1992b). У дрозофилы он носит название Dif (*dorsal-related immunity factor*) и связывается специфически с промоторами генов, ответственных за синтез антибиотических пептидов (Ip et al., 1993; Reichhart et al., 1993). В условиях инициации иммунного ответа Dif переносится из цитоплазмы в ядро и запускает процессы активации соответствующих генов (например, цекропина и диптерицина). Как правило, эти процессы протекают в клетках жирового тела, эпителия кутикулы и гемоцитах насекомых (*Hyalophora*

cecropia, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*) (Boman, 1994; Hoffmann, 1995).

Выявленное сходство в механизмах регуляции генов насекомых, ответственных за синтез индуцибельных антибиотических пептидов (дефенсинов, цекропинов и др.), и генов млекопитающих, определяющих структуру острофазовых белков и β-дефенсина эпителия трахеи, свидетельствует о существовании ряда единых принципов молекулярной организации и регуляции генов в процессе эволюции животного мира.

1.3.2. ДЕФЕНСИНЫ СКОРПИОНОВ

Скорпионы принадлежат к тому же типу членистоногих (Arthropoda), что и класс насекомых (Insecta). Они по одной из классификаций составляют подкласс Scorpiones (скорпионы) в составе класса Arachnida (паукообразные), входящего в подтип Chelicerata (хелицеровые) (Хадорн, Венер, 1989). Поэтому с позиции сравнительной биохимии представляет интерес оценка структурной гомологии антибиотических пептидов из гемолимфы скорпионов и о эволюционно близких им насекомых. В настоящее время выделены и секвенированы дефенсины из гемолимфы 2 видов скорпионов: *Leiurus quinquestriatus* (Cociancich et al., 1993b) и *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996), которые имеют максимальную степень структурной гомологии с дефенсинами из гемолимфы стрекозы *Aeschna cyanea*, представителя наиболее архаичного, а следовательно, и наиболее близкого скорпионам по эволюционному происхождению отряда насекомых (рис. 9).

1.3.3. ДЕФЕНСИНЫ МЕЧЕХВОСТОВ

Мечехвосты относятся к подклассу Xiphosura (мечехвосты) класса меростомовых (Merostomata) подтипа хелицеровые (Chelicerata), входящего в тип членистоногих (Arthropoda). Это одна из древнейших, сохранившихся до наших дней группа членистоногих животных, а потому естественным представляется интерес к факту обнаружения в ге-

Дефенсин стрекозы

Aeschna cyanea GFGCPLDQHCRRRCQTITGRSQQYCSGPKLKTCTCYR

Дефенсины скорпионов

Androctonus australis GFGCFPNQGACHRRCRSIRRR-GGYCCAGLFKQTCTCYR
Leiurus quinquestriatus GFGCPLNQGACHRRCRSIRRR-GGYCCAGFFKQTCTCYRN

Дефенсин А мидии

Mytilus edulis GFGCF-NDYPCRRRCKSI PGRXGGYCGGHRLRCTCYR

Рис. 9. Сравнение первичной структуры дефенсинов, относящихся к классу насекомых (стрекоза), классу паукообразных (скорпионы) и классу пластинчатожаберных, или двустворчатых (моллюсков) (мидия).

моцитах японского подковообразного краба (*Tachypleus tridentatus*) пептидов, подобных дефенсинам (Saito et al., 1995):

¹NPLIPAIYIGATVGPVSWAYLVVALVGAADVTAANIRRASS⁴⁰

⁴¹DNHSCAGNRGWCRSKCFRHEVVDTYYSAVCGRYFCCRSR⁷⁹

Этот пептид получил название «большой дефенсин», так как он состоит из 79 аминокислотных остатков, 37 из которых в С-концевой области имеет сходство по последовательности и наличию 3 дисульфидных мостиков с дефенсином RtNP-2 из нейтрофилов крысы (Eisenhauer et al., 1989). Молекула пептида состоит из 2 больших функциональных блоков: N-концевого слабоосновного гидрофобного из 42 аминокислот и С-концевого, имеющего черты структурного сходства с миелоидным дефенсином крысы (RtNP-2) по первичной структуре, а по аранжировке дисульфидных мостиков аналогичного β-дефенсинам из нейтрофилов коров. Таким образом, рассматриваемый дефенсин по своим структурно-функциональным свойствам выпадает из круга семейства дефенсинов насекомых, характерных для ряда видов насекомых, скорпионов и моллюсков.

1.3.4. ДЕФЕНСИНЫ МОЛЛЮСКОВ

Моллюски являются вторым крупным типом первичноротых беспозвоночных, отдельные представители которого достигли в процессе эволюции высокого уровня морфофункционального развития. Более 545 млн лет тому назад, в геологический период кембрия, 2 основных, наиболее развитых типа беспозвоночных — членистоногие и моллюски — разошлись в своем магистральном эволюционном развитии. Общие морфогенетические корни рассматриваемых типов предполагают наличие у ряда их представителей сходных молекул, обеспечивающих процессы развития и иммунитета. В совместном российско-французском проекте были выделены и изучены антимикробные пептиды из гемолимфы мидии *Mytilus edulis*, представителя класса пластинчатожабренных, или двустворчатых моллюсков (Lamellibranchiata, или Bivalvia). Среди нескольких групп пептидов были охарактеризованы и представители дефенсинов (Charlet et al., 1996) (см. рис. 9). По своей первичной структуре они оказались молекулами, максимально гомологичными дефенсинам стрекозы *Aeschna cyanea* (Bulet et al., 1992) и 2 видов скорпионов — *Leiurus quenequestriatis* (Cocianigh et al., 1993) и *Androctonus australis* (Ehred-Sabatier et al., 1996).

По заключению исследователей, структурная гомология дефенсинов, выделенных из гемолимфы представителей двух типов, может свидетельствовать об их происхождении от общего молекулярно-генетического предшественника. Интересно, что у мидии, как и у скорпионов, дефенсины присутствуют в гемолимфе конститутивно, независимо от факторов микробной природы и повреждений, ведущих к воспалительной реакции и индуктивно повышающих продукцию де-

фенсинов в организме насекомых. В связи с этим фактом представляет интерес выяснение различий в молекулярно-генетических основах биосинтеза дефенсинов у насекомых, с одной стороны, и скорпионов и моллюсков — с другой.

1.4. АМЕБОПОРЫ — АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПРОСТЕЙШИХ

Данные о присутствии антибиотических пептидов у одноклеточных животных (простейших) единичны. В 1991 г. немецкими исследователями впервые из клеток амебы *Entamoeba histolytica* — паразитического простейшего, вызывающего дизентерию у некоторых млекопитающих, — были выделены пептиды с цитотоксической активностью, структура которых имеет черты структурного сходства с дефенсинами (Leippe et al., 1991, 1994). Эти пептиды были названы амебопорами благодаря тому, что они обладают способностью образовывать поры в искусственных мембранах. Амебопоры являются основными полипептидами с молекулярной массой около 8 кДа, α-спиральная вторичная структура которых стабилизирована 3 дисульфидными связями. Первичная структура амебопора А (GEILCNLCTGLINTLE-NLLTTKGADKVKDYISSLCNKASGFATLCTKVLDFGIDKLIQLIE-DKVDANAICAKIHAC) не позволяет отнести этот пептид к дефенсиновому суперсемейству пептидов, несмотря на наличие у них ряда общих структурно-функциональных свойств (основность молекулы, наличие 3 дисульфидных мостиков). Однако оказалось, что структура амебопоров гомологична NK-лизину — пептиду, выделенному из слизистой кишечника свиньи: QYFCESCRKIPQKLEDMVGPQPNEDTV-TQAASQVCDKILRGLCKKIMRSFLRRISWDILTQKKPQAICVDI-KICKE (Andersson et al., 1995), который оказался локализованным в NK-клетках и цитотоксических Т-лимфоцитах. Таким образом, это первое свидетельство обнаружения гомологичных пептидов у видов животных, находящихся на противоположных полюсах эволюционного древа (Leippe, 1995).

1.5. ПРОТЕГРИНЫ И РОДСТВЕННЫЕ ИМ ПЕПТИДЫ

Лизосомные катионные белки нейтрофилов (Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a, 1966b), позднее названные дефенсинами (Ganz et al., 1985; Lehrer et al., 1991a), являются антимикробными молекулами, в значительной степени определяющими защитную направленность фагоцитарного процесса. Обладая широким спектром антимикробного действия, они обеспечивают эффективность киллерной фазы (стадии) процесса. Именно этим обстоятельством был обусловлен выбор нами такого объекта исследования, как нейтрофилы свиньи, поскольку в литературе отсутствовали сведения о дефенсиноподобных полипептидах из лейкоцитов этого вида животных.

Визуальное сравнение электрофореграмм кислоторастворимых белков нейтрофилов свиньи и кролика однозначно свидетельствовало

о присутствии в спектре первых полипептидов, электрофоретически сходных с дефенсинами. Фракционирование ультрафильтраата кислотного экстракта через УМ-5 на биогеле Р-10 позволило получить разнообразный спектр антимикробных соединений, среди которых нас заинтересовали в первую очередь 3 низкомолекулярных полипептида, которые инактивировали в условиях *in vitro* 3 тест-микроба: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* и *Candida albicans*.

Антимикробные полипептиды лейкоцитов свиньи далее были разделены на 3 индивидуальных компонента высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Vydac C18. Это было подтверждено нами электрофорезом в среде с додецилсульфатом натрия и масс-спектрометрически К. Swiderek и Т. D. Lee из Бекмановского научно-исследовательского института (Дуарте, Калифорния). Аминокислотный анализ очищенных полипептидов однозначно свидетельствует об определенном сходстве этих соединений с дефенсинами: они богаты аминокислотами, аргинином (27—33 мол%) и цистеином (21—25 мол%). Однако их молекулярные массы (~2 кДа) в 1.5—2 раза меньше таковых дефенсинов и близки к молекулярной массе антимикробного полипептида из гемоцитов подковообразного краба — тахиплезина (Nakamura et al., 1988).

Первичная структура полипептидов, названных по предложению проф. Р. Лерера протегринами (*protegrins* от лат. *protegere*, т. е. *защищать, прикрывать*), была установлена нами совместно с американскими исследователями из Калифорнийского университета в Лос-Анджелесе методом автоматической деградации белков по Эдману на установке Porton Model 2090 (рис. 10). Очевидна принадлежность 3 выделенных компонентов к одной группе веществ: протегрин PG-1 (наиболее подвижный в кислой электрофоретической среде компонент) и PG-3 (наименее подвижный при электрофорезе компонент) содержат по 18 аминокислотных остатков и практически идентичны, за исключением 4-го остатка, который в молекуле первого представлен аргинином, а второго — глицином. Протегрин PG-2 короче PG-1 на 2 аминокислотных остатка и в 14-м положении содержит изолейцин вместо валина. Четыре остатка цистеина образуют 2 дисульфидных мостика, поскольку свободные SH-группы не определяются в пептидах реагентом Эллимана (Кокряков et al., 1993).

Структура протегринов (рис. 10) характеризуется наличием одного блока из 3 остатков аргинина, а также двумя дисульфидными связями, формирующими классическую структуру типа антипараллельной β-спиральки (двухтяжевой антипараллельный β-слой). Эта структура

HNP-1	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQRLWAFCC
PG-1	RGGRLCYRRRFCVCGR*
PG-2	RGGRLCYRRRFCICV*
PG-3	RGGRLCYRRRFCVCGR*
NP-3a	GICACRRRFC.PNSERFSGYCRVNGARYVRCSSRR

Рис. 10. Первичная структура протегринов свиньи (PG-1, PG-2, PG-3) в сравнении со структурами дефенсинов человека (HNP-1) и кролика (NP-3a).

Звездочкой помечены амидированные С-концевые аминокислоты.

была подтверждена ЯМР-спектроскопическим исследованием растворов пептида PG-1 (Fahrner et al., 1996). Тяжи в β-слое соединены β-изгибом. Было выделено из лейкоцитов свиньи 3 пептида (PG-1, PG-2, PG-3), и структура еще двух (PG-4, PG-5) (Zhao et al., 1994, 1995) установлена в ходе клонирования и секвенирования структуры их генов.

Сравнение первичной структуры протегринов со структурами дефенсинов кролика, человека и тахиплезина выявляет заметное сходство отдельных участков молекул свиных полипептидов с кроличьими. Максимальная степень структурной гомологии выявлена между протегрином PG-3 (G₄LCICRRRFC₁₃) и кроличьим дефенсином NP-3a (G₁ICACRRRFC₁₀), известным в литературе также как кортикостатин-1 (CS-1) (Zhu et al., 1988). Это дает основание предположить наличие у них сходных функциональных свойств.

В условиях *in vitro* протегрины проявляют активность в отношении широкого спектра микроорганизмов: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (Kokryakov et al., 1993), *Nesseria gonorrhoeae* (Qu et al., 1996), *Chlamydia trachomatis* (Yasin et al., 1996), *Mycobacterium tuberculosis* (Miykawa et al., 1996), вирусов иммунодефицита человека (Tamamura et al., 1995). Антимикробная активность PG-1 сопоставима с таковой дефенсина кролика NP-1 (Kokryakov et al., 1993). Вследствие меньшей молекулярной массы протегринов по сравнению с дефенсинами первые являются перспективным объектом для химического синтеза и фармакологических исследований.

Третичная структура протегрина PG-1 сходна с таковой тахиплезина-1 и полифемузина — антибиотических пептидов из гемоцитов подковообразных крабов *Tachypleus tridentatus* (Nakamura et al., 1988) и *Limulus polyphemus* (Miyata et al., 1989), которые являются представителями древней группы беспозвоночных животных, относящихся к подклассу Xiphosura (мечехвосты) класса Merostomata (меростомовые) подтипа Chelicerata (хелицеровые) типа Arthropoda (членистоногие). Причем структурная гомология сравниваемых пептидов на уровне аминокислотной последовательности относительна, так как расположение 4 цистеинов, образующих 2 внутримолекулярных дисульфидных мостика, и большинства сходных аминокислотных остатков у сравниваемых пептидов (протегрины, тахиплезины, полифемузины) различно (рис. 11). В то же самое время аранжировка их

PG-1	RGGRLCYRRRFCVCGR
PG-2	RGGRLCYRRRFCICV
PG-3	RGGRLCYRRRFCVCGR
PG-4	RGGRLCYCRGWICFCVGR
PG-5	RGGRLCYCRPRFCVCGR
T-I	K-WC--FRVC-YRGICVRRCR
T-II	R-WC--FRVC-YRGICVRRCR
T-III	K-WC--FRVC-YRGICVRRCR
P-I	RRWC--FRVC-YRGFCVRRCR
P-II	RRWC--FRVC-YKGFVRRCR
A	RSVCRQIKICRRRGGCYUKCTNRPY

Рис. 11. Первичная структура протегринов (PG), тахиплезинов (Т), полифемузинов (Р) и андроктоина (А) из гемолимфы скорпиона.

S—S-связей и общая третичная структура (классическая β -шпилька, образованная двумя антипараллельными β -тяжами) у них идентичны (Fahrner et al., 1996; Tamamura et al., 1993). Пептид, более гомологичный по первичной структуре тахиплезину, был выделен и секвенирован из гемолимфы скорпиона *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996) (рис. 11).

Общность ряда структурных и функциональных свойств дефенсинов и протегринов ставит вопрос о природе установленного подобия. Относится ли оно к гомологии, т. е. объясняется дивергентной эволюцией от общего предшественника, или к аналогии, т. е. возникло в результате конвергентной эволюции к структуре, обеспечивающей реализацию важных биологических функций (Шульц, Ширмер, 1982)? Дефенсины синтезируются в клетке в форме препродефенсина, состоящего из сигнального гидрофобного пептида и анионного пропептида, отщепляющихся в аппарате Гольджи от конечной молекулы при ее упаковке в азурофильные гранулы (Michaelson et al., 1992). Протегрины же синтезируются в виде молекулы-предшественницы (Storici, Zanetti, 1993a, 1993b; Zhao et al., 1994), основной N-концевой частью которой является белок, относящийся к группе ингибиторов катепсина L (кателин) (Ritonja et al., 1989). Принципиальное отличие в организации генов, ответственных за синтез дефенсинов и протегринов, свидетельствует, скорее всего, в пользу конвергентного варианта происхождения структурного подобия сравниваемых пептидов. Однако нельзя исключить, что формирование генов протегринов произошло в ходе хромосомных перестроек по типу межхромосомной транслокации гена дефенсина с утратой части его генетического материала. Окончательное решение этого вопроса остается предметом дальнейших исследований.

1.6. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С ОДНОЙ ДИСУЛЬФИДНОЙ СВЯЗЬЮ

Из лейкоцитов крови крупного рогатого скота еще в 1988 г. был выделен основной пептид из 12 аминокислотных остатков (додекапептид) с одной дисульфидной связью: RLCRIVVIRVCR (Romeo et al., 1988). Коммерческое название химически синтезированного, структурно идентичного пептида носит название бактенецин. Структурно бактенецин ничего общего не имеет с 2 пептидами Вас5 и Вас7, также выделенными из нейтрофилов крупного рогатого скота (Frank et al., 1990), которые будут рассмотрены в разделе 1.10, так же как и с семейством антимикробных пептидов из кожи разных видов лягушек. Последние, как и бактенецин, являются пептидами с одной дисульфидной связью, образующей небольшой цикл из 7 аминокислотных остатков в C-концевом участке молекулы (рис. 12). В настоящее время описаны 3 основные подгруппы этого семейства: бревинины-1, бревинины-2 и эскулентины. Основным источником пептидов является кожа лягушек *Rana brevipoda* (Morikawa et al., 1992), *Rana esculenta* (Simmaco et al., 1993, 1994) и *Rana pipiens* (Horikawa et al., 1985).

Наименование пептидов

Бревинин-1
Бревинин-1E
Бревинин-1Ea
Бревинин-1Eb
Бревинин-1Ec
Раналексин
Пипинин I
Пипинин II
Пипинин III

Бревинин-2
Бревинин-2E
Бревинин-2Ea
Бревинин-2Eb
Бревинин-2Ec
Бревинин-2Ed
Бревинин-2Ee
Бревинин-2Ef

Эскулентин-1
Эскулентин-1a
Эскулентин-1b
Эскулентин-2a
Эскулентин-2b

Структура пептидов

FLPVLAGIAAKVVPALFCKITKRC
FLPLLGLAANFLPKIFCKITRKC
FLPAIFRMAAKVVPITICSITKRC
VIPFVASVAEEMMHVYCAASRKC
FLPLLGLAANFPKIFCKITRKC
FFGGLIKIVPAMIPKIFCKITRKC
FLPIIAGVAAKVFPKIFCAISKRC
FLPIIAGIAAKVFPKIFCAISKRC
FLPIIASVAAKVFSKIFCAISKRC

G-LLDSLKGFARTAGKGVLSLLSTASCCKLAKTC
G-IMDTLKNLAKTAGKGLQSLNKNASCCKLSGQC
G-ILDTLKLNIAISAAGKGAQGLVNKASCCKLSGQC
G-ILDTLKNLAKTAGKGLQGLVKNASCCKLSGQC
GILLDKLNKFAKTAGKGVLSLLNTASCCKLSGQC
G-ILDSLKNLAKNAG---QILNKNASCCKLSGQC
G-IFDKLNKFAKGA---QSLNKNASCCKLSGQC
G-IMDTLKNLAKTAGKGLQSLVKNASCCKLSGQC

GIFSKLGRKKIKNLLISGLKNVGEVGMDDVVRTGIDTAGCKIKGEC
GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNVGEVGMDDVVRTGIDTAGCKIKGEC
GIFSKLAGKKIKNLLISGLKNVGEVGMDDVVRTGIDTAGCKIKGEC
GILSLVKGVAKLAGKGLAKEGGKFGLELITACKIARQC
GIFSLVKGAAGKLAGKGLAKEGGKFGLELITACKIARQC

Рис. 12. Первичные структуры антимикробных пептидов из кожи лягушек *Rana brevipoda* (бревинины), *Rana esculenta* (эскулентины), *Rana catesbeiana* (раналексин) и *Rana pipiens* (пипинины).

Структурно эти антимикробные пептиды отличаются от магейнинов, которые впервые выделены из кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Zaslhoff, 1987) и не содержат цистеина, но являются сильными антибиотическими веществами (раздел 1.9).

1.7. ЦИСТЕИНСОДЕРЖАЩИЕ ПЕПТИДЫ С БОЛЬШИМ ЧИСЛОМ S—S-СВЯЗЕЙ

Цистеинсодержащие антимикробные пептиды с более чем 3 дисульфидными связями описаны у животных, принадлежащих к разным таксономическим группам. Они, как правило, не образуют структурно-родственных семейств, но их роль в обеспечении врожденного иммунитета к инфекции в ряде случаев, по-видимому, значима.

Антимикробный пептид с 4 дисульфидными связями (ENAP-2) был выделен из нейтрофилов лошади, в которых отсутствуют характерные для других видов млекопитающих дефенсины (Couto et al., 1992a, 1992b). Наряду с антибактериальной активностью он в условиях *in vitro* проявляет избирательное ингибирование микробных сериновых протеиназ (Couto et al., 1993).

Из полостной жидкости свиной аскариды *Ascaris suum* (подтип Nematodes, тип круглые черви — Nematelminthes) выделен, очищен и частично секвенирован антимикробный пептид с 4 дисульфидными связями, полная структура которого выведена из нуклеотидной последовательности его клонированного гена (Kato, Komatsu, 1996): AVDFSSCARDVPLSKVAQGLCISCKFQNCGTGHCEKRGGRP-

TCVCDR CGRGGGEWPSVPHPKGRSSRG. Компьютерный анализ выявил некоторое структурное сходство этого пептида в области, ограниченной цистеинами, с дефенсином жука *Tenebrio molitor* (Moon et al., 1994).

В гемолимфе мидии *Mytilus edulis* наряду с дефенсином также обнаружены высокоосновные пептиды (митилины) с антимикробной активностью, которые имеют в своей структуре 4 дисульфидные связи (Charlet et al., 1996):

Mytilin A: GCASRCKAKCAGRCKGWSASFRGRCYCKCFRC,
Mytilin B: SCASRCKGHCRRARRCGYVSVLYRGRCYCKCLRC.

Это только отдельные примеры обстоятельно изученных структур антибиотических пептидов с 4 дисульфидными связями, которые свидетельствуют о распространенности подобных соединений у представителей различных групп животных. В литературе известны пептиды и с большим числом S—S-связей, в частности антимикробный пептид тахитин из гемоцитов мечехвоста *Tachypleus tridentatus* (Kawabata et al., 1996). Однако о широкой распространенности подобных соединений в природе говорить пока преждевременно.

1.8. ЦЕКРОПИНЫ

Изучение молекулярных основ естественного иммунитета у некоторых групп насекомых (Voman, Hultmark, 1987) привело к открытию шведскими исследователями катионных антимикробных пептидов, получивших название цекропины (сестропины) (Hultmark et al., 1980). Цекропины впервые были выделены из гемолимфы куколок гигантского шелкопряда *Hyalophora cecropia* и вскоре была определена их первичная структура (Steiner et al., 1981). В дальнейшем гомологичные пептиды были выделены и охарактеризованы из гемолимфы китайского дубового шелкопряда *Antheraea pernyi* (Qu et al., 1982), серой мясной мухи *Sarcophaga peregrina* (Matsumoto et al., 1986), тутового шелкопряда *Bombyx mori* (Teshima et al., 1986; Morishima et al., 1990), бражника *Manduca sexta* (Dickinson et al., 1988). Ген, ответственный за синтез пептида цекропиновой природы, идентифицирован в геноме у плодовой мушки *Drosophila melanogaster* и секвенирован (Kylsten et al., 1990). Структура многих известных в настоящее время цекропинов характеризуется рядом общих закономерностей (рис. 13). Молекула цекропина может быть условно разделена на полярный положительно заряженный N-концевой участок, переходящий в преимущественно гидрофобный срединный отрезок, соединяемый пролином или (и) глицином с C-концевой последовательностью. Все C-концевые аминокислоты известных цекропинов насекомых амидированы. Структурно-функциональная значимость амидирования остается до конца пока непонятной, хотя известно, что подобная модификация защищает белково-пептидные молекулы от действия карбокси-пептидаз. Вторичная структура цекропина А представляет собой

Цекропины из чешуекрылых насекомых

Наименование пептида (видовой источник)	Первичная структура пептида
Цекропин D (<i>Hyalophora cecropia</i>)	W--NPFKEL EKVGQRVRDA VISAGPAVAT VAQATALAK*
Цекропин D (<i>Antheraea pernyi</i>)	W--NPFKEL ERAGQRVRDA IISAGPAVAT VAQATALAK*
Цекропин B-2 (<i>Manduca sexta</i>)	W--NPFKEL ERAGQRVRDA VISAAPAVAT VGQAAIAR*
Цекропин B-3 (<i>Manduca sexta</i>)	W--NPFKEL ERAGQRVRDA IISAGPAVAT VGQAAIAR*
Цекропин B-4 (<i>Manduca sexta</i>)	W--NPFKEL ERAGQRVRDA IISAAPAVAT VGQAAIAR*
Цекропин А (<i>Hyalophora cecropia</i>)	KW--KLFKKI EKVGQNIIRDG IIKAGPAVAV VGQATQIAK*
Цекропин В (<i>Hyalophora cecropia</i>)	KW--KVFKKI EKMGRNIIRDG IVKAGPAIAV LGEAKAL*
Цекропин В (<i>Antheraea pernyi</i>)	KW--KIFKKI EKVGRIIRDG IIKAGPAVAV LGEAKAL*
Цекропин А (<i>Bombyx mori</i>)	RW--KLFKKI EKVGRIIRDG LIKAGPAIAV IGQAKSL*
Цекропин В (<i>Bombyx mori</i>)	RW--KIFKKI EKMGRNIIRDG IVKAGPAIEV LGSAKAI*

Цекропины из двукрылых насекомых

Цекропин А (<i>Drosophila melanogaster</i>)	GWLKKIGKKI ERVGQHTRDA TI-QGLGIAQ QAAVAATAR*
Цекропин В (<i>Drosophila melanogaster</i>)	GWLRLKLGKKI ERIGQHTRDA SI-QVLGIAQ QAAVAATAR*
Цекропин С (<i>Drosophila melanogaster</i>)	GWLKKLGKRI ERIGQHTRDA TI-QGLGIAQ QAAVAATAR*
Цекропин IА (<i>Sarcophaga peregrina</i>)	GWLKKIGKKI ERVGQHTRDA TI-QGLGIAQ QAAVAATAR*
Цекропин IВ (<i>Sarcophaga peregrina</i>)	GWLKKIGKKI ERVGQHTRDA TI-QVIGVAQ QAAVAATAR*
Цекропин IС (<i>Sarcophaga peregrina</i>)	GWLRIKIGKKI ERVGQHTRDA TI-QVLGIAQ QAAVAATAR*
Цекропин IД (<i>Sarcophaga peregrina</i>)	GWIRDFGKRI ERVGQHTRDA TI-QTIAVAQ QAAVAATLK*

Цекропины из млекопитающих

Цекропин P1 свиньи	SWLSKTAKKL ENSAK-KR-- -ISEGIAIAI QGG-----PR
--------------------	---

Рис. 13. Первичная структура цекропинов.

Жирным шрифтом отмечены консервативные аминокислотные остатки. Звездочкой помечены амидированные C-концевые аминокислоты.

короткий неупорядоченный N-концевой участок (1—4-й остатки), переходящий в классическую амфипатическую α -спираль (5—21-й остатки), которая шарнирной последовательностью (A—G—P) соединена с C-концевой, преимущественно гидрофобной, α -спиралью (25—37-й остатки) (Holak et al., 1988).

Клонирование и анализ нуклеотидной последовательности генов цекропинов, наряду с анализом продуктов их транскрипции и трансляции, свидетельствует о том, что биосинтез рассматриваемых антимикробных пептидов имеет сходство с таковым дефенсинов млекопитающих. Как и дефенсины (Ganz, 1994), цекропины синтезируются в форме большой молекулы-предшественницы (препроцекропина), состоящей из более чем 60 аминокислотных остатков (Voman et al.,

1989а). Структура препроцекропина А выглядит следующим образом (структура, соответствующая цекропину А, подчеркнута):

MNFSRIFFVFASCLTALAMVNAARPEPKWKLFKKIEKVGQNI RDGIIKAGPAVAVVGGQATQIAK.

Первые N-концевые 24—26 аминокислот отсутствуют в конечном зрелом пептиде. Сигнальный пептид препроцекропина включает в себя первые 22 остатка и является гидрофобным. Профрагмент прекурсорной молекулы цекропина в отличие от соответствующей части дефенсиновой молекулы-предшественницы является очень коротким (4 аминокислотных остатка), и нет оснований рассматривать его в качестве пептида, нейтрализующего цитотоксическую активность конечной зрелой молекулы цекропина. Скорее всего, препроцекропная прекурсорной молекулы цекропина выполняет сигнально-транспортную функцию в местах синтеза пептида, который происходит в клетках жирового тела и гемоцитах насекомых (Voman et al., 1991).

Изучение механизмов регуляции цекропиновых генов выявило их интересные особенности. Оказалось, что они имеют черты сходства с механизмами, ответственными за контроль активности генов иммуноглобулинов и белков острой фазы у позвоночных животных. Установлено, что цекропиновые гены *Cecropia hyalophora* в области энхансера содержат кВ-подобный структурный мотив, который в случае контакта куколок с живыми бактериями, липополисахаридом или форболовым эфиром связывает цитоплазматический иммунореактивный фактор (CIF — *Cecropia immunoresponsive factor*), инициирующий синтез цекропинов (Sun, Faye, 1992a, 1992b). Эти исследования свидетельствуют об универсальности механизмов регуляции индуцибельных генов у беспозвоночных и позвоночных животных.

Антимикробная активность цекропинов А и В изучена против широкого круга грамположительных и грамотрицательных бактерий, причем последние, как правило, более чувствительны к их действию. Интересно отметить, что в эквимоллярных концентрациях цекропины проявляют большую антимикробную активность по отношению к *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter calcoaceticus*, нежели известный антибиотик микробного происхождения — тетрациклин (Voman, 1994). Они не лизируют эукариотические клетки (Steiner et al., 1981), что принципиально отличает их от дефенсинов (Lehrer et al., 1993). Подобная избирательность цитотоксического действия цекропинов стимулировала серию исследований по разработке химически синтезированных модифицированных гомологов цекропинов с повышенной антимикробной активностью, которые могут в перспективе найти применение в медицинской и ветеринарной практике (Merrifield et al., 1994).

Химически синтезированный аналог цекропина А, построенный из D-аминокислот, обладает практически той же антибактериальной активностью, что и природный пептид (Wade et al., 1990). Это свидетельствует о независимости проявления антимикробных свойств природного и искусственного пептидов от оптических свойств составляющих их молекул, а также указывает на то, что их взаимодействие с

мембранами не носит лигандрецепторного характера. Однако это не означает того, что рассматриваемое взаимодействие пептидов с фосфолипидами мембран лишено какой-либо избирательности. Опыты с варьированием фосфолипидного состава искусственных мембран-мишеней свидетельствуют о повышенном аффинитете (сродстве) катионных пептидов к структурам, обогащенным анионными фосфолипидами (фосфатидинглицерин, кардиолипин), которые являются характерным структурным элементом большинства цитоплазматических мембран бактерий (Кагава, 1985). Модификации первичной структуры природных цекропинов позволяют оценить значимость отдельных аминокислотных остатков в реализации антимикробных и цитотоксических свойств молекулы. Например, замена лейцина в 4-м положении или изолейцина в 8-м положении цекропина А на пролин заметно снижает антимикробную активность молекулы, особенно в отношении грамположительной бактерии *Micrococcus luteus*. Пролин в данном случае нарушает амфипатическую N-концевую α -спираль. Важное значение в реализации антимикробных свойств цекропина А имеет триптофан во 2-м положении, удаление которого на два порядка снижает активность пептида в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *M. luteus*. Существует предположение о том, что триптофан в этой позиции взаимодействует с остатками фенилаланина в 5-м положении и лейцина/изолейцина в 8-м соседних молекул, участвующих в формировании структуры ионного канала (Durell et al., 1992). Структурные аналоги цекропина со свободными C-карбоксильными группами характеризуются меньшей антимикробной активностью по сравнению с природными пептидами, у которых эти группы амидированы (Merrifield et al., 1982). Как и в случае с дефенсинами кролика, более основные представители семейства цекропинов (цекропины А и В) обладают повышенной антимикробной активностью по сравнению с менее катионным цекропином D, в молекуле которого на три положительных заряда меньше (Voman et al., 1991).

С целью получения антибиотических пептидов с повышенной функциональной активностью и селективностью антимикробного действия ведутся исследования по разработке химически синтезируемых молекул, сочетающих в себе структурные особенности нескольких цитотоксических пептидов. В настоящее время в американско-шведских исследованиях получены разнообразные химерные молекулы, фрагменты которых гомологичны цекропинам и мелиттину. Мелиттин является основным пептидным компонентом пчелиного яда. Он состоит из 26 аминокислотных остатков: GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ—NH₂, образующих на N-конце молекулы гидрофобную α -спираль, а на C-конце — гидрофильную α -спираль. Подобная организация молекулы делает ее сильно токсическим соединением с антимикробными и гемолитическими свойствами. В серии работ осуществлено получение химическим твердофазным методом гибридных (химерных) молекул, фрагменты структур которых представлены как последовательностями мелиттина (M), так и цекропина А (CA) одновременно в разных сочетаниях. Антимикробная активность таких гиб-

ридных молекул оказалась максимальной в сочетаниях СА(1—24) М(1—13) и М(1—13)СА(1—22), причем для всех них была характерна низкая гемолитическая активность, свойственная цекропинам.

Опыты по влиянию на проницаемость искусственной плоской липидной мембраны цекропина и его синтетических гомологов выявили следующие закономерности взаимодействия пептидов и мембран-мишеней. В водных растворах цекропины имеют тенденцию к ассоциации молекул с образованием олигомеров, состоящих как минимум из 2 молекул. Эти олигомеры адсорбируются на поверхности липидных бислоев за счет электростатических взаимодействий основных групп пептида и фосфатных групп фосфолипидов мембран. Следующий этап взаимодействия определяется гидрофобными взаимодействиями липофильной поверхности амфипатической N-концевой α -спирали и гидрофобной С-концевой α -спирали цекропиновой молекулы с алифатическими хвостами жирных кислот фосфолипидов. Заключительный этап взаимодействия цекропинов с мембранами связан с образованием в структуре последних каналов (пор), несущих на своей внутренней поверхности положительные заряды. Это предопределяет относительную избирательность проникновения через подобные поры анионов (Christensen et al., 1988).

Являясь с химической точки зрения амфипатическими молекулами, цекропины обладают свойствами поверхностно-активных соединений, осуществляющих свое антибактериальное действие путем внедрения в цитоплазматическую мембрану клетки-мишени, формируя в ней неупорядоченные поры (каналы) (Christensen et al., 1988). Нарушение структурной целостности плазмалеммы бактерий приводит к диссипации мембранного потенциала клетки, подавлению энергообеспечивающих клетку процессов гликолиза и окислительного фосфорилирования и зависимых от них транспорта ионов и нутриентов, транскрипции и трансляции. Результатирующей всех этих воздействий на микробные клетки является их гибель. Сходное действие на бактерии оказывают такие пептидные антибиотики микробного происхождения, как грамицидин А и полимиксины.

Неожиданное продолжение исследований с цекропинами имело место в 1989 г., когда шведские ученые обнаружили родственный цекропину пептид Р1 (рис. 13) в слизистой тонкой кишки свиньи. Третью часть остатков в молекулах Р1 свиньи и цекропина А оказались идентичными, а с учетом эквивалентного характера замен некоторых аминокислотных остатков гомология пептидов составляет около 70 % (Lee et al., 1989). В 1997 г. в лаборатории проф. Лерера (США) были выделены и секвенированы цекропиноподобные пептиды (стиелины, *styeilins*) из гемоцитов асцидии *Styela clava*, относящейся к хордовым животным подтипа оболочники (Lee et al., 1997).

Таким образом, уже в трех крупных эволюционно отдаленных группах животных обнаружены антимикробные пептиды, относящиеся к цекропинам, что свидетельствует как об их древнем происхождении, так и особой функциональной значимости в обеспечении резистентности к инфекции.

1.9. МАГЕЙНИНЫ

Общеизвестно, что кожа лягушек является продуцентом многих биологически активных веществ (Bevins, Zasloff, 1990; Kreil, 1994), поэтому неудивительно обнаружение в ее секретах группы антимикробных пептидов, названных магейнинами (*magainins* от древнеевр. *magain*, что означает *щит, защита*) (Zasloff, 1987). В качестве основного объекта выделения этих пептидов была выбрана шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*), которая используется в ряде экспериментов с целью хирургического извлечения из ее репродуктивных органов ооцитов. Заслофф обратил внимание на тот факт, что послеоперационные раны животных практически никогда не инфицируются и не загнивают. Выясняя причины подобной резистентности лягушек к инфекции, автор открыл группу низкомолекулярных пептидов (рис. 14) с основными электрохимическими свойствами, которые активны *in vitro* против грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и простейших (Soravia et al., 1988; Zasloff et al., 1988). Далее были химически синтезированы различные производные магейнинов с повышенной антимикробной активностью, среди которых наиболее известен пептид MSI-78 (Bessalle et al., 1992). Его антимикробные свойства усилены за счет введения пяти остатков лизина. Кроме магейнинов из кожи лягушки *Xenopus laevis* выделены антимикробные пептиды PGLa, девять фрагментов предшественника церулеина, фрагмент предшественника ксенопсина (рис. 14). Интересно, что часть этих пептидов была обнаружена и в эпителии желудка шпорцевой лягушки (Moore et al., 1991). Это дополнительное свидетельство

Магейнин-1	GIGKFLHSAG-KFG-KAFVGEIMKS
Магейнин-2	GIGKFLHSAK-KFG-KAFVGEIMNS
MSI-78	GIGKFLKKAQ-KFG-KAFVK-ILKK*
Бомбинин-2	GIGA--LSA--KGALKGLAKGLAQNHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 1	GIGGALLSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 2	GIGGALLSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 3	GIGSILSAG-KSALKGFAGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 4	GIGSILSAA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 5	GIGGALLSAA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 6	GIGGALLSDA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 1 (BLP-1)	GIGSILSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 2 (BLP-2)	GIGSAILSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 3 (BLP-3)	GIGAILSAG-KSALKGLAKGLAEHF*
Бомбинин-подобный пептид 4 (BLP-4)	GIGAILSAG-KSILKGLAKGLAEHF*
Фрагмент предшественника ксенопсина (XPF)	GWASKIGQTLGKIA-KVGLKELIQPK
PGLa	GWASKAGAIAGKIA-KVALKAL*
Фрагмент предшественника левитида (LPF)	GWASKIGQTLGKIA-KVGLQGLMQPK
Фрагмент 1 предшественника церулеина (CPF-1)	GFGSFLGKAL-KAALKIGANALGGSPQQ
Фрагмент 2 предшественника церулеина (CPF-2)	GFGSFLGKAL-KAALKIGANALGGAPQQ
Фрагмент 3 предшественника церулеина (CPF-3)	GLASLLGKAL-KAGLKIETHFLGGAPQQ
Фрагмент 4 предшественника церулеина (CPF-4)	GFGSFLGKAL-KAGLKIETHFLGGAPQQ
Фрагмент 5 предшественника церулеина (CPF-5)	GLASLLGKAL-KAALKIGANALGGSPQQ
Фрагмент 6 предшественника церулеина (CPF-6)	GLASLLGKAL-KAALKIETHFLGGAPQQ
Фрагмент 7 предшественника церулеина (CPF-7)	GLASFLGKAL-KAGLKIETHFLGGAPQQ
Фрагмент 8 предшественника церулеина (CPF-8)	GFGSFLGKAL-KAALKIGANALGGAPQQ
Фрагмент 9 предшественника церулеина (CPF-9)	GFGSFLGKAL-KAALKIGANALGGAPQQ

Рис. 14. Первичные структуры антибактериальных пептидов лягушек.

Жирным шрифтом отмечены консервативные аминокислотные остатки.
Звездочкой помечены амидированные С-концевые аминокислоты.

того, что катионные антимикробные пептиды (магейнины, дефенсины, цекропины) встречаются в морфологических образованиях организма, пограничных к инфекции. Неожиданным оказался результат поиска магейниноподобных пептидов в коже у других представителей бесхвостых амфибий. Из секрета кожи азиатской жабы *Bombina orientalis* был выделен антимикробный пептид бомбинин (Gibson et al., 1991), хотя и имеющий в N-концевом участке молекулы определенное сходство с магейнином-2 (рис. 14), но в целом отличный от последнего по первичной структуре.

Возвращаясь к цитотоксическому действию магейнинов, необходимо отметить, что, будучи эффективными антимикробными агентами (антибактериальное, фунгицидное и антипротозойное действия), эти пептиды не лизируют эритроциты и лимфоциты (Stuciani et al., 1991). Однако к их литическому действию оказались повышено чувствительны трансформированные (опухольевые) клетки. Причины определенной селективности в проявлении цитотоксичности магейнинов лежат, скорее всего, в наборе липидных молекул мембран клеток-мишеней. Являясь положительно заряженными амфипатическими молекулами, магейнины проявляют повышенное сродство к взаимодействию со структурами, заряженными отрицательно. Именно цитоплазматические мембраны бактерий обогащены анионными фосфолипидами (фосфатидилглицерин, кардиолипин), что и делает, в частности, эти объекты эффективной мишенью для положительно заряженных пептидных антибиотиков, в том числе и магейнинов.

Магейнин является линейной катионной молекулой при взаимодействии с мембраной-мишенью, принимающей структуру амфипатической α -спирали подобно другим антимикробным пептидам кожи лягушки *Xenopus laevis* (Bevins, Zasloff, 1990). В настоящее время получены разнообразные структурные аналоги магейнина-2 с целью оценки значимости тех или иных аминокислотных остатков в реализации антимикробных свойств пептида. Пептиды, лишённые 3 аминокислотных остатков в N-концевой области молекулы магейнина, сохраняют антимикробную активность в отношении *Escherichia coli*, хотя и в некоторой степени сниженную. Удаление же 4-го аминокислотного остатка лизина (K) в N-концевой области молекулы приводит к резкому снижению (почти на два порядка) антимикробной активности подобных молекул (Zasloff et al., 1988). Дополнительное удаление остатков FLH лишает подобный пептид какой-либо антимикробной активности. Интересно, что замена глицина в 13-м положении на аланин, увеличивающая процент α -спиральной структуры молекулы в водных растворах, приводит к усилению антимикробной активности производного магейнина, особенно в отношении *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Однако при этом возрастает и нежелательная гемолитическая активность такого пептида (Chen et al., 1988). Амидирование C-концевой аминокислоты повышает антимикробную активность природного магейнина-2 и его разнообразных структурных аналогов (Cuervo et al., 1988). Удаление остатка глутаминовой кислоты в 19-м положении усиливает антимикробные свойства магей-

нина-2, не влияя на его гемолитическую активность. Повышение основности природных молекул магейнина-2 за счет замещения в его структуре некоторых аминокислотных остатков аминокислотой — лизином существенно усилило антимикробные свойства подобных химически синтезированных молекул (Maloy, Kagi, 1995), что позволило фармацевтической фирме по разработке новых антибиотических препаратов на основе магейнина (Magainin Pharmaceuticals Inc.) создать пептид MSI-78, проходящий клинические испытания на пациентах, больных диабетом с инфицированными язвами стопы ног. Этот пептид оказался эффективным против устойчивых к метициллину *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также гентамициноустойчивого штамма *P. aeruginosa*. В испытаниях *in vitro* с использованием *S. aureus* в качестве тест-микроба не выявлено формирования у бактерий резистентности к пептиду MSI-78, что делает его перспективным для наружного применения в кожных клиниках. Энантиомерный пептид MSI-78, синтезированный из D-аминокислот, характеризуется устойчивостью к действию протеаз, а потому после необходимых дополнительных исследований на токсичность может быть рекомендован для использования в медицинской и ветеринарной практике в борьбе с кожной инфекцией.

В водных растворах магейнин не имеет упорядоченной вторичной структуры. Однако после адсорбции на мембранах и плоских липидных бислоях пептид приобретает структуру амфипатической α -спирали (Matsuzaki et al., 1989), одна поверхность которой обогащена остатками гидрофобных аминокислот с липофильными боковыми группами, а другая — гидрофильными, среди которых доминирует основная аминокислота лизин. После сорбции на мембранах-мишенях молекулы магейнина располагаются параллельно их поверхности. По-видимому, сами по себе отдельные молекулы магейнина не способны дезорганизовать упорядоченную структуру липидных мембран, они для этого слишком коротки. При повышении концентрации пептидов в среде, усиливающей гидрофобные взаимодействия, его отдельные молекулы ассоциируют спонтанно с образованием нитеподобных структур высшего порядка, уже способных перфорировать мембраны (Westerhoff et al., 1989a, 1989b).

По-видимому, магейнин образует в мембране клетки-мишени разнообразные по параметрам отверстия (поры), через которые происходит вытекание наружу жизненно важных низкомолекулярных соединений и ионов. Нарушение ионной асимметрии между клеткой и средой приводит к рассеиванию мембранного потенциала, деполаризации клетки (Westerhoff et al., 1989b), что резко снижает ее жизнеспособность. При этом нарушение барьерной, осморегулирующей и транспортной функций цитоплазматической мембраны клеток-мишеней приводит к их гибели. Повышенное содержание кислых фосфолипидов во внешнем листке липидного бислоя бактериальных мембран способствует реализации антимикробных свойств магейнина. Распознавание пептидом «чужих» молекул в оболочке бактерий базируется на повышенном сродстве его катионных групп к фосфатным

остаткам фосфолипидов мембран. Присутствие в мембранах эукариотических клеток холестерина, наоборот, снижает аффинитет магейнина к липидному мембранам собственных клеток макроорганизма, что, по-видимому, немаловажно в очагах воспаления (Williams et al., 1990). Антимикробное действие также эффективно осуществляет химически синтезированный аналог магейнина из D-аминокислот (D-энантиомер магейнина). Это свидетельствует о том, что оптические свойства пептидов в анализируемом процессе не играют заметной роли, как это имеет место при лигандрецепторных и субстрат-ферментных взаимодействиях (Wade et al., 1990).

Магейнины и другие физиологически активные пептиды (PGLa и фрагменты-предшественники церулеина, ксенопсина и левитида) продуцируются гранулярными железами кожи шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*. Эти железы являются нейроэндокринными клетками млекопитающих (Bevins, Zasloff, 1990). Они присутствуют не только в дорзальной и вентральной областях кожи, но и в эпителии пищеварительного тракта лягушки (Moore et al., 1991, 1992). В этой области они соответствуют по функциям скорее всего клеткам Панета млекопитающих, продуцирующих антибиотические пептиды — дефенсины (Oullette et al., 1989; Jones, Bevins, 1992).

1.10. АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПРОЛИНА И ГЛИЦИНА

Среди выделенных и проанализированных антибиотических пептидов животного происхождения специальный интерес представляют пептиды, обогащенные остатками пролина. Первый подобный пептид был выделен из гемолимфы медоносной пчелы и получил в силу этого название апидаецина (*apidaecin*), в составе которого 29 % аминокислот приходится на пролин и 17 % — на аргинин (Casteels et al., 1989). Апидаецин — короткий 18-членный пептид, в составе которого встречаются последовательности PRP и PP (рис. 15), типичные для пролинсодержащих пептидов из других видов животных. В частности, подобные последовательности встречаются в пептиде из гемолимфы плодовой мушки — дрозоцине (*drosocin*), одним из необычных структурных свойств которого является гликозилирование по гидроксильной группе треонина (Bulet et al., 1993). К этому же семей-

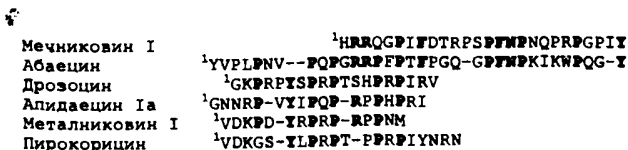


Рис. 15. Первичная структура катионных пролин-богатых антимикробных пептидов насекомых.

Жирным шрифтом отмечены инвариантные аминокислотные остатки.
¹ — N-концевая аминокислота пептидов.

BAC5	RFRPPIRRPPIRPFYFPPFRPPIRPFIFPPIRPFPRPPLRFP
OaBAC5	RFRPPIRRPPIRPFYFPPFRPPIRPFIFPPIRPFPRPPIGPF
ChBAC5	RFRPPIRRPPIRPFYFPPFRPPIRPFIFPPIRPFPRPPIGPF
BAC7	RRIRPFPRLPRFRPRLPFFPRPGPRPIPRPLFFPRPGPRPIPRPLPFFPRPGPRPIPRP

Рис. 16. Первичная структура бактенецинов.

ству пептидов следует отнести и металниковины из гемолимфы *Palaomena prasina* (Chernysh et al., 1996), пирокорицин из *Pyrrhocoris apterus*, а также мечниковин из *Drosophila melanogaster* (Levashina et al., 1995). По мнению последних авторов, все семейство рассматриваемых пептидов произошло в эволюции от пептида, структура которого ближе всего к абаецину — антимикробному пептиду из гемолимфы пчелы (Casteels-Josson et al., 1994).

В лейкоцитах коровы были обнаружены более высокомолекулярные пептиды — бактенецины (Bac5 и Bac7), обогащенные пролином (Frank et al., 1990). В нашей совместной с американскими учеными работе (руководитель работы — проф. Р. Лерер) были выделены бактенециноподобные антимикробные пептиды из лейкоцитов козы (ChBac5) и овцы (OaBac5), первичная структура которых имеет черты гомологии с соответствующими пептидами из лейкоцитов коровы (рис. 16).

Интересно, что в гемоцитах зеленого краба *Carcinus maenas*, принадлежащего к классу ракообразных (Crustacea) типа членистоногих, обнаружен пептид, который на основании частичного определения его первичной структуры может быть отнесен к рассматриваемой бактенециновой группе антимикробных пептидов (Schnapp et al., 1996).

Шведскими исследователями из слизистой тонкой кишки свиньи (Agerberth et al., 1991) и нами из лейкоцитов крови свиньи (Кокряков, 1995) выделен пептид PR-39 с высоким процентом остатков пролина (45—49 %) и аргинина (24—29 %), который также содержит последовательности PRP и PP: RRRPRPPYLPRRPPPPFFPRLPPRIPP-GFPPRFPPRFP. Функциональной особенностью всех рассмотренных пептидов является их повышенная антимикробная активность против грамотрицательных бактерий по сравнению с грамположительной флорой.

Необычный белок с многократным повторением последовательности из десяти аминокислот (RFPPPNFPGP) был выделен и секвенирован нами совместно с американскими исследователями (Harwig et al., 1995) из лейкоцитов свиньи. При фракционировании белков и полипептидов кислотного экстракта из лейкоцитов свиньи ультрафильтрацией через УМ-5 и на биогеле Р-10 нами была выявлена группа родственных по физико-химическим и антимикробным свойствам компонентов с низкой электрофоретической подвижностью в кислой среде и молекулярной массой в пределах от 7 до 9 кДа, которые, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на Vydac C18, характеризовались высокой степенью гидрофобности, так как выходили с хроматографической колонки при высоких концентраци-

структур, объединяет в общую группу сходство их прочастей при первичной трансляции (рис. 19). Прочасти этих структурно неродственных антимикробных пептидов представляют собой белки, гомологичные ингибитору катепсина L (кателин, *cathelin*) из лейкоцитов свиньи (Ritonja et al., 1989). В связи с этим рассматриваемые пептиды получили название кателицидинов (*cathelicidins*) (Zanetti et al., 1995).

1.11. ПЕПТИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ ЖИВОТНЫХ КАК БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ

Представленный в настоящей главе материал свидетельствует о том, что пептиды, осуществляющие защиту животных от инфекции, широко представлены в природе от простейших до человека (Leippe et al., 1991; Zasloff, 1992; Lehner et al., 1993; Hoffmann, 1995). Наиболее распространенным в эволюции типом антимикробных молекул являются катионные цистинсодержащие полипептиды. Наименьшим по размерам молекулы представителем этой группы антибиотических соединений является додекапептид с 1 дисульфидной связью (RLCRIVVIRVCR), выделенный из нейтрофилов коров (Romeo et al., 1988). Открытые нами протегрины содержат уже 2 дисульфидных мостика (Kokryakov et al., 1993), так же как и подобные им соединения из гемоцитов подковообразного краба — тахиплезины (Nakamura et al., 1988) и гемолимфы скорпиона — андроктонин (Ehret-Sabatier et al., 1996). Дефенсины человека, кролика, крысы, мыши и морской свинки (Lehner et al., 1993), как и β -дефенсины коров (Selsted et al., 1993) и галлинацины кур (Harwig et al., 1994a, 1994b), содержат в своем составе 6 цистеиновых остатков, образующих 3 внутримолекулярные S—S-связи. Замыкают рассматриваемый ряд антимикробные полипептиды eNAP-1 (~ 7.2 кДа) и eNAP-2 (~ 6.5 кДа) из нейтрофилов лошади, для структуры которых характерно наличие уже 4 дисульфидных групп (Couto et al., 1992a, 1992b). Есть основания предполагать, что 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 (Пигаревский, 1983; Мазинг, 1991; Borenstein et al., 1991b).

Следует подчеркнуть, что фагоциты и гемоциты являются не единственными клетками организма, содержащими дефенсины и структурно-родственные им полипептиды. Выявлены дефенсины в клетках эпителия тонкой кишки мышей (Ouellette et al., 1989a, 1989b; Eisenhauer et al., 1992), кролика (Hu et al., 1993) и человека (Jones, Bevins, 1992; Porter et al., 1997a), в эпителии трахеи и языка коров (Diamond et al., 1991, 1993), в структурах мочеполового и репродуктивного трактов человека (Svinarich et al., 1997).

Присутствие дефенсинов в клетках слизистой тонкого кишечника интересно в связи с представлениями И. И. Мечникова (1892) о мор-

фофизиологических предпосылках формирования фагоцитарной функции клеток в эволюции. Он рассматривал фагоцитоз как антимикробную функцию специализированных клеток организма, возникшую и развившуюся на основе пищеварительной активности цитоплазмы. Антимикробная функция фагоцитов (нейтрофилов, моноцитов/макрофагов, эозинофилов и гемоцитов) эволюционно возникла на основе способности простейших (амебы, инфузории) поглощать и инактивировать бактерии, которые являются основным объектом их питания. Поэтому уже на заре развития животных перед ними стояла задача инактивации (киллинга) потенциально патогенных микроорганизмов, являющихся для них источником пластических веществ и энергии. Есть основания допускать, что продукция простейшим *Entamoeba histolytica* пептидов, структурно гомологичных NK-лимфоцитам, отражает генеральную линию развития механизмов противоинфекционной резистентности (врожденного иммунитета) у животных (Leippe, 1995). В последние годы дефенсины описаны и у высших растений (Broekaert et al., 1995), причем, несмотря на наличие у них 4 дисульфидных связей, они имеют вторично-третичную структуру, сходную с таковой дефенсинов насекомых. Данные о единстве ряда молекулярных механизмов защиты от инфекции у животных и растений могут служить свидетельством общности их происхождения в эволюции.

Локализация дефенсинов в фагоцитах и клеточно-тканевых структурах организма, «пограничных к инфекции», свидетельствует в пользу их участия в формировании неспецифической антимикробной резистентности в качестве универсальных антибиотиков эндогенного происхождения (Кокряков, 1988; Spitznagel, 1984; Voman, 1991; Lehrer et al., 1991a). Более того, рассматриваемый молекулярный механизм защиты от микробов является, по-видимому, одним из древнейших в эволюции животных, поскольку полипептиды дефенсиновой природы встречаются уже в гемолимфе имаго медоносной пчелы (Casteels-Josson et al., 1994), личинок мясной мухи (Lambert et al., 1989), жука *Zophobas atratus* (Bulet et al., 1991) и стрекозы (Bulet et al., 1992).

Другой распространенной в эволюции матрицей антибиотических пептидов являются цекропины, выявленные первоначально в гемолимфе ряда насекомых, а позже в слизистой тонкого кишечника свиньи (Voman, 1994). Гены структурно-родственных им пептидов были клонированы и секвенированы из асцидии *Styela clava* в лаборатории проф. Лерера (Zhao et al., 1997). Эта гомологическая группа пептидов представляет собой линейные, не содержащие цистеина молекулы основной природы.

При всем структурном разнообразии большинства описанных в настоящее время антибиотических пептидов (АП) (суперсемейство дефенсинов, цекропины, магейнины, протегрины и др.) все они являются, как правило, одновременно основными (катионными, щелочными) и амфипатическими (характеризующимися пространственным разбросом гидрофильных и гидрофобных боковых групп аминокислотных остатков) молекулами, проявляющими сродство как к ли-

пофобным, так и липофильным средам и соединениям. Положительный заряд и амфифильность молекул антибиотических пептидов лежат в основе их функциональных проявлений, в частности антимикробного действия (Кокряков и др., 1997; Spitznagel, 1984; Lehger et al., 1993; Womán, 1995; Maloy, Kari, 1995). Благодаря им антибиотические пептиды вступают в электростатическое и гидрофобное взаимодействия с анионными фосфолипидами и липополисахаридами мембран микробных клеток-мишеней, которые приводят сначала к их адсорбции на поверхности мембран, а потом к введению в двойной липидный слой, что нарушает организацию и целостность оболочечных структур микроорганизмов. Подобное воздействие АП на цитоплазматическую мембрану имеет следствием необратимые повреждения ее структуры и нарушения ее разнообразных функций, результирующим эффектом которых является гибель клеток-мишеней. Частным случаем цитотоксичности АП является их действие на микроорганизмы (бактерии, низшие грибы, простейшие, оболочечные вирусы). В силу мембранотропного механизма антибиотического действия этих пептидов они способны в определенных условиях проявлять повреждающие (нежелательные) эффекты в отношении клеток животного организма, который их продуцирует. В связи с этим встает вопрос о том, какие клеточно-молекулярные механизмы обеспечивают прицельность именно антимикробного действия АП, сводя к минимуму их возможные аутоповреждающие эффекты в процессах фагоцитоза и воспаления, а также на поверхности барьерных эпителиев макроорганизма. Как теперь установлено, подобная избирательность действия АП определяется рядом структурных и морфологических факторов (Womán, 1994; Hoffman, 1995; Maloy, Kari, 1995). К последним относится, в частности, компартиментализация (упаковка, обособление) дефенсинов в лизосомоподобных гранулах лейкоцитов и клеток Панета, где они связаны с кислыми мукополисахаридами, которые обеспечивают нейтрализацию цитотоксических молекул. Другие пептиды (кателицидины) упакованы в гранулах в форме функционально неактивных предшественников (пропептидов), которые подвергаются ограниченному протеолизу (в частности, лизосомными эластазами) с освобождением антимикробного пептида только в случае активации нейтрофильных гранулоцитов в процессе фагоцитоза (Gennago et al., 1991; Zanetti et al., 1995). В случае освобождения содержимого лизосомоподобных гранул нейтрофильных гранулоцитов (НГ) во внеклеточное пространство цитотоксичность дефенсинов нейтрализуется вследствие их взаимодействия с плазменными белками, являющимися в своей основной массе анионными соединениями. В настоящее время установлено, что хорошо известные ингибиторы сериновых протеиназ (серпины) — α 2-макроглобулин, α 1-ингибитор протеиназ, α 1-антихимотрипсин, антитромбин III — обладают повышенным сродством к дефенсинам, благодаря чему образуются нецитотоксичные комплексы серпины—дефенсины (Panyutich et al., 1995).

Существенно важным фактором, определяющим избирательность (селективность) действия АП на микроорганизмы, являются особен-

ности поверхностных структур бактерий, низших грибов, оболочечных вирусов и, в меньшей степени, простейших. В клеточной стенке и цитоплазматической мембране бактерий и грибов локализованы молекулы, к которым АП проявляют повышенное сродство в ходе межмолекулярных электростатических и гидрофобных взаимодействий. Так, в частности, в состав липидов цитоплазматической мембраны большинства бактерий входят кислые фосфолипиды (кардиолипин, фосфатидилглицерин) в существенно более высокой концентрации, чем в плазмалемму эукариотических клеток (Кагава, 1985). Вследствие повышенного электростатического взаимодействия АП с мембранными структурами, обогащенными кислыми фосфолипидами (Maloy, Kari, 1995), наблюдается их преимущественная сорбция на бактериальных клетках как в фаголизосомах фагоцитов, так и во внеклеточной среде в очагах воспаления и на поверхности слизистых и кожных покровов. Благодаря ионному взаимодействию АП концентрируются в областях цитоплазматических мембран бактерий, обогащенных кислыми фосфолипидами. Подобное свойство АП было неоднократно продемонстрировано в модельных условиях с использованием искусственных плоских мембран и липосом (Fuji et al., 1993; Hristova et al., 1997; Lohner et al., 1997). Повреждающее действие АП на мембраны-мишени также зависит и от интенсивности гидрофобных взаимодействий пептида с углеводородными хвостами жирных кислот липидов. Амфипатический характер строения молекул большинства АП обеспечивает их виведение в двойной липидный слой мембран и нарушение структурной целостности последних. Известно также, что присутствие холестерина в составе липидов мембран эукариотических клеток повышает резистентность последних к повреждающему действию таких пептидов, как магейнин и цекропин (Maloy, Kari, 1995).

При анализе рассматриваемых взаимодействий важно также учитывать то обстоятельство, что цитоплазматическая мембрана бактерий непосредственно недоступна для контакта с АП, поскольку покрыта клеточной стенкой, в состав которой у грамположительных бактерий входит пептидогликан (муреин), а грамотрицательных — пептидогликан и наружная мембрана, являющаяся дополнительным защитным барьером микробной клетки (Франклин, Сноу, 1984). Поэтому дефенсины, за исключением некоторых криптдинов (Selsted, Ouellette, 1995), и магейнины более эффективно поражают *in vitro* грамположительную микрофлору, нежели грамотрицательную. Однако это правило распространяется не на все группы (семейства) антибиотических пептидов. Например, цекропины и некоторые батенецины более активны как цитотоксические молекулы в отношении грамотрицательных бактерий. Это свойство указанных соединений обусловлено их повышенной способностью к взаимодействию с одним из типичных (маркерных) представителей структуры наружной мембраны грамотрицательных бактерий, каковым является липополисахарид (эндотоксин). Наличие липополисахарида (ЛПС) во внешнем слое наружной мембраны грамотрицательных бактерий

является одним из условий их опознавания антибиотическими пептидами и белками (Elsbach, Weiss, 1993; Voman, 1995).

Пенетрирующая липофильный бислоем активностью молекул антибиотических пептидов в ряде случаев заметно зависит от трансмембранного электрического потенциала клеток-мишеней, который, как известно, у плазмалеммы бактерий обычно в 1.5—2 раза более высокий, чем у мембран эукариотических клеток. Это свойство мембран является одним из условий, облегчающих проникновение АП через липидный бислой, особенно в тех случаях, когда эффекторные молекулы умеренно- или слабоосновные. Проникающая способность высокоосновных пептидов, таких как дефенсины кролика NP-1 и NP-2, практически не зависит от мембранного потенциала клеток-мишеней. Направление электрического поля поперек мембран от плюса на внешней поверхности мембраны к минусу — на внутренней (внутриклеточной) обеспечивает электрофорез положительно заряженных молекул антибиотических пептидов через мембрану внутрь клетки. При этом часть молекул самостоятельно или в ассоциации друг с другом (димеры, тетрамеры и т. д.) внедряется в мембраны, образуя в них пороподобные отверстия различной молекулярной организации. Перфорация мембран, которая в ряде случаев носит транзитный (проходящий) характер, приводит к утечке из клеток ионов и нарушению ионной асимметрии между средой и клетками. Следствием этого является диссипация мембранного потенциала клеток-мишеней (деполяризация мембраны) и стремление молекул воды войти в клетки. Результатами подобного движения воды могут быть разбухание клеток-мишеней и их осмотический лизис. Рассеивание мембранного потенциала лишает клетки возможности осуществлять активный транспорт ионов и веществ против градиента концентраций, что в итоге резко снижает их жизнеспособность.

При типичной ориентации электрического поля мембран катионные АП могут переноситься через этот барьер путем электрофореза, подобно тому как это описано для микробных пептидных антибиотиков полимиксина В и грамицидинов (Франклин, Сноу, 1984);

Механическое внедрение АП в мембраны клеток нарушает их молекулярную архитектуру, сложные надмолекулярные образования, осуществляющие транспорт электронов и сопряжение окисления с фосфорилированием. На некоторые метаболические процессы АП действуют ингибирующим образом (репликация, транскрипция, трансляция и др.), что дополняет картину деструктурирующих воздействий на клетки-мишени, результатом которых является гибель (инактивация) последних (Zeya, Spitznagel, 1966a, 1966b; Lehrer et al., 1988). Обобщенная схема предполагаемого механизма антимикробного действия одного из антибиотических пептидов — цекропина — представлена на рис. 20 (Christensen et al., 1988). Первая фаза (I) действия пептида связана с адсорбцией димера цекропина на поверхности мембраны за счет электростатических взаимодействий с ее отрицательно заряженными соединениями (кислые фосфолипиды, липополисахариды). На следующей стадии (II) происходит диссоциация

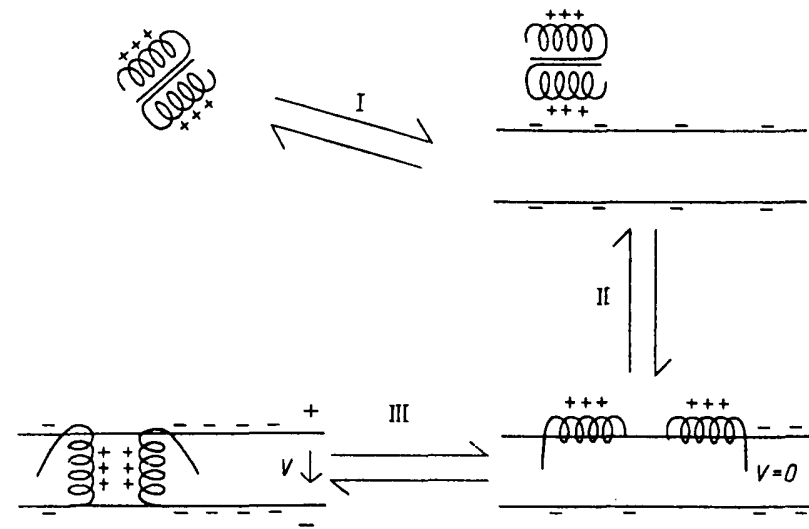


Рис. 20. Схема, отражающая основные этапы взаимодействия цекропинов с липидной мембраной (Christensen et al., 1988). Пояснения в тексте.

димера и внедрение в липофильную фазу липидного бислоя отдельных молекул цекропина за счет гидрофобных взаимодействий. На заключительной стадии (III) внедрившиеся и ориентированные поперек мембран молекулы цекропинов формируют каналоподобные поры с умеренной селективной проницаемостью для анионов.

Таким образом, отрицательный заряд поверхности микробных клеток наряду с набором специфических структур их оболочек (липополисахариды, тейхоевые кислоты, пептидогликаны, кислые фосфолипиды) и высоким трансмембранным электрическим потенциалом их цитоплазматических мембран обеспечивает избирательность антимикробного действия антибиотических пептидов. Для рассматриваемого механизма врожденного иммунитета животных характерен относительно низкий по сравнению с молекулярными факторами приобретенного иммунитета уровень распознавания «своего» и «чужого», а также отсутствие памяти (усиления продукции антибиотических пептидов после повторной встречи с инфекционным агентом не наблюдается). Однако именно антибиотические пептиды клеток и жидких сред в значительной степени обеспечивают выживаемость большинства видов беспозвоночных животных в среде, изобилующей микробами (Кокряков и др., 1997; Voman, 1991, 1995; Lehrer et al., 1991a, 1993; Hoffmann, 1995), поскольку у них отсутствуют механизмы приобретенного (специфического) иммунитета.

Необходимостью обеспечения надежной антимикробной защиты животных объясняется факт удивительного структурного разнообразия молекулярных матриц АП, сосуществующих в клетках и жидких

средах одного и того же организма. Так, в нейтрофилах коров представлены β -дефенсины, бактенецины (Bac5, Bac7) и индолицидин (Selsted et al., 1993). В гемолимфе мясных мух встречаются дефенсины, цекропины и другие АП (Hoffmann, 1995). Один из ведущих идеологов рассматриваемой области исследований — проф. Х. Боман из Стокгольмского университета (Boman, 1996) — видит основную причину столь широкого разнообразия молекулярных матриц антимикробных пептидов в особенностях, очень часто ускользающих из поля зрения и анализа ученых, сопряженной эволюции экосистемы животный организм—микробная флора. Другими словами, именно микроорганизмы являются одним из ведущих природных биотических факторов среды, определяющих как поддержание стабильности молекулярно-генетических структур, ответственных за биосинтез антимикробных пептидов, так и направление возможных их изменений в эволюции животного мира. По мнению Х. Бомана, именно в реальном многообразии видов микроорганизмов, с которыми в природе взаимодействует конкретный вид животных, кроется одна из основных причин видового спектра антимикробных пептидов, которые, с одной стороны, обеспечивают стерильность внутренней среды макроорганизма, а с другой — контролируют профиль его аутофлоры.

Понимание механизмов антимикробного действия АП является основанием для использования этих соединений в качестве антибиотиков нового поколения в медицине и ветеринарии. Поразительные генетическая изменчивость (генетическая пластичность) и скорость размножения микроорганизмов являются факторами, обеспечивающими быстрое формирование у них антибиотикорезистентности (устойчивости к антибиотикам микробного происхождения). Это обстоятельство создает для человека серьезные проблемы в борьбе с потенциально патогенными возбудителями инфекционных заболеваний. Последний новый класс антибиотиков — налидиксовая кислота — был внедрен в практику более 30 лет тому назад (Nalcosk, 1997a). В связи с этим поиск и создание новых антибиотических веществ пептидной природы являются насущными (актуальными) задачами современной медико-биологической науки.

Традиционно применяемые антибиотики микробного происхождения, решая основную задачу, связанную с инактивацией микроорганизмов, вызывают, однако, у человека и животных ряд нежелательных побочных эффектов: во-первых, многие из них индуцируют в организме состояние иммунодефицита вследствие иммуносупрессивной активности, во-вторых, вызывают в организме эндотоксемию, в-третьих, к ним вырабатывается резистентность со стороны микроорганизмов (устойчивость к антибиотикам) (Земсков и др., 1994).

Антимикробные пептиды (дефенсины, протегрины, цекропины, магейнины и др.) лишены этих недостатков. Более того, многие катионные АП обладают эндотоксиннейтрализующей и иммунорегулирующей активностью (см. главу 7). К ним практически не вырабатывается резистентность со стороны микробов (Nalcosk, 1997a, 1997b). Будучи факторами проницаемости, катионные АП усиливают дейст-

вие традиционно используемых антибиотиков, для них пока не описаны анафилактикоподобные реакции, поскольку они неантигенны. Все это является предпосылкой для создания антимикробных препаратов на основе природных пептидных антибиотиков, совокупность которых представляет собой неотложную систему неспецифической антимикробной защиты (врожденного иммунитета), включающуюся в действие без существенно заметного латентного периода, с высокой эффективностью и относительной избирательностью распознавания «свое»—«чужое».

С целью оценки терапевтических свойств дефенсинов в условиях организма нами впервые было изучено влияние суммарных дефенсинов кролика и человека на течение экспериментальной герпетической инфекции на мышцах линии СВА (Кокряков и др., 1989б). С этой целью мышей заражали интрацеребрально вирусом герпеса (ВПГ-1) в дозе 2 ЛД₅₀/0.02 мл. Дефенсины испытывали по лечебно-профилактической схеме с одноразовой концентрацией белка, равной 100 мкг на животное, что оказалось оптимальным в результате предварительно проведенных экспериментов. У мышей вследствие инфицирования в мозг развивается энцефаломиелит разной степени тяжести. Причем по данным, полученным в нашей лаборатории, максимальная продукция вируса в клетках организма-хозяина имеет место на 3—4-е сут инфекционного процесса. Поэтому именно в эти сроки нами внутрибрюшинно вводились дефенсины инфицированным животным. В результате проведенных опытов получены доказательства защитного действия дефенсинов при экспериментальной герпетической инфекции у мышей, количественно более выраженного в случае использования препаратов кролика по сравнению с пептидами нейтрофилов человека (процент выживания животных 70 против 60). Испытание активности дефенсинов в этих условиях выявило в принципе те же тенденции, которые были установлены при оценке их прямого антивирусного действия. Эффективнее в обоих случаях были дефенсины кролика, нежели человека, что в некоторой степени можно связать с более основным характером молекул первых, определяющим в значительной степени интенсивность вируссоцидной активности препаратов. Необходимо подчеркнуть, что суммарная лечебная доза препаратов составляла в наших экспериментах 10 мг полипептидов на 1 кг веса животного, в то время как ЛД₅₀ дефенсинов кролика, по нашим данным, находится в пределах 500—700 мг/кг, а дефенсинов человека — 700—800 мг/кг. Соотношение токсической и терапевтической доз дефенсинов позволяет считать нетоксичными эти препараты в используемых концентрациях. Что касается механизмов защитного действия этих полипептидов в условиях организма, то наряду с их прямым антивирусным действием наиболее вероятно их стимулирующее воздействие на клетки мононуклеарной фагоцитирующей системы (Pruzanski et al., 1984; Ginsburg, 1987; Territo et al., 1989), которые являются одним из определяющих факторов резистентности к герпетической инфекции (Kemp et al., 1990). Проверка этих предположений является предметом наших продолжающихся работ.

Результаты данных экспериментов позволяют рассматривать дефенсины в качестве эффективных препаратов, повышающих резистентность организма к вирусной инфекции. Принципиальная возможность их использования в качестве профилактическо-терапевтических средств при инфекционной патологии с неизбежностью ставит вопрос о необходимости изучения влияния дефенсинов на гомеостатические механизмы организма. Некоторые результаты таких исследований представлены в разделах 7.2—7.4 настоящей монографии.

ГЛАВА 2

БАКТЕРИЦИДНЫЙ ПРОНИЦАЕМОСТЬ УВЕЛИЧИВАЮЩИЙ БЕЛОК

Поиски антимикробных факторов нейтрофилов, избирательно действующих на грамотрицательную флору, были стимулированы наблюдениями (Elsbach, 1980), установившими различный характер ультраструктурных изменений фагоцитированных бактерий в зависимости от особенностей строения их клеточной оболочки. Так, если поглощение и инактивация грамположительных бактерий сопровождалось быстрыми и обширными деструктивными изменениями микробных клеток, то начальные стадии фагоцитоза кишечной палочки протекали без ее существенной структурно-функциональной дезорганизации.

В серии работ (Weiss et al., 1975, 1978) было осуществлено выделение лизин-богатых белков из нейтрофилов человека и кролика с молекулярной массой в пределах 50—60 кДа, которые в условиях *in vitro* оказывали цитотоксическое действие преимущественно на грамотрицательные виды бактерий. Установленная способность этих белков подавлять деление и увеличивать проницаемость наружной мембраны бактерий послужила основанием для наименования их бактерицидными проницаемыми увеличивающими белками (БПУБ).

БПУБ составляют до 1 % от общего белка нейтрофилов человека и кролика и содержатся в азурофильных гранулах. Клонирование генов и воссоздание на основе генной структуры аминокислотной последовательности белков из нейтрофилов человека и крупного рогатого скота (рис. 21) выявили значительную степень сходства их первичных структур (> 60 %) (Gray et al., 1989; Leong, Camerata, 1990; Elsbach, Weiss, 1993). Изоэлектрические точки обоих белков находятся в щелочной области значений pH (pI ~ 9.5), что позволяет отнести их к поликатионным веществам. Другой отличительной особенностью этих белков является высокое содержание в их составе гидрофобных аминокислот (46 мол%). Белки состоят из катионной, лизинобогатой N-концевой части и очень гидрофобной, слабо заряженной C-концевой половины. Относительно гидрофильный и одновременно пролин-богатый участок, чувствительный к действию протеаз, разделяет эти две основные части молекулы БПУБ. После ограниченного протеолиза молекулы белка из него образуются аминотерминальный (25 кДа) и карбокситерминальный (30 кДа) фрагменты.

БПУБ в наномолярных (Weiss et al., 1978) концентрациях ингибирует рост и размножение многих видов грамотрицательных бактерий

А			
FKIKHLGKGH	YSFYSDIRE	¹ VNPGVVVRIS	QKGLDYASQQ
SGNFDSLIEG	MSISADLKL	FQLPSSQISM	VPNVGLKFSI
KIESALRNKM	NSQVCEKVTN	SNPTSGKPTI	TCSSCSSHIN
DVQMKGEFYS	ENHNPPFFA	SVSSKLPQYF	QTLPMVTKID
RDDMI PKESK	FRLTKFFGT	PPVMEFFPAH	DRMVYLGSLD
VQAFVAVLNS	SLASLFLIGM	FLPEVAKKFP	NMKIQIHVSA
LQDIMNYIVP	ILVLRPVNEK	HTTGSMEVSA	ESNRLVGLK
		LQKGFPLPTP	ARVQLYNVVL
			QPHQNFLLFG

Б			
FKIKYLGKQ	YSFFSMVIQG	¹ TNPGIVARIT	QKGLDYACQQ
GGNFDSLIEG	ISILAGLNLG	FNLPSQIRP	LPDKGLDLSI
RWESLLOKSM	TRKICEVVT	YDPASGHSTV	TCSSCSSGIN
DWLLKGEFFS	LAHRSPPFFA	TSSKLPQYF	QTLPMVTKLD
RDDMI PKESK	FRLTKFFGT	PPALAFPSDH	DRMVYLGISE
TQAFVAVLNS	SLDPLFLEEM	LIPQVAKMFP	DMQMQLFIWA
LQSVINYVMP	TIVLPVINKK	NLNLSSVVVGA	KSDRLIGELR
		LQKGFPLPLP	AYIELENLTL
			QPYQDFLLFG
			GVLTLQKELE
			RDASIKIRGK
			TVRIHISGSS
			KVAGVDYSLV
			YFFNTAGFVY
			SLPPKLTMKP
			LDKLLLELKH
			QPYQDFLLFG
			KITIPNFSGN
			WKARKNFIKL
			LGWLIQLFRK
			APPRATANNL
			QKAGALNLT
			SSLDLIFVLD
			SDIGPFSVES
			ADVQYS

Рис. 21. Первичная структура бактерицидных проникающих белков из нейтрофилов человека (А) и крупного рогатого скота (Б).

и не оказывает цитотоксического действия на грамположительные бактерии и эукариотические клетки.

Цитотоксическое действие БПУб на грамотрицательные бактерии реализуется в две стадии. На первой стадии белки в концентрации 10^{-8} – 10^{-9} М при нейтрально-щелочных значениях pH вызывают в течение первых минут контакта с чувствительными бактериями (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*) обратимое подавление способности микробов к размножению (Weiss et al., 1978; Mannion et al., 1990a). Это явление совпадает по времени со связыванием белка с наружной мембраной и сопровождается временным увеличением проницаемости внешней (наружной) мембраны грамотрицательных бактерий для гидрофобных антибиотиков (актиномицин Д, рифампицин), в норме не проникающих в клетку, и активацией катаболических ферментов (фосфолипазы A_2 , пептидогликаназ) микробной стенки. Интересно, что, несмотря на потерю микроорганизмами способности к делению, некоторые их физиологические функции, связанные с деятельностью внутренней (плазматической) мембраны (транспорт ионов K^+ , макромолекулярные синтезы), остаются неизменными на протяжении первых 20–30 мин взаимодействия бактерицидного белка с микробной поверхностью. Электронно-микроскопическое изучение морфологических изменений в обработанных БПУб микробных клетках выявило только незначительное утолщение их наружной мембраны при практически полной сохранности внутренних структур бактерий.

Как было установлено в специально проведенном исследовании, первостепенное значение в реализации антимикробных свойств БПУб имеет N-концевой фрагмент его молекулы (Ooi et al., 1991). Полученный путем протеолиза или биотехнологически рекомбинантный аминокислотный фрагмент проявляет те же антибактериальные свойства, что и холобелок (Ooi et al., 1987; Weiss et al., 1992). Карбокситерминальный фрагмент не проявляет существенных антимикробных свойств.

N-концевая часть молекулы с молекулярной массой около 25 кДа характеризуется высоким положительным зарядом (+16) и гидрофобностью, обеспечивающими повышенное сродство белка к липополисахариду (ЛПС) наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Gazzano-Santoro et al., 1992). Очищенные природные и рекомбинантные (rBPI55) холобелки, как и их аминокислотные фрагменты (nBPI25, rBPI23), в условиях *in vitro* и *in vivo* ингибируют основные ЛПС-опосредованные эффекты (Ooi et al., 1987, 1991) благодаря их высокой эндотоксинсвязывающей способности. Неспецифическое электростатическое (заряд-заряд) взаимодействие основных групп (ϵ -NH₂ лизина, гуанидиновая аргинина) белка с кислотными компонентами (в первую очередь, по-видимому, с 3-дезоксид-Д-маннооуктлозоновой кислотой) липополисахарида внешней мембраны грамотрицательных бактерий является первым необходимым условием реализации конечного биологического эффекта. Надфизиологические (40–80 mM) концентрации Mg^{2+} или Ca^{2+} , препятствующие связыванию белка с поверхностью бактерий, блокируют и проявление его антимикробных свойств. Интересно, что резистентные к действию БПУб штаммы грамотрицательных (*Salmonella marcescens*, *Proteus vulgaris*) и грамположительных бактерий не способны адсорбировать его на своей поверхности (Elsbach, Weiss, 1983; Elsbach, Weiss, 1988a, 1988b). Чувствительность различных штаммов и видов грамотрицательных бактерий находится в прямой зависимости от степени сорбции на них бактерицидного белка. Шероховатые штаммы *Salmonella typhimurium* и *Escherichia coli*, несущие на своей поверхности больше анионных групп по сравнению с гладкими штаммами, более подвержены антимикробному действию БПУб вследствие его более эффективного связывания из среды. Можно отметить, что активности холобелка и его аминокислотного фрагмента в отношении шероховатых штаммов практически одинаковы, но рекомбинантный вариант N-концевой части молекулы (rBPI23) почти в 50 раз активнее БПУб в отношении гладких штаммов (Ooi et al., 1991), что связано, по-видимому, с облегченным доступом меньшего по размерам рекомбинантного фрагмента к местам инициального связывания с ЛПС-молекулами. Белок воздействует на широкий спектр видов грамотрицательных бактерий, включая как инкапсулированные, так и не содержащие капсул микроорганизмы. Чувствительность бактерий к белку в значительной степени зависит от структуры их оболочечных липополисахаридов, в особенности их полисахаридной цепочки, длинные цепи снижают сродство БПУб к ЛПС вследствие затруднения доступа к коровой анионной области молекулы эндотоксина (рис. 22).

В связи с особой значимостью присутствия ЛПС в оболочке грамотрицательных бактерий в реакции избирательного действия БПУб на эту группу микроорганизмов следует рассмотреть современное представление о структуре эндотоксинов (Raetz, 1990; Morrison et al., 1994). Липополисахарид (эндотоксин) наружной мембраны является «визитной карточкой» грамотрицательных бактерий. В составе клеточной стенки бактерий он вместе с белками и липидами

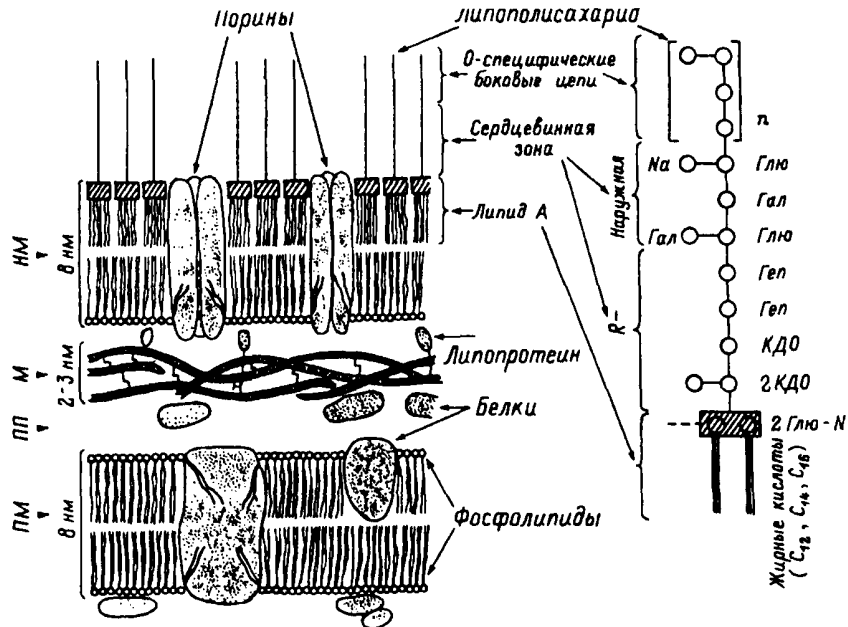


Рис. 22. Модель строения клеточной стенки грамотрицательных бактерий.

Непосредственно с цитоплазматической мембраной граничит муреиновый слой; с ним ковалентно связаны гидрофильные концы липопротеиновых молекул. Последние своими липофильными концами утоплены в липидный двойной слой, который содержит фосфолипиды и липид А, входящий в состав липополисахаридов. Гидрофильные О-специфические гетерополисахаридные боковые цепи полисахаридов направлены наружу (на схеме — вверх). Справа представлена липополисахаридная молекула.
 Глю — глюкоза, Глю-*N* — глюкозамин, *NA* — *N*-АцГлю-*N*-ацетилглюкозамин, Гал — галактоза, Геп — гептоза, КДО — 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота, *M* — муреин, *HM* — наружная мембрана, *ПМ* — плазматическая мембрана, *ПП* — периплазматическое пространство (Шлегель, 1987).

формирует надмолекулярный комплекс, известный как О-антиген. Липополисахарид состоит из связанных амидной связью полисахарида и липида А. Полисахаридная часть ЛПС ориентирована на поверхность микробной клетки и в значительной степени определяет серологическую специфичность О-антигена. Полисахарид, в свою очередь, состоит из антигенной боковой цепи, представляющей собой полимер из различных сочетаний абеквоты, маннозы, рамнозы, галактозы и глюкозы, которая, как правило, выступает над поверхностью клеточной оболочки (рис. 22) и сердцевинной (коровой) части, содержащей в качестве основных структурных компонентов несколько молекул 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (сокращенно КДО), гексозы, этаноламин и фосфорную кислоту. Три остатка КДО образуют структурный блок, связывающий двухвалентные катионы Mg и Ca. Комплекс КДО с катионами определяет в значительной степени некоторые структурно-функциональные свойства внешнего слоя наруж-

ной мембраны грамотрицательных бактерий. Удаление катионов с помощью таких хелатообразующих агентов, как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), приводит к разрыхлению наружной мембраны, освобождению (солюбилизации) из нее части молекул липополисахарида и изменению ее барьерных функций. В норме не проникаемая для гидрофобных соединений, в подобных условиях она начинает пропускать их внутрь клеточной стенки. Сердцевинный полисахарид ковалентно связан с липидом А, локализованным во внешнем слое наружной мембраны. Таким образом, структура наружной мембраны асимметрична, поскольку липополисахарид локализован исключительно в ее внешнем слое.

Липополисахариды (эндотоксины) в свободном состоянии являются биологически активными соединениями, определяющими многие нежелательные стороны патогенеза инфекционных заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями. В частности, при взаимодействии с клетками иммунной системы организма-хозяина они вызывают избыточную продукцию химически реактивных производных кислорода нейтрофильными гранулоцитами и цитокинов (IL-1, TNF и др.) моноцитами/макрофагами. В высоких концентрациях эти соединения могут приводить вместо защиты от инфекции к системному воспалению и инициировать повреждения наиболее важных жизнеобеспечивающих систем макроорганизма. Совокупность данных патологических проявлений известна в литературе и медицинской практике как эндотоксический шок, и борьба с этим синдромом представляет важную клиническую проблему (Watson et al., 1994). В связи с этим способность БПУб избирательно взаимодействовать и нейтрализовать ЛПС может служить основанием для его использования в медицинской практике. Уже в течение ряда лет ведутся работы в Нью-Йоркском университете (Elsbash, Weiss, 1993) и калифорнийской фармацевтической фирмой «Хома» по разработке эффективного антиэндотоксического препарата на основе БПУб. Было установлено, что не только природный БПУб (nBPI55), но и рекомбинантная форма его N-концевой части (rBPI23), полученная биотехнологическим способом, обладают высоким сродством ($K_d = 2-5$ нМ) к изолированным липополисахаридам многих грамотрицательных бактерий (Gazzano-Santoro et al., 1992) как в условиях *in vitro*, так и в цельной крови (Ooi et al., 1991), что очень важно с медицинской точки зрения. При этом имеет место блокада способности ЛПС запускать ряд реактивных процессов в клетках иммунной системы, в том числе и освобождение цитокинов. На уровне организма подобный эффект обеспечивает его защиту от летальной дозы ЛПС (Elsbash, Weiss, 1993).

Интересно, что структурно-гомологичный БПУб острофазовый ЛПС-связывающий белок плазмы крови человека (ЛПС-связывающий белок, ЛСБ) лишен подобной активности. Он в противоположность БПУб усиливает активность липополисахаридов (Tobias et al., 1992) как индукторов провоспалительных факторов.

Сочетание таких важных функциональных свойств у БПУб, как блокада действия ЛПС и прямое бактерицидное действие на грамот-

рицательную микрофлору, является основанием для его клинического применения. Проведены клинические испытания на добровольцах рекомбинантной формы N-концевого фрагмента БПУб (гВР123, или Neurhex), препарат оказался нетоксичным и лишенным иммуногенности. Кроме того, он эффективно подавлял ЛПС-индуцированную продукцию цитокинов, реактивность нейтрофильных гранулоцитов и нежелательные проявления в системе гемостаза (Von der Mohlen et al., 1995a, 1995b). В настоящее время осуществляется пробное применение в клинике гВР123 с целью снятия менингококковой эндотоксемии и последствий геморрагической травмы. Необходимо отметить то обстоятельство, что защитные свойства белка и его рекомбинантного N-фрагмента проявляются как внутри, так и вне специализированных клеток, в связи с чем он может рассматриваться как эффективное протективное средство и в парентеральном варианте применения (Ammons et al., 1994).

Последствия электростатического взаимодействия катионного белка с поверхностными областями клеточной оболочки грамотрицательных бактерий могут быть разнонаправленными. Предположительно имеет место конкурентное вытеснение ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} из наружной мембраны. Обычно эти ионы играют важную цементующую роль в формировании плотного слоя наружной мембраны, обогащенного липополисахаридами, путем образования поперечных солевых мостиков между его отдельными молекулами (Elsbach, Weiss, 1983, 1988a, 1988b). Разрыхление липополисахаридного слоя приводит к обнажению гидрофобных областей наружной мембраны и таким способом облегчает проникновение через них липофильных молекул (например, актиномицина Д). Такая последовательность физико-химических взаимодействий белка с внешними структурами микробной клетки соответствует экспериментально установленным фактам.

По-видимому, благоприятствует процессу нарушения проницаемости мембран (Mannion et al., 1990a, 1990b) наличие в составе БПУб структурных участков, обогащенных гидрофобными аминокислотами (в частности, пролином). Подобные белковые домены могут образовывать в липидном бислое мембран сквозные поры, наличие которых приводит к нарушению селективной проницаемости и утечке из клеток жизненно важных элементов и макромолекул. В пользу возможности существования такого характера взаимодействий в ходе поражения микробной клетки говорят данные опытов, в которых в качестве мишеней использовали бактерии с повышенной вязкостью наружной мембраны, отличающейся от мембран контрольных штаммов увеличенной концентрацией насыщенных жирных кислот (Elsbach, Weiss, 1988a, 1988b). Такие штаммы бактерий проявляли повышенную устойчивость к антимикробному действию БПУб. Следовательно, сочетание в структуре рассматриваемого белка свойств поликатионной и гидрофобной молекул делает его высокоэффективным мембранонарушающим агентом, функционирующим в роли поверхностно-активного вещества. Одним из следствий нарушения структурной целостности оболочки бактерий является активация в

ней аутолитических процессов, ведущих к последующему распаду фосфолипидов мембран и пептидогликанового скелета.

Заключительная (необратимая) стадия действия БПУб сопряжена со структурной дезорганизацией внутренней (цитоплазматической) мембраны (Mannion et al., 1990b) и блокадой в ней транспортных и энергетических процессов.

Активность БПУб в инактивации нейтрофильными гранулоцитами млекопитающих грамотрицательных бактерий усиливается еще рядом белково-пептидных соединений, выявленных в фагоцитах. В псевдоэозинофилах кролика обнаружены 2 структурно-родственных белка с молекулярной массой около 15 кДа (Ooi et al., 1993; Levy et al., 1993). Ни один из этих белков не проявляет антибактериальных свойств, однако одна из изоформ усиливает в несколько раз эффекты ранней обратимой фазы воздействия БПУб на бактерии. В то же самое время они подавляют ростиингибирующую активность БПУб. Оба белка проявляют ЛПС-связывающую способность и структурно гомологичны белкам CAP-18 кролика и кателину из лейкоцитов свиньи (см. рис. 17). Наряду с этим выявлен синергизм антимикробного действия БПУб человека с катепсином G, эластазой (Olsson et al., 1978) и дефенсинами (Levy et al., 1994).

Кооперативные взаимоотношения БПУб с другими факторами антимикробной защиты, по-видимому, не ограничиваются только белками лейкоцитарного происхождения. В частности, он избирательно активирует фосфолипазы бактериальной оболочки *Escherichia coli* (Wright et al., 1990a), что приводит к взаимосоусиливающему антимикробному действию белков. Фосфолипазы A2 из нейтрофилов (Wright et al., 1990b), сыворотки (Growl et al., 1991) и очагов воспаления также усиливают дозозависимым образом антимикробную активность БПУб. Кроме того, переход от первой (обратимой) фазы ко второй (необратимой) заметно ускоряется в присутствии терминальных компонентов комплемента (Mannion et al., 1990b), что можно рассматривать в качестве примера кооперации различных молекулярных факторов врожденного иммунитета.

ГЛАВА 3

ЛАКТОФЕРРИН

Лактоферрин (ЛФ) — негемовый железосвязывающий гликопротеин, впервые обнаруженный в молоке коров (Sorensen, Sorensen, 1939), рассматривается в настоящее время в качестве одного из неотъемлемых компонентов биохимической системы защиты животных от инфекции. В очищенном состоянии лактоферрина молока коров (Groves, 1960) и человека (Montreuil et al., 1960) представляют одноцепочечные белки с молекулярной массой около 80 кДа, способные в присутствии бикарбонатных ионов образовывать прочный комплекс с 2 атомами Fe³⁺ красного цвета (Masson, Heremans, 1968). В связи с этим в ранней литературе лактоферрин часто называли «красным белком» (*red protein*).

История и современное состояние исследований в области структуры и функций лактоферринов отражены в монографии Р. Masson (1970), материалах специального симпозиума (Hutchens et al., 1994) и ряде зарубежных обзоров (Aisen, Listowsky, 1980; Bezkorovainy, 1981; Reiter, 1983; Iyer, Lonnerdal, 1993). Лактоферрин широко представлен в клеточно-тканевых образованиях организма млекопитающих, он выявлен в большинстве барьерных эпителиев пищеварительного, респираторного и мочеполового трактов и их секретах, а также в экзокринных железах и их секретах (молоке, слюне, слезах, желчи, семенной и цервикальной жидкости, соке желудка, кишечника и поджелудочной железы) (Masson, 1970).

В 1969 г. ЛФ впервые был идентифицирован иммунохимически в гранулярном аппарате НГ человека и морской свинки (Masson et al., 1969). В ходе дальнейших исследований было однозначно показано, что ЛФ является маркерным белком специфических гранул НГ (Baggiolini et al., 1970; Miyauchi, Watanabe, 1987).

Структурная идентичность ЛФ молока и нейтрофильных гранулоцитов методами белковой химии впервые доказана для белков человека английскими исследователями (Moguilevsky et al., 1985) и нами при сравнительном анализе физико-химических свойств гомологичных белков свиньи (Кокряков и др., 1988). Первичная структура ЛФ молока человека была расшифрована в 1984 г. (Metz-Boutigue et al., 1984), а позднее подтверждена в ходе секвенирования его мРНК (Rado et al., 1987a, 1987b). Первичные структуры ЛФ молока человека

А

```

1GRRRRSVQWC AVSQPEATKC FQWQRNMRKV RGPVSVCIKR DSPIQCIQAI
AENRADAVTL DGGFIYEAGL APYKLRPVAE EVYGTERQPR THYAVAVVVK RGGSFQLNEL QGLKSCHTGL
RRTAGWNVPT GTLRPFNLWT GPPEPIEAAV ARFFSASCVP GADKGFPNL CRLCAGTGEN KCAFSSQEPY
FSYSGAFKCL RDGAGDVAFT RESTVFDLS DEAEDEYEL LCPDNRKPV DKFKDCHLAR VPSHAVVARS
VNGKEDAIWN LLRQAQEKFG KDKSPKFQLF GSPSGQKDLL FKDSAIGFSR VPRIDSGLY LGSYGFTAIQ
NLRKSEEEVA ARRARVWCA VGEQELRKN QWSGLSEGSV TCSSASTTED CIALVLKGEA DAMSLDGGYV
YTACKCLVLP VLAENYKSOQ SSDPDPNCVD RPVEGYLAVA VVRRSDTSLT WNSVKGKSC HTAVDRTAGW
NIPMGLLFNQ TGSCKFDEYF SQSCAPGSDP RSNLALCIG DEQENKCVF NSNERYYGT GFRCR LAENA
GDVAFVKDVT VLQNTDGNNN EAWAKDLKLA DFALLCLDGK RKPVTEARSC HLAMAPNHAV VSRMDKVERL
KQVLLHQQAK FGRNGSDCPD KFCLFQSETK NLLFNDNTEC LARLHGKTTY EKYLGPOQVA GITNLKKCST
SPLLEACEFL RK
    
```

Б

```

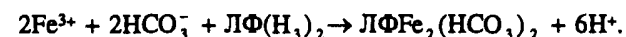
1APRKNVRWCT ISQPEWFKCR RNOWRMKLG AFSITCVRR FALECIARA
EKKADAVTLD GGMVFEAGR PYKLRPVAE IYGTKEFQT HYYAVAVVVK GSNFQLDQLQ GRKSCHTGLG
RSAGWVIFMG ILRPYLSWTE SLEPPPGAVA KFFSASCVP IDRQAYPNLC QLCKGEGENQ CACSSREPYF
GYSGAFKCLQ DGAGDVAFVK ETTVFENLPE KADRDQYELL CLNNSRAPDV PSHAVVARSV
DGKEDLIWKL LSKAQEKFGK NKSRSFQLFG SPPGQDRLF KDSALGFLRI PSKVDSALYL ASRYLTTLNK
LRETAEEVKA RYTRVVWCAV GPEEQKCKQ WSQSGQNVV CATASTDDC IVLVKGEAD ALNLDGGYIY
TAGKCGLVPV LAENRKKSKY SSLDCVLRPT EGYLAVAVVK KANEGLTWNS LKDKKSCHTA VDRTAGWNI
MGLIVNQTGS CAFDEFFSQS CAPGRDPKSR LCALCAGDDQ GLDKCVPNSE EKYGYGTGAF RCLAEADVGV
AFVKNDTWE NTNGESTADW AKNLNREDFR LLCLDGTTRP VTEAQSCHLA VAPNHAVVSR SDRAAHVKV
LLHQQLFEGK NGKNCDFKFC LFKSETKNLL FNDNTECLAK LGGRPTYEY LGTEYVTAIA NLKKCSTSP
LEACAFLTR
    
```

Рис. 23. Первичная структура лактоферринов человека (А) и крупного рогатого скота (Б).

Подчеркнуты последовательности, отвечающие структуре лактоферринов.

(Metz-Boutigue et al., 1984) и коровы (Pierce et al., 1991) приведены на рис. 23.

Функционально ЛФ представляют собой природные комплексоны (хелаторы) клеток и жидких сред организма, прочно связывающие и транспортирующие катионы металлов переменной валентности (Fe³⁺, Cr³⁺, Co³⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺). В естественных условиях они чаще всего взаимодействуют с ионами железа, меди и цинка. Реакция связывания ионов железа протекает с обязательным участием бикарбонатных анионов и схематически может быть представлена в следующем виде (Masson, 1970):



При этом образуется комплекс красного цвета с максимумом поглощения в видимой области при $\lambda = 460\text{—}470$ нм.

Комплексообразующая способность ЛФ лежит в основе детоксицирующей, транспортной и антимикробной функций этих белков. Остановимся более подробно на рассмотрении последней. Антимикробная активность ЛФ является однозначно установленным фактом (Ogam, Reiter, 1968; Masson, 1970; Reiter, 1983). Причем в преобладающем числе исследований продемонстрировано микростатическое действие белка. Создавая и поддерживая дефицитную по катионам железа и других металлов переменной валентности среду, ЛФ является одним из ведущих молекулярных факторов, сдерживающих размножение и рост бактерий и низших грибов на поверхности барьерных эпителиев и в условиях фаголизосом нейтрофильных гранулоцитов (Bullen et al.,

1978; Bullen, Armstrong, 1979). В частично насыщенном железом состоянии (по данным разных авторов, эта величина колеблется от 10 до 30 % от максимально возможной) лактоферрин посредством связывания ионов металлов переменной валентности из среды и поверхностных структур оболочек микроорганизмов лишает последних жизненно важных микроэлементов, входящих в состав цитохромов дыхательной цепи, каталаз, пероксидаз и супероксиддисмутаз, сдерживая таким образом рост и размножение бактерий и грибов и снижая их резистентность к токсическому действию химически реактивных производных кислорода. Естественно, что насыщенный железом ЛФ не проявляет в рассматриваемых условиях микростатической активности.

По мнению американского исследователя E. Weinberg (Weinberg, 1984), удержание железа лактоферрином и трансферрином во внутренней среде животного организма является одним из ведущих механизмов его защиты от инфекции и опухолевого роста. В рамках развиваемой им концепции он постулирует, что в природе существует жесткая конкуренция за необходимое для роста и размножения железо между клетками бактерий, низших грибов, простейших и опухолей, с одной стороны, и клетками организма-хозяина — с другой. В связи с этим в клетках, тканях и жидких средах организма-хозяина эволюционно вырабатывается набор молекулярных механизмов удержания (секвестрирования, депонирования) железа, которые обеспечивают его резистентность к инфекции и опухолевой прогрессии. Лактоферрин и трансферрин как раз и являются ведущими молекулярными компонентами рассматриваемой системы врожденного иммунитета (естественной резистентности).

Известно из клинических и экспериментальных наблюдений, что гипоферремия плазмы крови в сочетании с гипертрансферринемией препятствуют развитию инфекции в организме. Введение в организм экзогенного железа усиливает у больных и экспериментальных животных (Bullen et al., 1978) инфекционный процесс. С целью усиления железосвязывающего (*iron-withholding*) процесса в животном организме автор гипотезы рекомендует умеренное ограничение железа и меди в диете, введение железосвязывающих белков (лактоферрин, трансферрин, ферритин) и других хелаторов, терапию интерлейкином 1 (IL-1), которая индуцирует плазменную гипоферремию (Weinberg, 1984). С нашей точки зрения, эта концепция в ее приложении к медицине и ветеринарии может дать плодотворные результаты.

В серии работ (Arnold et al., 1977, 1980, 1981, 1982) наряду с микростатическим было установлено и прямое бактерицидное действие ЛФ в отношении некоторых видов микрофлоры (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mutior*, *S. pneumoniae* ATCC 6303, *Vibrio cholerae* 5698, *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Это свойство, как и в случае появления его микростатической активности, присуще только насыщенному железом ЛФ (аполактоферрину). Однако механизм подобного действия остается во многом неясным. Можно предположить, что в условиях этих экспериментов бактерицидность аполакто-

феррина являлась результатом ряда изменений в структуре оболочек бактерий. Например, известна способность ЛФ высвободить (высвободить) молекулы липополисахаридов (эндотоксинов) из наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Ellison et al., 1988, 1990; Ellison, Giehl, 1991). По мнению авторов, это происходит в результате связывания лактоферрином Mg^{2+} и Ca^{2+} , которые стабилизируют наружную мембрану. Подобным дестабилизирующим образом действует на мембраны известный хелатор ЭДТА. Наряду с этим возможно и прямое электростатическое взаимодействие слабоосновных молекул ЛФ (pI ~ 8.5) с карбоксильными группами 2-кето-3-дезоксидиктоновой кислоты (КДО) сердцевинного полисахарида и фосфатными остатками липида А (Appelmelk et al., 1994), входящими в молекулы липополисахарида. Завершается такое взаимодействие высвобождением последних из наружной мембраны и нарушением ее целостности и барьерной функции. Подобным образом на грамотрицательные бактерии действует пептидный антибиотик микробного происхождения полимиксин В.

Само по себе рассмотренное воздействие ЛФ на структуру наружной мембраны оболочки грамотрицательных бактерий не может привести к цитотоксическому эффекту. Есть основания предполагать, что в процессе дезорганизации оболочечной структуры бактерий может иметь место активация микробных ферментов (вскрытие их латентной активности), например фосфолипаз, гликаназ, приводящая к аутоповреждению клеток, с которыми взаимодействует лактоферрин. Сходный механизм антимикробного действия реализуется частично БПУБ из нейтрофильных гранулоцитов человека и кролика (Elsbach, Weiss, 1993). В пользу существования избирательного взаимодействия ЛФ и эндотоксина свидетельствуют результаты эксперимента, в котором парентерально введенный ЛФ коровы защищал мышей, инфицированных летальной дозой *Escherichia coli* (Zagulski et al., 1989). Не исключены и другие варианты трактовки протективного эффекта гетерологичного ЛФ в организме мышей, например проявление опсонизирующей активности белка.

Наконец, бактерицидные свойства ЛФ в отношении некоторых видов микроорганизмов могут быть объяснены образованием коротких основных (катионных) пептидов из N-концевых участков белка путем ограниченного протеолиза. Впервые на возможность подобного пути вовлечения ЛФ в формирование неспецифической антимикробной резистентности указали японские исследователи (Saito et al., 1991). В ходе кислотного гидролиза ЛФ крупного рогатого скота ими был выделен пептид, представляющий фрагмент N-концевой части молекулы из ее первых 54 аминокислотных остатков, — $^1APRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRAFALECI R A I A E K K A^{54}$, а при обработке пепсином — более короткий участок: $^{17}FKCRRWQWRMCKLGAPSITCVRRA^{41}$. Последний получил в литературе название лактоферрицин В (Bellamy et al., 1992). Оба пептида обладают существенно большим микробицидным действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии и грибы, нежели исходная мо-

лекула. Установлено наличие дисульфидной связи в лактоферрицине В, а в его функциональном гомологе из ЛФ молока человека — лактоферрицине Н (¹GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFWQRNMRKVRGPRVSCIKRDSPIQCI⁴⁷) — два S—S-мостика (Tomita et al., 1994). Интересно, что идентичный лактоферрицину В пептид выделен из содержимого желудка крыс линии Wistar, которых в течение 4 дней подерживали на специальной диете, содержащей 40 % коровьего лактоферрина. Это первое свидетельство образования антимикробных пептидов из ЛФ в условиях *in vivo*. Механизм антимикробного действия рассматриваемых пептидов сходен, скорее всего, с таковым дефенсинов, протегринов, бактенецина и других антибиотических пептидов животного происхождения.

Таким образом, столь разнообразными путями ЛФ может вовлекаться в процесс инактивации фагоцитированных или находящихся на поверхности барьерных эпителиев микроорганизмов. Необходимо учитывать, что в реальных условиях организма ЛФ как составной элемент системы молекулярной защиты от инфекции вступает в кооперативные взаимодействия усиливающего характера с другими факторами врожденного иммунитета, такими как лизоцим (Ellison, Giehl, 1991), протеиназы пепсинового типа (Bellamy et al., 1992), кислород-зависимая миелопероксидазная система (Кокряков и др., 1989). Подробнее особенности такого взаимодействия описаны в следующей главе, посвященной свойствам пероксидаз.

Итак, ЛФ в интактном состоянии, будучи слабым микробоцидным агентом, тем не менее создает условия, препятствующие размножению микроорганизмов и способствующие реализации антимикробных свойств лизоцима (Ellison, Giehl, 1991) и миелопероксидазной системы (Кокряков и др., 1989а); причем рассматриваемые процессы кооперации антимикробных белков могут иметь место не только в фаголизосомах нейтрофильных гранулоцитов, но и на поверхности слизистых покровов и в некоторых секретах (слезы, слюна, молоко) организма (Шварцман, Хазенсон, 1978).

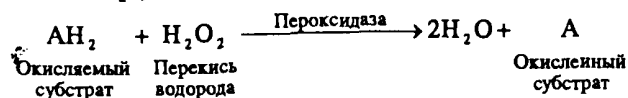
Клинические наблюдения свидетельствуют в пользу обоснованности представлений о важной антимикробной функции ЛФ. Выявлены больные с рецидивирующими инфекционными заболеваниями, часто стафилококковой этиологии, в нейтрофильных гранулоцитах которых отсутствуют специфические гранулы и их составные компоненты, в частности ЛФ (Spitznagel et al., 1972; Breton-Gorius et al., 1980; Gallin, 1992). При этом поглотительная и дегрануляционные функции таких НГ не нарушены, но в них существенно подавлена способность инактивировать фагоцитированные бактерии. Снижение бактерицидной активности НГ больных гранулоцитарной лейкемией некоторые исследователи также связывают с дефицитом в их гранулярном аппарате ЛФ (Olofsson et al., 1976). Недостаточность ЛФ во внутренней среде организма может приводить к нарушению ряда процессов гуморально-клеточной кооперации клеток иммунной системы, в которых предполагается регуляторное участие лактоферрина, продуцируемого нейтрофильными гранулоцитами.

Наряду с антимикробной активностью ЛФ в различных модельных условиях способен стимулировать NK-клетки (Horwitz et al., 1984; Shau et al., 1992), антителозависимую клеточную цитотоксичность (De Sousa et al., 1988), лимфокинами активированные киллерные клетки (Shau et al., 1992), нейтрофильные гранулоциты и макрофаги (Gahr et al., 1991). Все эти клетки в той или иной степени отвечают за поддержание необходимого уровня как антимикробной резистентности, так и противоопухолевой защиты организма (Bezault et al., 1994; Yoo et al., 1997). ЛФ усиливает адгезивность, хемотаксис и дыхательный взрыв нейтрофильных гранулоцитов (Oseas et al., 1981a, 1981b; Kurose et al., 1994). Системное влияние ЛФ на защитные функции организма может быть опосредовано его способностью (которая была установлена в культуральных условиях (Broxmeyer, Platzer, 1984) и *in vivo* (Broxmeyer et al., 1978)) подавлять продукцию гранулоцит-моноцит колониестимулирующего фактора моноцитами и макрофагами. В связи с этим свойством ЛФ может рассматриваться в качестве одного из негативных регуляторов миелопоэза (Mantel et al., 1994). Все это вместе взятое свидетельствует о широком функциональном поле ЛФ в рамках клеточно-молекулярных механизмов, отвечающих за реакции врожденного и приобретенного иммунитета.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ ПЕРОКСИДАЗ ФАГОЦИТОВ

Одним из ведущих гранулярных компонентов антимикробной системы фагоцитов, тесно связанным в своем функционировании с метаболитами респираторного взрыва (Segal, 1991), является пероксидаза. В нейтрофилах и моноцитах/макрофагах локализована миелопероксидаза (Agner, 1941a, 1941b; Klebanoff, 1967; Klebanoff, 1980a, 1980b; Andersen et al., 1982), в эозинофилах — эозинофильная пероксидаза (Борисов и др., 1982; Klebanoff et al., 1989). Содержание фермента в нейтрофилах человека колеблется от 1 до 5 % сухого веса клеток (Agner, 1941a, 1941b; Schultz, Kaminker, 1962) и составляет 2—4 мг на 10⁹ лейкоцитов. Миелопероксидаза является маркерным белком азурофильных гранул нейтрофилов. Она входит в качестве фермента в состав микробоцидной миелопероксидазной системы, которая включает в себя также окислитель (перекись водорода — H₂O₂) и кофакторы (I⁻, Cl⁻, Br⁻, CNS⁻) (Роговин и др., 1977; Шафран, 1981; Klebanoff, 1967, 1992).

В настоящее время получены и охарактеризованы по физико-химическим свойствам миелопероксидазы человека (Andersen et al., 1982) и ряда видов животных (Шафран, 1981; Борисов и др., 1982; Кокряков и др., 1982; Agner, 1972; Harrison et al., 1977; Klebanoff, 1980a, 1980b). Ферменты из разных источников характеризуются заметным сходством биохимических параметров. Миелопероксидазы (МПО) относятся к окислительно-восстановительным ферментам (КФ 1.11.1.7), окисляющим перекисью водорода (H₂O₂) и некоторыми гидроперекисями (R-O-O-H) различные по химической природе соединения (органические кислоты, ароматические амины, фенолы, анионы галоидов и др.):

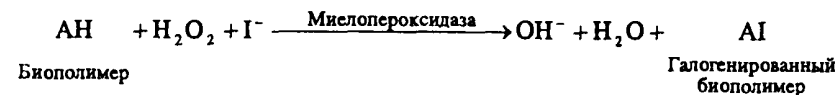


Гены МПО человека были клонированы в ряде лабораторий (Chang et al., 1986; Morishita et al., 1987). Исходный продукт трансляции белка представляет собой молекулу с массой около 84 кДа (Nauseef et al., 1988). Последующий процессинг и присоединение углеводной цепочки, состоящей из маннозы, формируют молекулу проМПО с молеку-

лярной массой 89 кДа. Далее происходит отщепление 125 аминокислотных остатков и расщепление оставшейся молекулы на большую α-субъединицу (57 кДа, 467 аминокислот) и малую β-субъединицу (12 кДа, 112 аминокислот). Молекула конечной зрелой миелопероксидазы состоит из двух протомеров, связанных дисульфидной связью, в состав каждого из которых входит по одной α- и β-цепи. Гем, представляющий собой железосодержащий хлорин, ковалентно связан с тяжелой гликозилированной α-цепью (Wu, Schultz, 1975; Hurst, 1991). Холоферменты МПО из других видовых источников построены по рассмотренному типу (Klebanoff, 1991, 1992).

Все изученные миелопероксидазы (Борисов и др., 1982; Кокряков и др., 1982; Agner, 1941a, 1941b; Klebanoff, 1980a, 1980b) являются катионными белками с изоточкой (pI) выше 10. Несмотря на катионный характер своих молекул, миелопероксидазы сами по себе обладают незначительной микробоцидной активностью (Klebanoff, 1967), существенно возрастающей в присутствии перекиси водорода (H₂O₂) и одного из анионов галоидов (I⁻, Cl⁻, Br⁻). Миелопероксидазная система (МПО-система) подавляет жизнедеятельность бактерий (Klebanoff, 1967), грибов (Lehrer, 1969), микоплазм (Jacobs et al., 1972) и вирусов (Belding et al., 1970), т.е. является универсальным антимикробным фактором.

В одном из первых выдвинутых и доказанных механизмов бактерицидного действия МПО-системы галогенирование биополимеров (белков, полисахаридов, ненасыщенных жирных кислот) микробной клетки рассматривалось в качестве основного результата ее функционирования (Klebanoff, 1967). Галогенирование некоторых аминокислот (тирозин, гистидин, триптофан) в составе белков микроорганизмов приводит к нарушению их надпервичных структур и, как следствие, к потере ими функциональной активности (Morrison, Shonbaum, 1976). Реакция протекает по следующей схеме:

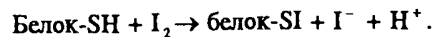


Указанная реакция лежит в основе перевода иода из свободного в органически связанное состояние, что является одним из показателей респираторного взрыва нейтрофилов. Нейтрофилы больных хронической грануломатозной болезнью с генетически обусловленным дефектом в системе окисления никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН-оксидазная система) характеризуются сниженной способностью связывать иод с биополимерами клетки и фагоцитированных микроорганизмов (Segal, 1991). Ингибирование пероксидазной активности intactных лейкоцитов азидом или цианидом резко подавляет переход иода в кислотонерастворимую (связанную) форму (Klebanoff, 1967). Что касается природы соединений, связывающих иод, то ими, по всей вероятности, являются в первую очередь белки, поскольку обработка общего белка фагоцитирующих нейтрофилов протеиназой (проназой) приводит к освобождению в среду иодированных форм тирозина — моно- и диодтирозина.

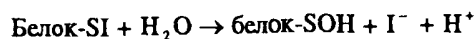
Часто доводом против рассматриваемого механизма действия миелопероксидазной системы служили данные об относительно низкой концентрации иода в нейтрофилах. По мнению E. Thomas и T. Aune (1977, 1978a, 1978b), содержание иодида достаточно для осуществления бактерицидной функции миелопероксидазной системы, но при условии, если реакции галогенирования имеют следующую последовательность: сначала пероксидаза окисляет перекисью водорода иодид до иода:



образовавшийся иод реагирует с SH-группами белков микроба:



Высвобождение иодида из образующихся SI-производных может осуществляться 2 путями:

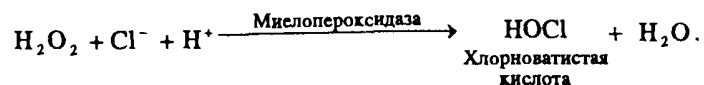


или



Таким образом осуществляется опосредованное анионом иода (I^-) окисление сульфгидрильных групп белков, которое является одной из непосредственных причин снижения жизнеспособности бактерий. При этом иодид в этом процессе не расходуется, хотя и является на его отдельных этапах переносчиком окислительных эквивалентов с перекиси водорода на белки микроорганизмов. В опытах с *Escherichia coli* эта схема получила частичное подтверждение.

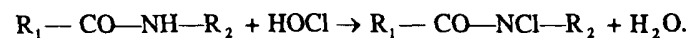
При использовании хлорида в качестве кофактора МПО-системы последовательность и характер реакций, ведущих к гибели микробов, имеют иную направленность (Agner, 1972). Согласно одной из предложенных схем (Zgliczynski et al., 1966), миелопероксидаза окисляет сначала анион хлора до катиона в составе гипохлоритного иона (OCl^-):



Образовавшаяся хлорноватистая кислота без участия фермента взаимодействует в кислой среде с аминокислотами (аспарагиновой, аланином, серином, лизином) с образованием соответствующих хлораминов:

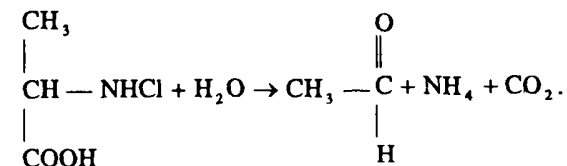


R. Selvaraj с соавт. (1974) показали, что хлорноватистая кислота способна реагировать с пептидными связями в микробных белках, образуя хлорамиды:



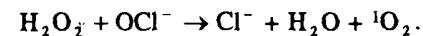
Хлорамиды, в свою очередь, гидролизуются с разрушением пептидной связи и формированием NCl-пептидов. Последние, как и хлорамиды свободных аминокислот, окисляют компоненты микроба, усиливая первоначальные структурные нарушения (Thomas, 1979).

Хлорамиды аминокислот под действием воды разлагаются на следующие соединения:



Образующиеся в конечном счете альдегиды как раз и являются, по образному выражению А. Сент-Дьердьи (1971), «когтями и клыками» макроорганизма в защите от разнообразных инфекционных агентов, поскольку они активно реагируют с функционально важными группами чужеродных макромолекул ($-SH$, $-NH_2$, $-OH$), лишая их биологически значимой активности. По предположению группы авторов (Rosen, Klebanoff, 1982, 1985; Klebanoff, 1985), гипохлорит может окислять железосерные центры некоторых электрон-транспортных белков, в частности кофакторов сукцинатдегидрогеназы, что приводит к нарушению функционирования дыхательной цепи бактерий и разобщению окисления с фосфорилированием. Одним из последствий подобного воздействия МПО-системы является падение мембранного потенциала и снижение жизнеспособности микробной клетки.

В литературе рассматривается схема антимикробного действия МПО-системы, связанная с продукцией синглетного кислорода (Allen, 1975):



Синглетный кислород, являясь электрофилом (Осипов и др., 1990), активно взаимодействует с полиненасыщенными жирными кислотами фосфолипидов, инициирует их перекисное окисление, нарушающее целостность цитоплазматической мембраны бактерий.

Столь разнообразные механизмы антимикробного действия миелопероксидазной системы отнюдь не исключают друг друга и являются, скорее всего, основой ее многонаправленного действия на структуры и обменные процессы бактерий, грибов и вирусов. Именно это обстоятельство определяет ведущую роль МПО-системы среди других мик-

робоцидных кислородзависимых систем нейтрофилов и моноцитов (Klebanoff, 1992). Эффективность антимикробного действия миелопероксидазной системы зависит от многих факторов: концентрации перекиси водорода, pH среды, структурной организации микробных клеток. Немаловажную роль в реализации ее микробоцидных свойств играет катионный характер молекулы пероксидазы. Для доказательства значимости адсорбции миелопероксидазы на поверхности бактериальных клеток в реализации микробоцидной активности всей системы в целом удачный методический прием был использован О. Ю. Янковским с соавт. (Янковский и др., 1978, 1981). Авторы получили специфические антитела к миелопероксидазе, которые не влияли на каталитические реакции, осуществляемые ферментом, но существенно снижали способность последнего к адсорбции на поверхности клеток *Escherichia coli*. Добавление таких антител в тест-систему *in vitro*, состоящую из микробной взвеси и миелопероксидазной системы, заметно подавляло бактерицидное действие фермента. Нормальная сыворотка не обладала ингибирующим влиянием. По заключению исследователей, электростатическое связывание миелопероксидазы с поверхностью бактериальных клеток-мишеней является необходимым условием реализации антимикробного действия МПО-системы, обеспечивающим непосредственный контакт продуктов ферментативного катализа (OI^- , OCl^- , O_2^- , альдегиды) с поражаемыми молекулами инактивируемого микроорганизма. Значимость адсорбции фермента на клетках-мишенях была установлена и *in vivo*.

На модели почечного кандидоза у мышей-самцов линии Swiss Webster, индуцированного введением в хвостовую вену 10^6 blastospore *Candida albicans*, было изучено лечебное действие миелопероксидазы (Wright, Nelson, 1985). Внутривентральное однократное введение МПО человека на следующий день после инфицирования заметно повышало выживаемость мышей. К 60-му дню наблюдения в этой группе выживало 80 % животных, в то время как в контрольной (введение забуференного физиологического раствора) — только 25 %. Терапевтическое действие МПО в этом исследовании продемонстрировано однозначно, однако остается неясным его механизм. Нейтрализующее терапевтическое действие миелопероксидазной системы одновременно с МПО введение компонентов клеточной стенки гриба (маннанов) свидетельствует в пользу значимости адсорбции фермента на микробной клетке как необходимого условия реализации его кандидоцидного действия.

Во многих отношениях сходное действие на микроорганизм оказывает эозинофильная пероксидаза (Klebanoff et al., 1983; Gleich, Adolphson, 1986; Klebanoff et al., 1989). В отличие от миелопероксидазы ЭПО является более основным белком, состоящим из большой (50 кДа) и малой (10—15 кДа) субъединиц. Молекулярные массы известных ЭПО находятся в пределах 65—80 кДа.

Клонирование гена ЭПО человека и его сиквенс позволили определить точную первичную структуру белка, а также сравнить ее со структурой миелопероксидазы (Ten et al., 1989). Гомология первич-

ной структуры ЭПО человека и МПО человека составила 68.3 %, что дает основание для предположения о происхождении белков от общего гена, структура которого в процессе эволюции дивергировала на гены ЭПО и МПО. Нами с использованием других методических подходов также было осуществлено сравнительное биохимическое изучение МПО и ЭПО из лейкоцитов свиньи (Борисов и др., 1982). Анализ аминокислотного состава сравниваемых пероксидаз выявил значительное сходство ферментов из двух источников. В ЭПО, однако, выше доля основных аминокислот (аргинин, лизин, гистидин) и ниже — дикарбоновых (глутаминовая и аспарагиновая), что и находит свое отражение в более щелочном характере их молекул. Выявлена значительная степень структурной гомологии сравниваемых ферментов методом пептидных карт. Из 57 пептидов МПО свиньи и 65 — ЭПО свиньи общими оказались 50. Эти данные позволили также высказать предположение о происхождении генов сравниваемых пероксидаз от одного исходного предкового гена.

Рассмотрение биохимических основ респираторного взрыва нейтрофилов и сопряженных с ним механизмов инактивации и разрушения микроорганизмов миелопероксидазной системой однозначно говорит в пользу биологической значимости этой стороны функционирования фагоцитов. Однако накопившиеся в настоящее время клинические и экспериментальные данные дают основание для частичной переоценки сложившихся в 70-е годы (Klebanoff, Clark, 1978) представлений о доминирующей роли кислородзависимых антимикробных систем фагоцитов в осуществлении ими защитных реакций.

Так, среди больных хронической грануломатозной болезнью (ХГБ) выявлены пациенты, не страдающие от тяжелых рецидивирующих инфекционных заболеваний (Hill, 1984; Gallin, 1992), с обычной средней продолжительностью жизни. Это говорит, с одной стороны, о разнообразии клинических форм ХГБ, а с другой — о существовании в нейтрофилах компенсаторных защитных систем, не зависящих в своем антимикробном действии от дыхательного взрыва.

Интерес к исследованию антимикробных свойств рассмотренных нами белков нейтрофилов (лактоферрин, миелопероксидаза) диктуется необходимостью выяснения их роли в формировании резистентности организма к инфекции. Он поддерживается постоянными клиническими наблюдениями о дефиците или полном выпадении того или иного звена микробоцидного потенциала фагоцитов (Hill, 1984; Gallin, 1992). По заключению одного из ведущих специалистов в этой области исследований (Hill, 1984), именно дефициты в молекулярных механизмах, обеспечивающих киллинг фагоцитированных микроорганизмов, обуславливают более тяжелый характер развития инфекционной патологии у больных по сравнению с пациентами, у которых нарушены только хемотаксис, адгезия или эндоцитоз нейтрофилов. Известна повышенная чувствительность людей к грибковой инфекции с дефицитом в их нейтрофилах миелопероксидазы (Lehrer, Cline, 1969; Parry et al., 1981). Значительное снижение резистентности организма к бактериальной инфекции наблюдается в случаях с наследст-

венно обусловленным отсутствием или дефицитом специфических гранул нейтрофилов и их основного компонента — лактоферрина (Spitznagel et al., 1972; Strauss et al., 1974). Подобные же морфобиохимическая и функциональная особенности нейтрофилов встречаются при острой и хронической гранулоцитарных лейкозах (Odeberg et al., 1976) и ожоговой болезни (Davis et al., 1980) у людей. Во всех рассмотренных примерах функциональная неполноценность нейтрофилов обусловлена в значительной степени отсутствием или недостаточностью в них лактоферрина. Это тем более парадоксально, что сам по себе этот белок обладает слабой микробицидной активностью (Arnold et al., 1977, 1980) и его действие на микроорганизмы оценивается большинством исследователей (Masson, 1970; Reiter, 1983) как микростатическое. Возможно, что лактоферрин, будучи слабым цитотоксическим агентом, в составе фаголизосом вступает в разнообразные кооперативные взаимодействия с другими антимикробными веществами (в том числе с миелопероксидазой), которые определяют эффективность умерщвления фагоцитированных бактерий и грибов.

С целью проверки выдвинутого предположения мы провели работу по моделированию некоторых сторон такого взаимодействия в условиях *in vitro*, которые по ряду своих параметров (кислотное значение pH среды, наличие перекиси водорода и иодида) аналогичны содержимому фаголизосом. В этих условиях аполактоферрин (АЛФ) свиньи — форма белка, лишенного железа, в которой он, по-видимому, преимущественно находится в нейтрофилах (Bullen, Armstrong, 1979), — в концентрации 20 мкг/мл инкубационной пробы не проявляет бактерицидной активности в отношении стафилококковой культуры *Staphylococcus epidermidis*, штамм 9198 (табл. 1). Повышение концентрации белка до 1 мг/мл практически не сказывается на жизнеспособности бактерий. Этот факт находится в полном соответствии с литературными данными (Arnold et al., 1980).

Следующий этап работы состоял в выяснении характера воздействия на стафилококки АЛФ и миелопероксидазной системы нейтрофилов свиньи при их совместном испытании. При таком сочетании лейкоцитарных белков воспроизводятся отдельные стороны их кооперативного антимикробного действия в фаголизосомах после слияния с ними содержимого специфических и азурофильных гранул (Vaington, 1973). Микробицидное действие МПО-системы изучено хорошо (Klebanoff, 1967, 1968). Его интенсивность в значительной мере зависит от концентрации отдельных ингредиентов системы и в первую очередь фермента. Нами были подобраны такие соотношения компонентов МПО-системы, при которых ее стафилоцидный эффект был незначителен. Совместное испытание в тест-системе АЛФ и МПО-системы выявило существенный синергический бактерицидный эффект. Наблюдается отмирание количества колониеобразующих микробных единиц на три порядка больше по сравнению с вариантами отдельного испытания анализируемых белков. Бактерицидное действие зависит от наличия всех веществ, составляющих коопера-

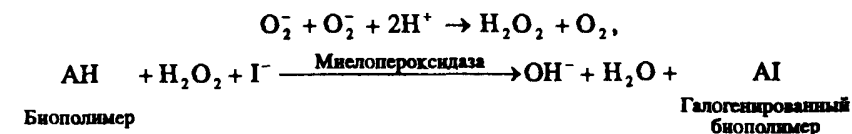
Влияние антимикробных веществ нейтрофилов свиньи на стафилококки в условиях *in vitro*

Состав инкубационной пробы	Количество микробных единиц ((M ± m) × 10 ⁴), образующих колонии
Буфер (основной контроль)	170 ± 19
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI	168 ± 14
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, АЛФ	167 ± 12
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, МПО	120 ± 9
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, АЛФ, МПО	0.145 ± 0.02 (p < 0.001)
Буфер, NaI, АЛФ, МПО	166 ± 12
Буфер, H ₂ O ₂ , АЛФ, МПО	168 ± 12
Буфер, 0.1M NaCl, H ₂ O ₂ , NaI, АЛФ, МПО	167 ± 9
Буфер, АТ к ЛФ, H ₂ O ₂ , NaI, АЛФ, МПО	125 ± 6
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, СОД, АЛФ, МПО	0.139 ± 0.05 (p < 0.001)
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, каталаза, АЛФ, МПО	168 ± 9
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, ЛФ, МПО	131 ± 7
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, АЛФ, МПО, аскорбат	161 ± 12
Буфер, H ₂ O ₂ , NaI, МПО, аскорбат	121 ± 6

Примечание. Буфер — 0.1 M Na-ацетатный буфер, pH 5.5. Конечные концентрации ингредиентов в мл инкубационной среды: H₂O₂ — 5 нМ; NaI — 0.1 мкМ; АЛФ и ЛФ — 20 мкг/мл; МПО — 0.05 мкг/мл; СОД — 5 мкг/мл; каталаза — 60 мкг; аскорбат — 1 мМ; АТ — антители к ЛФ.

тивную систему, так как исключение любого из них практически полностью снимает синергический эффект.

Как можно объяснить наблюдаемый феномен? По-видимому, аполактоферрин, сорбируясь на клеточной оболочке стафилококков, вступает в молекулярное взаимодействие с белками, в состав которых входят Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺. Среди них есть микробные супероксиддисмутазы и каталаза, которые вследствие потери важных металлов каталитического центра инактивируются. Это приводит к обогащению области поверхностных структур бактерии супероксидом (O₂⁻) и продуктом его спонтанной дисмутации — перекисью водорода (H₂O₂). Постоянная продукция окислителя в этих условиях поддерживает на более высоком уровне активность миелопероксидазной системы, что находит свое отражение в заметной гибели стафилококковых клеток. Последовательность происходящих при этом реакций можно представить себе следующим образом:



Так, в ходе совместного взаимоусиливающего кооперативного действия МПО-системы и АЛФ формируется мощная бактерицидная система, существенно превосходящая по своей силе составляющие ее вещества. В пользу обоснованности выдвигаемого механизма синергизма антимикробных белков свидетельствуют чувствительность системы к экзогенной каталазе и независимость ее от супероксиддисмутазы. Повышение ионной силы инкубационной среды до 0.2, как и внесение в нее антител к ЛФ, отменяют синергический эффект, так как препятствуют сорбции АЛФ на поверхности стафилококковых клеток. Неактивна система при добавлении в среду насыщенного железом лактоферрина и аскорбиновой кислоты — ловушки супероксидных анионов (Nishikimi, 1975). Есть основания считать, что установленное нами кооперативное антимикробное действие белков является не только лабораторным феноменом, но и отражает объективно существующие закономерности взаимодействия гранулярных факторов при фагоцитозе и воспалении. В свете этих экспериментальных данных становится понятной роль лактоферрина в обеспечении полноценной микробицидной функции нейтрофилов как компонента, создающего условия для пролонгированного действия МПО-системы.

Миелопероксидаза может проявлять еще ряд функциональных активностей в процессах фагоцитоза и воспаления.

На некоторые клетки она действует модифицирующим образом. В частности, инкубация МПО-системы с тромбоцитами приводит к выбросу из них серотонина (Clark, Klebanoff, 1979a, 1980), что можно рассматривать в качестве провоспалительного эффекта.

Миелопероксидазная система может ослаблять функциональную активность естественных киллеров (NK-клеток) (El-Hag, Clark, 1987) в культуре клеток. Это воздействие обратимо, поскольку через 24 ч после начала экспозиции с МПО-системой функциональная активность лимфоцитов восстанавливается. Все три основных типа лимфоцитов (В- и Т-лимфоциты, NK-клетки) подвержены ингибиторному воздействию со стороны миелопероксидазной системы. Наиболее чувствительны к ней антителопродуцирующие В-лимфоциты, а естественные киллеры и Т-лимфоциты — в меньшей степени.

Миелопероксидаза как модификатор структуры медиаторов и ферментов может вовлекаться в разнообразные стороны протекания воспалительных процессов. В частности, миелопероксидазная система может инактивировать один из ведущих ингибиторов сериновых протеиназ — α -1-ингибитор протеиназ (α -1-антитрипсин), окисляя его метионильные остатки (Matheson et al., 1979; Matheson, Travis, 1985). Непосредственно инактивирующим α -1-ингибитор агентом является гипохлорная кислота — один из основных продуктов МПО-системы. Инактивация α -1-ингибитора протеиназ может приводить к нарушению баланса сериновые протеиназы — ингибиторы в очагах воспаления.

МПО может усиливать протеолитический потенциал очагов воспаления путем активации коллагеназы (Weiss et al., 1985) и желатиназы (Perppin, Weiss, 1986) нейтрофилов. Коллагеназа — металлоэнзим, со-

храняющийся в латентной форме в гранулах нейтрофилов. После активации и секреции из клеток она избирательно расщепляет межклеточный коллаген.

Окисляя ϵ -аминогруппы лизиновых остатков эластина (Clark et al., 1986) и других белков (Stahmann et al., 1977) миелопероксидазная система инициирует сшивание белковых молекул, которое может приводить к образованию нерастворимых полимеров, откладывающихся в воспаленной соединительной ткани. Так же, по-видимому, могут формироваться в очагах воспаления и агрегаты иммуноглобулинов IgG (Stahmann, Spencer, 1977).

Наряду с провоспалительными эффектами некоторые функциональные проявления МПО-системы могут рассматриваться как направленные на снижение интенсивности воспалительного процесса. В частности, МПО-система путем окисления инактивирует такие медиаторы воспаления, как лейкотриены B_4 (Henderson et al., 1982) и C_4 (Lee et al., 1983). Она в состоянии инактивировать также растворимые хемотаксические пептиды — $C5a$ и формилметионильные пептиды (Clark, Klebanoff, 1979; Clark, Szot, 1982). Молекулярный механизм инактивации этих пептидов связан с окислением тиоэфирной группы метионина (Clark et al., 1980), которое приводит к снижению аффинитета хемотаксинов к мембранным рецепторам. Возможно, что благодаря такому процессу происходит снижение потока миграции нейтрофилов в ткани в конце первой фазы острой воспалительной реакции.

Важным фактором регуляции фагоцитарного и воспалительного процессов является, по-видимому, способность МПО-системы инактивировать белковые токсины микроорганизмов. В модельной системе *in vitro* была продемонстрирована ее способность инактивировать дифтерийный и столбнячный токсины (Agner, 1950, 1958), гемолитический токсин из *Streptococcus pneumoniae* (Clark, 1986), а также токсин цитоплазмы *Clostridium difficile* (Ooi et al., 1984).

Таким образом, функциональные проявления миелопероксидазной системы при фагоцитозе и воспалении могут быть многообразными, а часто и разнонаправленными. И если ее роль как антимикробной системы доказана однозначно (Klebanoff, 1992), то биологическая значимость ряда других ее активностей требует дополнительных обоснований.

К цитотоксическому действию МПО-системы чувствительны не только микробы, но и клетки макроорганизма. Она лизирует, в частности, эритроциты (Klebanoff, Clark, 1975), сперматозоиды (Klebanoff, Smith, 1970) и опухолевые клетки (Clark et al., 1975) в модельных системах *in vitro*.

Воздействие МПО-системы на опухолевые клетки представляет интерес в связи с поиском эффективных терапевтических средств в онкологии (Klebanoff, 1970). Одно из первых успешных применений миелопероксидазы было осуществлено при совместном введении фермента и алкилирующего соединения (тиотета) крысам с аденокарциномой молочной железы (Schultz et al., 1976).

СЕРПРОЦИДИНЫ

5.1. КАТЕПСИН G

Компонентами гранулярной антимикробной системы нейтрофилов и моноцитов/макрофагов являются сериновые протеиназы с оптимальной ферментной активностью в нейтрально-щелочной области значений pH (Bainton et al., 1971; Spitznagel et al., 1974; Olsson, 1977; Havemann, Gramse, 1984; Baggiolini, Dewald, 1985).

Протеиназа с субстратной специфичностью, подобной химотрипсину, была выделена из нейтрофилов человека (Olsson, 1977; Olsson et al., 1978a, 1978b) и ряда животных (Starkey, Barrett, 1976; Barrett, 1981a). В настоящее время установлено, что в нейтрофилах человека содержится группа химотрипсиноподобных протеиназ, состоящих из 3—4 изозимов, которые характеризуются положительным зарядом своих молекул (pI~11.0), практически идентичными аминокислотными составами и иммунохимическими свойствами (Olsson, 1977). Расшифрована полностью первичная структура катепсина G человека (рис. 24) (Salvesen et al., 1987).

Из особенностей аминокислотного состава белка следует обратить внимание на высокую долю в нем аргинина (13—14 мол%) и дикарбоновых аминокислот (19—20 мол%), свободные карбоксильные группы которых в значительной степени амидированы. Подобный состав аминокислот определяет катионный характер белковых молекул. Молекулярные массы выделенных белков, по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия, находятся в пределах 25 000—29 500 Да. Для всех белковых изоформ характерна химотрипсиноподобная ферментативная активность в отношении искусственных субстратов (например, этилового эфира бензоилтирозина) с оптимумом pH в диапазоне 7.0—7.5.

Избирательное подавление энзиматической активности рассматриваемых протеиназ α_2 -макроглобулином, α_1 -антихимотрипсином, диизопротилфторфосфатом и фенолметилфторсульфонилем позволяет однозначно отнести их к сериновой группе протеолитических ферментов.

Вследствие отсутствия идентичности в субстратной специфичности и кинетике катализа между панкреатическим химотрипсином А, с одной стороны, и химотрипсиноподобными ферментами из нейтрофилов и селезенки человека — с другой, для последней группы белков было предложено наименование «катепсин G» (Starkey, Barrett, 1976), которое в настоящее время общепринято.

Азуроцидин	1IVGGRKARPRQFFPLASIQNQR--H-FCGGLIHARFVMTAASCFSQNPVSTVVL
Эластаза	IVGRRARPHAWFFMVSLQLRG--G-H-FCGATLIAPNFVMSAARCVANVVRVRRVVL
Катепсин G	IIGRESRPHSRPYMAYLQIQSPAGQSR-CGGFLVREDFVLTAAACWGS----NINVTL
Азуроцидин	GAYDLRRR-ERQSRQTFSSISS-MSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTLLPLPL
Эластаза	GAHNLSRR-EP-TRQVFAVQR-IFENGYDPVNLNDIVILQLNGSATINANVQVAQLPA
Катепсин G	GAHNIQRR-EN-TQQHITARRAIRHPQYNQRTIQNDIMLLQLSRVRRNRNVNVPALPR
Азуроцидин	QNATVEA-GTRCQVA-GWGSQRSGGRLSRFRFVNVTVTFEDQCRPNN-----VC
Эластаза	QGRRLGN-GVQC-LAMGWLLGRNRGIASVLQELNVTVVTSL-CRRSN-----VC
Катепсин G	AQEGLRP-GTLCTVA-GWGRVS-MRRGTDTLREVQLRVQRDRQCLRIFGSDYDPRR-QIC
Азуроцидин	TGVLTRRG-GICNGDGGTFLVCEGLAHGVAASFSL-GPC-GRG-PDFTRVALFRDWIDG
Эластаза	TFVRG-RQAGVCFDGSGLVPCNGLIHGIASFVR-GGCASGLYPDAFAPVAQFNMMIDS
Катепсин G	VGDRRERKAAF-KGDSGGPLLCNNVAHGIVSYGKSSG----VPPEVTRVSSFLPWIRT
Азуроцидин	VLNNPGP-GPA ²²⁵
Эластаза	IIQ ²¹⁸
Катепсин G	TMRSFKLLDQMETPL ²³⁵

Рис. 24. Сравнение первичных структур серпроцидинов из нейтрофильных гранулоцитов человека.

Жирным шрифтом указаны аминокислотные остатки (H, D, S), участвующие в образовании каталитического центра сериновых протеиназ — эластазы и катепсина G. В азуроцидине остаток гистидина заменен на серин, а серина на глицин, что делает молекулу неактивной в качестве сериновой протеиназы.

Естественными субстратами катепсина G (КФ 3.4.21.20) являются казеин, фибрин и фибриноген, компоненты комплемента (C1, C3, C4, C5), коллаген и протеогликаны. Низкая субстратная специфичность фермента определяет его важную биологическую роль в разнообразных физиологических и патофизиологических процессах (Янковский, Довнар, 1985; Havemann, Gramse, 1984) организма человека и животных. Антимикробная активность катепсина G показана в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Odeberg, Olsson, 1976a, 1976b; Olsson et al., 1978a, 1978b), а также грибов (Drazin, Lehrer, 1977). Микробицидное действие белка существенно не зависит от его протеолитической активности, поскольку оно сохранялось при ингибировании фермента диизопротилфторфосфатом или его температурной инактивации в течение 10 мин при 50—70 °С.

По-видимому, антимикробные свойства катепсина G связаны с его функционированием в качестве поверхностно-активного вещества, которое определяется в первую очередь поликатионным характером его молекул. В пользу этого представления говорит зависимость бактерицидного эффекта от ионной силы инкубационной среды. При концентрации NaCl, равной 0.2 М и выше, антимикробное действие белка резко снижается. По мнению авторов, электростатическая адсорбция катепсина G на поверхности бактерий является необходимым, но не единственным условием реализации антимикробных свойств белка. Было показано, что полное насыщение белком поверхности *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* имеет место при слабо-бактерицидных концентрациях. Значит, кроме феномена адсорбции в реализации антимикробной активности катепсина G участвуют какие-то дополнительные факторы.

По-видимому, проникновение белка во внутренние структурные области бактерий важно для осуществления ими цитотоксического действия. Существуют косвенные доказательства пенетрационной способности рассматриваемого бактерицидного агента.

Во-первых, грамотрицательные бактерии, имеющие в составе своей клеточной оболочки дополнительную наружную (внешнюю) мембрану, оказываются более резистентными к действию белка по сравнению с грамположительной флорой. Так, при концентрации белка 10^{-6} М более 90 % клеток *Staphylococcus aureus* погибает, в то время как для равного эффекта при использовании *Escherichia coli* в качестве мишеней необходима доза в 2.5×10^{-6} М.

Во-вторых, воздействие катепсина G на микробы сопровождается подавлением в них синтеза белка, молекул РНК и ДНК, образование которых осуществляется во внутренних компартментах клеток. Наконец, катепсин G резко снижает поглощение кислорода микроорганизмами, что свидетельствует о его воздействии на структурно-функциональные взаимоотношения в области цитоплазматической мембраны. Безусловно, все наблюдаемые изменения в метаболизме бактерий свидетельствуют о подавлении их жизнеспособности, что в совокупности приводит в конечном счете к гибели микробов.

5.2. ЭЛАСТАЗА

Другим представителем сериновых протеиназ в нейтрофилах (Janoff, Scherer, 1968; Olsson et al., 1978; Sinha et al., 1987) и моноцитах/макрофагах (Campbell et al., 1989) является эластаза.

Эластаза нейтрофилов (КФ 3.4.21.37) локализована в азурофильных гранулах (Baggett, 1981b; Baggiolini, Dewald, 1985) и может освобождаться как в фагосомную вакуоль, так и во внеклеточное пространство, участвуя в многочисленных, часто разнонаправленных по значению для сохранения жизнедеятельности организма процессах (Havemann, Gramse, 1984). Это одноцепочный гликопротеин с катионным характером своей молекулы (pI ~ 9). В клетке эластаза представлена 3—4 изоформами, отличающимися по электрофоретической подвижности вследствие варибельности в составе белкового и углеводного компонентов своих молекул. Эти изоформы имеют близкие значения молекулярных масс (33 000, 34 000, 36 000 Да) и аминокислотного состава. Эластазы нейтрофилов характеризуются высоким содержанием остатков аргинина и значительной степенью амидирования в них дикарбоновых аминокислот, что, в частности, определяет изоточку ферментов в щелочной области значений pH. Сравнение лейкоцитарной эластазы с панкреатической говорит в пользу умеренной степени гомологии (43 %) их первичных структур (Sinha et al., 1987). Оптимум ферментативного действия белка находится в диапазоне pH 8.0—9.0. Так же как и катепсин G, эластаза ингибируется диизопропилфторфосфатом и относится к группе сериновых протеиназ. Фермент обладает широкой специфичностью по отношению к белковым субстратам, он расщепляет эластин, коллаген, фибрин и фибри-

ноген, компоненты комплемента (C3, C5), кининогены, гемоглобин и протеогликаны. В настоящее время полностью определена первичная структура эластазы нейтрофилов человека (см. рис. 24) (Sinha et al., 1987).

Эластаза относится к группе антимикробных факторов нейтрофилов со слабой бактерицидной активностью. I. Olsson и соавт. (1978) считают, что ее роль сводится к способности вызывать инициальные субклеточные изменения в структуре клеточных оболочек бактерий, которые повышают чувствительность последних к воздействию МПО-системы, катепсина G и БПУ6.

Показана переваривающая активность эластазы в отношении некоторых белков наружной мембраны *Escherichia coli* (Blondin, Janoff, 1976) и *Acinetobacter* 199A (Thorne et al., 1976). Разрушение этих бактериальных белков не приводит к летальному исходу, но существенно облегчает доступ в клетку других антимикробных агентов. Кооперативные взаимоотношения отдельных факторов нейтрофилов в процессе фаго- и экзцитоза обеспечивают эффективность поражения микроорганизмов. В настоящее время продемонстрировано взаимосодействующее антимикробное действие эластазы и МПО-системы, эластазы и катепсина G (Odeberg, Olsson, 1976a, 1976b), эластазы и лизоцима, катепсина G и лизоцима (Thorne et al., 1976).

5.3. АЗУРОЦИДИН

Азуроцидин, известный также как CAP37 (Pohl et al., 1990; Pereira, 1995), является катионным антимикробным белком, выявленным в азурофильных гранулах НГ, который избирательно активен в отношении грамотрицательных бактерий (Spitznagel, 1990; Campanelli et al., 1990b), что функционально роднит его с БПУ6. Он, как и все представители группы серпроцидинов, является гликопротеином с 3 потенциальными сайтами гликозилирования. Сравнение первичной структуры белка (Pohl et al., 1990; Flodgaard et al., 1991) со структурой эластазы из НГ выявило высокую степень гомологии между ними (см. рис. 24). Однако в азуроцидине в областях молекулы, обычно формирующих активный центр сериновых протеиназ, имеют место замены гистидина на серин и серина на глицин, которые лишили этот белок энзиматической активности, но способствовали сохранению его бактерицидных свойств. Азуроцидин иммунохимически выявлен и в моноцитах человека, из которых он исчезает подобно другому гранулярному белку — миелопероксидазе в процессе дифференцировки в макрофаги. В кооперации с эластазой и катепсином G он инактивирует бактерии ротовой полости (Miyasaki, Bodeau, 1992). В отличие от дефенсинов человека, которые проявляют оптимальную антимикробную активность в отношении активно размножающихся и растущих культур при нейтральных значениях pH, азуроцидин активнее действует при закислении среды, независимо от фазы развития и уровня метаболизма клеток-мишеней. Механизм антимикробного действия азуроцидина изучен недостаточно, хотя есть основания

предполагать, что летальные для микроорганизмов последствия связаны с воздействием белка на их цитоплазматическую мембрану.

Ген азуроцидина клонирован и секвенирован (Almeida et al., 1991; Morgan et al., 1991). По-видимому, белок синтезируется в НГ в форме препроазуроцидина, включающего 19 аминокислот сигнального пептида и 7 остатков прочасти. Гены азуроцидина, протеиназы-3 (PR-3) и эластазы локализованы в хромосоме 19 pter (Zimmer et al., 1992), что свидетельствует как об определенной сопряженности в функционировании этих белков, так и их общем молекулярно-генетическом происхождении. Протеиназа-3 азурофильных гранул НГ человека структурно гомологична эластазе (Kao et al., 1988; Bories et al., 1989; Niles et al., 1989; Campanelli et al., 1990a).

Катепсин G, эластаза, протеиназа-3 (PR-3) и азуроцидин на основе гомологичности первичной структуры и проявляемой ими антимикробной активности объединены в единую структурно-функциональную группу белков, получивших название серпроцидина (*serprocidins-serine protease cidins*) (Gabay, Almada, 1993). Все они являются гликопротеинами с молекулярной массой в пределах 25—35 кДа и содержатся в нейтрофилах человека в относительно заметном количестве: катепсин G — 2.5 мг/10⁹ клеток, азуроцидин — 2.0, эластаза — 1.5, протеиназа-3 — 1.0 мг/10⁹ клеток. Наиболее активным в антимикробном отношении представителем этой группы белков является катепсин G, наиболее слабым — эластаза и протеиназа-3, причем их микробицидность в условиях *in vitro* превышает даже таковую дефенсинов человека. Необходимо подчеркнуть, однако, относительность этих данных по антимикробной активности сравниваемых веществ, поскольку в условиях фаголизосом и очагов воспаления много факторов влияют на ее проявление. Например, в клетках, тканях и жидких средах присутствуют многократно избыточные количества ингибиторов сериновых протеиназ (серпины), подавляющих их энзиматическую активность. Хотя известно, что антимикробное действие катепсина G в значительной степени не зависит от его ферментативной активности, тем не менее высокое сродство ингибиторов к энзиму может лишать его способности к адсорбции на поверхности клеток-мишеней. Этот вопрос требует дальнейшего изучения с целью оценки реального вклада серпроцидинов в антимикробный потенциал нейтрофильных гранулоцитов. Серпроцидины структурно родственны эффекторным молекулам цитотоксических Т-лимфоцитов — гранзимам (гранулярным энзимам), которые ответственны наряду с перфоринами и, возможно, дефенсинами (Masera et al., 1996) за киллерную активность клеток, функционирующих уже в рамках приобретенного иммунитета (Moretta, 1997).

Серпроцидины в условиях *in vitro* активны в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, низших грибов, простейших и клеток высших эукариотов. Эти эффекты подавляются умеренными концентрациями NaCl (0.1—0.2 М), дивалентными катионами (Ca²⁺, Mg²⁺) и сывороткой (Campanelli et al., 1990a, 1990b), что свидетельствует о качественном сходстве механизмов их антимикроб-

ного действия и ряда других антибиотических факторов лейкоцитарного происхождения (дефенсины, лактоферрины и т. д.).

Интересно, что, как и в случае с лактоферрином, некоторые пептиды, выщепляемые путем ограниченного протеолиза из катепсина G (пептид-1—5 и пептид-77—83) (Bangalore et al., 1990), обладают широкой антимикробной активностью. В какой степени значим вклад подобных пептидов в формирование антимикробной резистентности на уровне очагов воспаления, говорить пока затруднительно. Скорее всего, в процессах фагоцитоза и воспаления играют более важную физиологическую роль другие функциональные проявления серпроцидинов. В частности, в низких (нМ) концентрациях азуроцидин является хемотактантом моноцитов (Pereira et al., 1990a). Катепсин G и эластаза НГ аутокринным способом активируют продукцию супероксиданиона клетками (Kusner, King, 1989). Они облегчают также миграцию НГ из крови в ткани (Lomas et al., 1995; Owen et al., 1995), осуществляя протеолиз компонентов базальной пластинки и межклеточных контактов. Серпроцидин PR-3 способствует процессу агрегации и дегрануляции тромбоцитов (Renesto et al., 1994). А комплекс катепсинов G с α 1-антихимотрипсином стимулирует продукцию цитокинов (Kurdowska, Travis, 1990). Возможная регулирующая роль серпроцидинов в ряде гуморально-клеточных взаимодействий, определяющих эффективность процессов фагоцитоза и воспаления, является в настоящее время предметом многих исследований.

ГЛАВА 6

ЛИЗОЦИМ

Лизоцим (синонимы — мурамидаза, мукопептидгликогидролаза) — один из составных компонентов гранулярной антимикробной системы нейтрофилов человека и животных (Cohn, Hirsch, 1960). Со времени открытия фермента А. Флемингом (Fleming, 1922) осуществлено всестороннее изучение его структур и антимикробных свойств. Лизоцимы большинства изученных объектов, в том числе молока и нейтрофилов человека, являются катионными белками с высокой изоэлектрической точкой ($pI > 10$) и относительно небольшой молекулярной массой (~15 000 Да) (Jolles, 1969; Hindenburg et al., 1974).

Общепринятым критерием при отнесении того или иного фермента к классу лизоцимов (КФ 3.2.1.17) является его способность лизировать *in vitro* суспензию клеток чувствительного штамма *Micrococcus lysodeiicticus*. Бактериолитическая активность лизоцимов лежит в основе метода их идентификации и количественного определения в клетках и жидкостях организма (Бухарин, Васильев, 1974).

Субстратом ферментативного действия лизоцима является гликановый (мукополисахаридный) компонент пептидогликанового комплекса (гликопептида, муреина) клеточной стенки бактерий. Лизоцим гидролизует 1,4 β -связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамином, деполимеризуя таким способом один из ведущих компонентов оболочки бактерий. При определенных условиях лизоцим может осуществлять полное растворение пептидогликанового слоя, превращая бактериальные клетки в сферопласты, которые лизируют вследствие разрыва цитоплазматической мембраны, не выдерживающей высокого осмотического давления.

При испытании в условиях *in vitro* фермент не способен лизировать грамотрицательные бактерии, так как наружная мембрана последних является для белка непреодолимой преградой. Резистентны к его действию и многие грамположительные микробы вследствие ацетилирования гидроксильных групп гликанов, делающих их «плохим» субстратом для лизоцима. В соответствующих условиях потенциальная бактериолитическая активность лизоцима реализуется благодаря присутствию в гранулах нейтрофилов других антимикробных факторов, осуществляющих нарушение структурной целостности клеточной стенки и облегчающих таким образом доступ белка к пептидогликановому слою.

Соединениями, повышающими чувствительность бактерий к действию лизоцима, могут быть дефенсины, БПУБ, сериновые протеиназы и МПО-система, которые в процессе дегрануляции оказываются локализованными в фаголизосомах. В работе К. Thorne с соавт. (Thorne et al., 1976) показано, что предварительная, незначительная по времени обработка грамотрицательных бактерий *Acinetobacter* 199А катепсином G, эластазой или лактопероксидазной системой делает исходно резистентные клетки чувствительными к воздействию лизоцима. По-видимому, подобные синергические антимикробные взаимодействия имеют место в условиях фаголизосом нейтрофилов. Есть основания предполагать, что лизоцим включается в цепь реакций, осуществляющих умерщвление и переваривание микробов, после того как действие более эффективных бактерицидных белков приводит к нарушению структурно-функциональной целостности клеточной стенки микроорганизмов.

В свете рассмотренных данных об антимикробной функции лизоцима представляются неожиданными сведения об отсутствии фермента в гранулах нейтрофилов коров, коз, овец, кошки, хомяка и некоторых видов обезьян (Rausch, Moore, 1975). Они ставят под сомнение важную роль лизоцима в защите многоклеточных организмов от бактериальной инфекции. Однако можно предположить, что ферменты, сходные с лизоцимом по биологической функции, но несколько отличающиеся от него по субстратной специфичности, присутствуют в нейтрофилах этих видов животных. Совершенствование и разработка новых методов идентификации эндогликозидаз (в частности, лизоцима) позволят в перспективе решить эту проблему.

ГЛАВА 7

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АНТИБИОТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ, ОТЛИЧНЫЕ ОТ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ

Антимикробные пептиды и белки фагоцитов и барьерных систем организма человека и животных являются физиологически активными веществами многоцелевого назначения, участвующими в различных защитно-приспособительных процессах, среди которых ведущее место принадлежит фагоцитозу и воспалению. Благодаря особенностям своей структуры они являются антимикробными агентами, в значительной степени определяющими, как это было рассмотрено ранее, завершённый характер фагоцитоза и стерильность внутренней среды животных организмов. Кроме антимикробной активности рассматриваемые белково-пептидные соединения обладают широким спектром функциональных свойств, обеспечивающих реализацию многих защитных реакций организма как против инфекции, так и неблагоприятных воздействий окружающей среды. Некоторые из этих функциональных проявлений мы рассмотрим в настоящей главе.

7.1. ПРООПСОНИЧЕСКАЯ И ХЕМОТАКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ

Благодаря своим электрохимическим свойствам молекулы дефензинов являются цитотропными веществами, за счет электростатических сил быстро сорбирующимися на поверхности микробных клеток. Вследствие снижения катионными пептидами отрицательного заряда поверхности клеточной оболочки бактерий облегчается фагоцитоз микробов нейтрофилами и макрофагами, что послужило основанием рассматривать дефенсины в качестве опсонизирующих микроорганизмы соединений (Fleischmann et al., 1985), которые могут функционировать в этом качестве при фагоцитозе и воспалении наряду с производными комплемента.

В экспериментах *in vitro* продемонстрирована хемотаксическая для моноцитов активность дефензинов человека HNP-1 и HNP-2 (Territo et al., 1989) и азуроцидина (Pereira et al., 1990a, 1990b). Позже в экспериментах на мышах линии BALB/c установлена хемотаксическая активность этих пептидов и белков для нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов (Chertov et al., 1996). Таким образом, есть основание рассматривать нейтрофилы в качестве источника физиологически активных соединений (дефенсины, азуроцидин), которые мобилизуют

не только фагоциты, участвующие в реализации реакций врожденного иммунитета, но и лимфоциты, являющиеся функциональными клеточными компонентами системы приобретенного иммунитета.

Если принять во внимание данные о способности дефензинов дегранулировать тучные клетки (Yamashita, Saito, 1989) и увеличивать проницаемость сосудов (Ranadive, Cochrane, 1968), то становится очевидным, что эти полипептиды способны влиять на протекание фагоцитарного и воспалительных процессов, выступая в них в роли регуляторных молекул (Кокряков, 1990; Ginsburg, 1987).

7.2. АНТИБИОТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРОЦЕСС

Катионные пептиды и белки, будучи представленными в значительных количествах в мобильных клетках (в нейтрофильных гранулоцитах, моноцитах, эозинофилах и тромбоцитах) принимают активное участие в гуморально-клеточной кооперации крови и соединительной ткани (Маянский, Маянский, 1989) в ходе такого сложного патофизиологического процесса, каким является острое воспаление. Воспаление есть возникший в эволюции процесс реагирования организма человека и животных на местные повреждения, который включает в себя в качестве взаимосвязанных компонентов сложные поэтапные изменения микроциркуляторного русла, системы крови и соединительной ткани, направленные в конечном итоге на изоляцию и устранение патогенного агента и восстановление (или замещение) поврежденных тканей (Чернух, 1979). Своеобразие этого процесса заключается в том, что далеко не все компоненты тканевых изменений в очаге воспаления представляют собой выражение только защитных реакций организма. Например, избыточная миграция нейтрофильных гранулоцитов в воспаленные ткани может быть причиной формирования абсцесса и резкого нарушения функциональной активности конкретной биологической системы. Однако в нашей оценке биологической роли воспаления мы должны исходить из представлений о первично защитном характере (Мечников, 1892) таких его реакций, как свертывание крови в поврежденных патогенным фактором сосудах, препятствующее кровопотере, увеличение проницаемости сосудов микроциркуляторного русла и поддержание в них крови в жидком состоянии, накопление в очаге нейтрофильных гранулоцитов с последующей их заменой клетками системы мононуклеарных фагоцитов. На всех стадиях воспаления активными и непосредственными участниками происходящих физико-химических процессов являются катионные пептиды и белки НГ (Wasi, Movat, 1979). Их ключевая роль в инактивации микроорганизмов была рассмотрена нами выше, в этом разделе мы осветим другие стороны функциональных проявлений данной группы физиологически активных веществ.

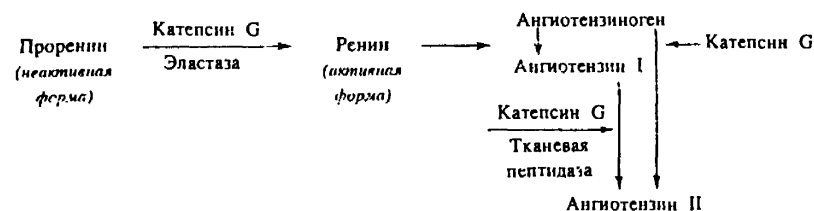
Формирование очага воспаления характеризуется стереотипным развертыванием переходящих одна в другую реакций сосудистого ложа места повреждения. Нарушение структурно-функциональной це-

лостности клеток и тканей при воздействии патогенного фактора приводит к кратковременному сужению артериол, венул и капилляров микроциркуляторного русла, сменяющимся последующей длительной фазой вазодилатации. Расширение сосудов, инициируемое гистамином из тучных клеток рыхлой соединительной ткани, способствует их интенсивному кровенаполнению (гиперемии). Параллельно с этим процессом наблюдается существенное повышение проницаемости стенок сосудов, которое благоприятствует выходу плазмы крови в экстравазальное пространство и формированию отека. Рассматриваемые сосудистые изменения, наряду с миграцией НГ, являются решающими в завязывании и развитии воспаления. Поэтому не случаен интерес многих исследователей к вопросу о природе веществ, обеспечивающих повышение проницаемости сосудов в этих условиях. Среди таких соединений фигурируют в настоящее время кинины, ангиотензин II и некоторые представители группы катионных белков нейтрофильных гранулоцитов.

Первые экспериментально обоснованные представления о провоспалительной (флогогенной) активности катионных пептидов и белков НГ сформировались уже в 60-х годах нашего столетия (Janoff, Zweifach, 1964; Cochrane, Aikin, 1966; Seeger, Janoff, 1966; Keller et al., 1968; Ranadive, Cochrane, 1968; Janoff, Scherer, 1968; Ranadive et al., 1973). Они базировались на работах, в которых была продемонстрирована способность низкомолекулярных неферментных катионных белков НГ (по современной терминологии — дефенсинов) кролика и крысы вызывать значительное увеличение проницаемости сосудов у животных, которым внутрикожно инъецировали эти вещества. Данный эффект наблюдали немедленно после введения дефенсинов. При этом было установлено, что большая часть катионных пептидов и белков увеличивает проницаемость сосудов путем непосредственного взаимодействия с их стенками, в то время как другая — через предварительное освобождение гистамина из тучных клеток (Cochrane, Aikin, 1966; Yamashita, Saito, 1989). Полианионы отменяли наблюдаемое явление, как и предварительная обработка белков трипсином. Эти данные обосновали представление о лизосомных катионных пептидах и белках НГ как медиаторах воспаления, выступающих в ходе разворачивающегося патофизиологического процесса в роли факторов проницаемости и дегрануляторов тучных клеток. В основе рассматриваемой физиологической активности этой группы веществ (как поликатионов) лежит их повышенная тропность к отрицательно заряженным компонентам стенок кровеносных сосудов. В частности, после адсорбции на поверхности клеток антибиотические пептиды (АП) и антибиотические белки (АБ) уже за счет гидрофобных взаимодействий с липофильными хвостами жирных кислот мембран нарушают упорядоченную структуру липидного бислоя плазмалеммы, изменяя ее барьерную и метаболическую функции.

Наряду с неферментативным механизмом увеличения проницаемости сосудов существуют и другие пути участия катионных белков НГ в регуляции воспаления. Они связаны в основном с протеолитической

активностью сериновых протеиназ, которые способны активировать калликреин-кининовую, ренин-ангиотензиновую и комплементарную системы и генерировать таким образом вазоактивные соединения. К числу последних относятся и ангиотензин II, который обычно образуется из неактивного предшественника — ангиотензиногена в результате его последовательного двухступенчатого протеолиза под действием ренина и тканевой пептидазы. В серии работ (Klickstein et al., 1982; Weintraub et al., 1984; Drau et al., 1987) было показано, что в условиях очага воспаления катепсин G нейтрофильных гранулоцитов человека может выполнять функции, аналогичные двум названным протеиназам. Катепсин G может внеклеточно осуществлять ограниченный протеолиз молекулы ангиотензиногена с образованием ангиотензина II — пептида, увеличивающего проницаемость сосудов и повышающего артериальное давление. В дополнение к этому катепсин G и эластаза нейтрофильных гранулоцитов способны осуществлять конверсию проренина (неактивной формы фермента, циркулирующей в крови) в ренин, способствуя таким образом запуску основного пути формирования ангиотензина II. Схематически весь каскадный процесс с участием в нем лейкоцитарных протеаз выглядит следующим образом:



В нейтрофильных гранулоцитах выявлены и кининообразующие сериновые протеиназы (Movat et al., 1976; Wasi et al., 1979). Кинины (в частности, брадикинин) являются вазоактивными пептидами, обеспечивающими длительное увеличение проницаемости сосудов, расширение артериол и повышение давления в капиллярах и венулах. Обычно они являются конечным продуктом каскадной калликреин-кининовой системы, запускаемой фактором Хагемана. На основании ингибиторного анализа есть основания предполагать, что эластаза НГ является кинин-генерирующим ферментом, однако строгих доказательств этого положения до настоящего времени не получено.

Ключевую роль в патогенезе воспаления играет система комплемента. Физиологически активные соединения, продуцируемые в ходе ее активации, оказывают существенное влияние не только на состояние проницаемости сосудов, но и характер клеточных реакций очага воспаления. Исследованиями доказано участие сериновых протеиназ НГ в формировании биологически активных производных комплемента.

В соответствии с устоявшимися представлениями система комплемента состоит из плазменных белков, образующих 9 функционально значимых компонентов (C1, C2, C3 и т. д.). Последовательное включение этих компонентов в формирование реакций фагоцитоза и вос-

паления носит название процесса активации комплемента, осуществляемого путем избирательного расщепления их белковых молекул с образованием физиологически активных полипептидных фрагментов. Среди последних ведущими являются универсальный опсонизирующий фактор С3b, ответственный за единообразную маркировку объектов фагоцитоза и облегчающий их поглощение нейтрофильными гранулоцитами и макрофагами, а также анафилатоксин С5а — основной хемотаксический агент, обеспечивающий направленную миграцию нейтрофильных гранулоцитов в очаг воспаления (Müller-Eberhard, 1992). Традиционно рассматриваются два основных пути активации комплемента: классический и альтернативный. В дополнение к ним обнаружен новый вариант активации системы комплемента, связанный с деятельностью эластазы и катепсина G нейтрофильных гранулоцитов (Johnson et al., 1976; Carlo et al., 1980). Продемонстрировано, что сериновые протеиназы НГ могут осуществлять прямую конверсию компонента комплемента С3 с образованием фрагментов С3а и С3b. Эти же ферменты обладают С5-конвертирующей активностью, благодаря которой от С5 отщепляется фрагмент С5а. Таким образом, наряду с альтернативным путем активации системы комплемента существует дополнительная возможность вовлечения ее в различные процессы гуморально-клеточной кооперации (Маянский, Маянский, 1989) при фагоцитозе и воспалении в начальной фазе формирования резистентности организма человека и позвоночных животных. Образование С3b и С5а под действием эластазы и катепсина G может обеспечивать адекватную клеточную реакцию очага воспаления, направленную на распознавание, поглощение и эффективную элиминацию патогенных факторов (микроорганизмы, токсины, иммунные комплексы). Эти полипептиды ответственны за полноценное проявление таких форм функциональной деятельности НГ, как хемотаксис, адгезивность, метаболический взрыв и микробоцидность. Поэтому их генез в процессе воздействия сериновых протеиназ НГ на компоненты С3 и С5 комплемента может рассматриваться в качестве одного из дополнительных механизмов активации фагоцитов крови, соединительной ткани и очагов воспаления.

Некоторые группы катионных белков могут оказывать на систему комплемента действие, противоположное рассмотренному выше. Известна антикомплементарная активность низкомолекулярных неферментных белков кролика (Cochrane, Aikin, 1966). Она связана, по-видимому, с их (как поликатионов) способностью электростатически взаимодействовать с анионными молекулами фракций комплемента. В результате блокируются цепные реакции каскада активации комплемента. Подобный механизм инактивации комплемента может быть ответственным за ограничение процесса миграции лейкоцитов в очаг воспаления, когда их избыточное накопление может приводить не только к защитным, но и к деструктивным явлениям в тканях организма. Таким образом, отдельные представители группы гранулярных катионных белков НГ могут оказывать на течение воспаления разнонаправленное действие, что важно в плане регуляции этого патофизиологиче-

ского процесса. Подобная ситуация наблюдается и при анализе данных, имеющих отношение к гемостатической функции катионных пептидов и белков (см. раздел 7.3).

Все это позволяет охарактеризовать катионные пептиды и белки клеток и жидких сред организма человека и животных как физиологически активные вещества многонаправленного действия. С их функционированием связаны такие защитно-приспособительные процессы, как фагоцитоз, воспаление и, возможно, стресс-реакция, причем в этих процессах они выступают не только в роли высокоэффективных антибиотических агентов. Им свойствен широкий функциональный потенциал, который реализуется в различных проявлениях клеточно-гуморальной кооперации в кровеносной и лимфоидной системах, соединительной ткани, пограничных эпителиях. Такая кооперация направлена на реализацию и регуляцию механизмов неспецифической резистентности (врожденного иммунитета) макроорганизма к инфекции.

Есть все основания считать, что антимикробные белки и пептиды клеток и жидких сред организма являются особым классом физиологически активных веществ, отобранных в процессе эволюции в качестве биохимического механизма его барьерных систем и антимикробной защиты (Пигаревский, 1988). Высокая концентрация катионных белков в клетках (нейтрофилы, макрофаги, эозинофилы, клетки Панета и покровных эпителиев), осуществляющих защитные реакции, является веским тому доказательством. В частности, в 10^9 клеток нейтрофилов человека содержится 3.9 ± 0.9 мг миелопероксидазы, 1.2 ± 0.2 — катепсина G, 2.7 ± 0.6 — эластазы, 4.3 ± 1.2 — лактоферрина (Olsson, 1977) и 7.2 мг лизоцима. Поэтому функциональная неполноценность нейтрофилов, обусловленная наследственно детерминированными дефицитами или отсутствием в них отдельных представителей группы антимикробных катионных белков и пептидов, представляет редко встречающееся явление (Hill, 1984; Gallin, 1992). Гораздо чаще в клинической практике имеют место случаи развития аутоинфекционных заболеваний и гнойных осложнений у больных хирургических, пульмонологических, педиатрических клиник, ожоговых центров и отделений реанимации, которые сопряжены с приобретенными дефицитами содержания этих белков (Мазинг, 1988; Пигаревский, 1988). В дополнение к этому общеизвестны факты низкого уровня сопротивляемости организма новорожденных инфекциям и вследствие этого склонность к септическому течению заболеваний у детей в ранний постнатальный период онтогенеза (Miller, 1969; Wilson, 1986; Hill, 1987; Cairo, Calif, 1989). По мнению этих авторов, недостаточность хемотаксиса нейтрофилов и незавершенный характер фагоцитоза, осуществляемого ими, являются одними из ведущих причин сниженной резистентности новорожденных к инфекции. В то же самое время некоторые конкретные механизмы полома фагоцитоза в данных условиях остаются невыясненными. Это побудило нас провести комплексное морфобиохимическое и функциональное исследование с целью определения роли катионных белков и пептидов в обес-

Показатели содержания катионных белков в нейтрофилах человека

Исследуемый показатель	Источник нейтрофилов	
	кровь пуповинная	кровь донорская
ЛКТ	1.15±0.03	1.58±0.02
ОКБ, мг/10 ⁹ клеток	16	39
Миелопероксидаза, мг/10 ⁹ клеток	0.273	1.05
Эластаза, %/10 ⁹ клеток	21	100
Катепсин G, %/10 ⁹ клеток	25	100

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4 ЛКТ — лизосомально-катионный тест. ОКБ — общий кислоторастворимый белок.

Таблица 3

Показатели содержания катионных белков в нейтрофилах крыс

Исследуемый показатель	Возраст животных					
	12—18 ч	10 дней	20 дней	30 дней	45 дней	8—10 мес
ЛКТ	0.71±0.05	1.08±0.01	1.07±0.04	1.09±0.03	1.12±0.02	1.31±0.02
ОКБ, мг/10 ⁹ клеток	30	33	36	41	56	79
Миелопероксидаза, мг/10 ⁹ клеток	0.3	0.33	0.4	1.9	2.0	2.51

Таблица 4

Показатели содержания катионных белков и функциональной активности нейтрофилов кролика

Исследуемый показатель	Возраст животных, дни				
	7	14	21	28	60
ОКБ, мг/10 ⁹ клеток	15	22	30	62	65
Миелопероксидаза, мг/10 ⁹ клеток	0.098	0.192	0.210	0.417	0.565
Эластаза, %/10 ⁹ клеток	46	68	71	83	100
Фагоцитарное число, %	76	69	62	61	70
Фагоцитарный индекс, число микробов в клетке	5.2	3.8	3.4	3.8	6
ААКБ	30	26	38	52	75

Примечание. ААКБ — антибактериальная активность катионных белков.

печении фагоцитарной функции нейтрофилов человека и некоторых лабораторных животных в ранний постнатальный период их развития.

Результаты сравнительного биохимического определения общего кислоторастворимого белка, миелопероксидазы, эластазы и катепсина G в нейтрофилах пуповинной крови новорожденных и взрослых доноров (табл. 2) однозначно свидетельствуют о дефиците этих соединений в клетках детей. Параллельная оценка содержания гранулярных катионных белков и пептидов с использованием лизосомально-катионного теста (Пигаревский, 1975; Пигаревский и др., 1990) соответствует данным этого анализа.

Подобная же закономерность изменения содержания катионных белков в нейтрофилах от первых дней рождения до периода половозрелости установлена нами при обследовании белых беспородных крыс (табл. 3) и кроликов породы «Шиншилла» (табл. 4). Необходимо отметить, что дефициту гранулярных катионных белков нейтрофилов кролика соответствовали низкие значения такого важного функционального показателя их активности, как завершенность фагоцитоза. Последнее обстоятельство является, по-видимому, одной из возможных причин генерализации листериозного и герпетического инфекционных процессов у животных 7-дневного возраста, которые у половозрелых особей протекают локально благодаря полной инактивации микроорганизмов в фагоцитах очага повреждения (Пигаревский и др., 1990).

Сведения подобного рода были ранее получены только для миелопероксидазы крыс (Christensen, Rothstein, 1985) и лактоферрина нейтрофилов человека (Freemann et al., 1985).

Таким образом, нами установлен временный (преходящий) дефицит антимикробных белков и пептидов нейтрофилов в период раннего постнатального развития человека и животных (кролик, крыса), который может составлять причину функциональной неполноценности фагоцитов и быть расценен как один из факторов риска развития аутоинфекционных заболеваний и септических осложнений. В дополнение к этому (благодаря сопряженно проведенным биохимическому и морфологическому анализам) впервые получены строгие доказательства объективности данных цитохимического определения содержания катионных белков и пептидов нейтрофилов при использовании лизосомально-катионного теста.

Биологическая значимость антибиотических пептидов и белков однозначно просматривается в анализе явления резорбтивной клеточной резистентности (Пигаревский, 1978, 1992).

Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме антимикробной защиты организма человека и животных была выдвинута проф. В. Е. Пигаревским (1978) на основании результатов работ по исследованию морфодинамики воспалительных очагов повреждения при инфекционной патологии. Морфологический анализ инфицированных органов и тканей при хламидиальной (Пигаревский, Толыбеков, 1976) и псевдотуберкулезной (Мазинг, Юнусова,

Показатели функциональной активности и содержания антимикробных белков макрофагов

Объект исследования	Содержание миелопероксидазы, мг/10 ⁶ клеток	Фагоцитарная активность клеток в отношении <i>Staphylococcus epidermidis</i>		Процент НСТ-позитивных клеток
		ФЧ, %	ФИ	
Нейтрофилы	0.565	—	—	—
Перитонеальные макрофаги:				
резидентные	0.03	25.0±1.3	3.2±0.11	10.0±0.8
2-суточные	0.28	49.0±1.0*	4.1±0.12***	31.0±1.1*
3-суточные	0.231	34.0±1.1**	4.0±0.09***	24.0±1.2*
4-суточные	0.15	30.0±1.2***	3.2±0.11	19.0±1.3**
5-суточные	0.05	28.0±1.3	2.3±0.15	14.0±1.1***

Примечание. Здесь и в табл. 6 ФЧ — фагоцитарное число (процент фагоцитов, участвующих в фагоцитарном процессе, от общего числа клеток). ФИ — фагоцитарный индекс (число фагоцитированных микробов на 1 клетку). НСТ-позитивная клетка — клетка, способная к восстановлению красителя нитросинего тетразолиевого (НСТ).

* — $p < 0.001$, ** — $p < 0.01$, *** — $p < 0.05$ по сравнению с соответствующими показателями резидентных перитонеальных макрофагов.

1982) инфекция показал, что макрофаги воспалительных очагов в процессе своей жизнедеятельности проходят стадию поглощения продуктов распада нейтрофилов (ядер, хроматина, гранул и их отдельных белково-пептидных компонентов), благодаря чему они становятся резистентными к микробному паразитированию. Опыты по инактивации этих возбудителей *in vitro* ядерными гистонами (Пигаревский и др., 1975) и гранулярными катионными белками нейтрофилов (Кокряков и др., 1977) частично свидетельствовали в пользу выдвинутой концепции.

С целью дальнейшего обоснования биологической значимости рассматриваемого явления и расшифровки его конкретных морфобиохимических механизмов нами было проведено комплексное исследование с использованием в качестве основного объекта изучения перитонеальных макрофагов кролика, выделенных из очага асептического воспаления на разных сроках после его индукции. Такое воспаление характеризуется надежно воспроизводимой во времени динамикой смены лейкоцитарных популяций. В первые 4—8 ч после введения в брюшную полость индуцирующего раствора крахмала наблюдается интенсивный выход туда нейтрофилов из крови. До 36 ч этот тип клеток является преобладающим в экссудате. В дальнейшем происходит закономерная смена клеточных популяций в очаге воспаления и к 48 ч макрофаги составляют уже не менее 90 % клеток экссудата, причем около 50 % из них содержат морфологически идентифицируемые остатки ядер и гранул нейтрофилов. В последующие 3 сут наблюдается постепенное исчезновение компонентов нейтрофилов из макрофагов в результате их переваривания в гранулярном аппарате последних. Подобная динамика клеточных реакций в очаге воспаления позволяет получать макрофаги с различным содержанием резорбированных антимикробных белков нейтрофилов (миелопероксидаза, лактоферрин, дефенсины и др.) и использовать их в витральных тест-системах (Мазинг, Данилова, 1989).

В первой серии экспериментов изучали соотношение функциональной активности (фагоцитарное число и индекс, дыхательный взрыв) и количества миелопероксидазы гранулоцитарного происхождения в перитонеальных макрофагах кролика, выделенных из организма на разных сроках развертывания асептического воспаления (табл. 5). Установлена четкая положительная коррелятивная связь между показателями функциональной активности макрофагов и содержанием в них миелопероксидазы, которое максимально в 2-суточных клетках. Можно допустить, что именно с увеличением количества антимикробных белков нейтрофилов в вакуолярном аппарате макрофагов связано повышение их цитоцидного потенциала по сравнению с исходными интактными клетками. Подобный эффект наблюдали зарубежные исследователи (Locksley, Klebanoff, 1983) при добавлении миелопероксидазы в инкубационную среду культуры макрофагов с фагоцитированными простейшими. Такой подход к анализу процесса резорбтивной клеточной резистентности позволяет более

строго оценивать значение отдельных фракций катионных белков нейтрофилов в модуляции фагоцитарной активности макрофагов.

Нами было изучено влияние лактоферрина и дефенсинов кролика, исходно отсутствующих в резидентных перитонеальных макрофагах, на фагоцитоз последними стафилококков *in vitro*. Установлено дозозависимое стимулирующее функциональную активность макрофагов действие испытанных белков (табл. 6). При этом выявлено, что лактоферрин имеет большее влияние на поглотительную способность клеток, тогда как дефенсины в концентрации 50 мкг/мл активнее стимулировали дыхательную функцию макрофагов. Первое может найти частичное объяснение в рамках представления об опсонизирующих свойствах лактоферрина (Bullen, Armstrong, 1979; Lima, Kierszenbaum, 1985, 1987), имеющего рецепторы на некоторых типах макрофагов (Steinmann et al., 1982).

Таким образом, совокупность приведенных экспериментальных данных свидетельствует в пользу выдвинутой В. Е. Пигаревским (1978) гипотезы о резорбтивной клеточной резистентности как об одном из механизмов осуществления неспецифических защитных реакций в организме человека и животных. Ряд зарубежных исследователей также установили сходные воздействия со стороны катионных белков нейтрофилов на функции макрофагов (Campbell, Wald, 1983; Leung, Goren, 1989; Schmekel et al., 1990). Из этого следует, что эстафетная передача катионных пептидов и белков (дефенсинов, катепси-

Таблица 6

Функциональная активность резидентных перитонеальных макрофагов после их предварительной инкубации с белками нейтрофилов

Концентрация белка	Фагоцитарная активность клеток в отношении <i>Staphylococcus epidermidis</i>		Процент НСТ-позитивных клеток
	ФЧ, %	ФИ	
Контроль	28.0±1.2	3.4±0.3	8.5±0.9
Лактоферрин, 1 мкг/мл	34.0±2.1*	3.9±0.4	12.0±1.1
Дефенсины, 1 мкг/мл	30.0±1.3	3.5±0.3	14.0±0.5
Лактоферрин, 50 мкг/мл	54.0±1.7**	4.2±0.8*	18.0±1.3**
Дефенсины, 50 мкг/мл	45.0±1.2	4.0±0.5	23.0±1.8
Лактоферрин, 100 мкг/мл	63.0±1.9***	4.9±0.9*	20.0±1.1**
Дефенсины, 100 мкг/мл	56.0±1.3	4.3±0.7	20.0±1.1

*— $p < 0.05$, **— $p < 0.01$, ***— $p < 0.005$ по сравнению с соответствующими показателями контроля.

на G, эластазы, лактоферрина, миелопероксидазы) от нейтрофилов к макрофагам может рассматриваться в качестве одного из биохимических механизмов межклеточной кооперации, направленных на обеспечение барьерных функций организма против инфекционных факторов в период, предшествующий развитию специфических иммунных реакций (приобретенного иммунитета). При этом резорбированные катионные белки и пептиды нейтрофилов через модуляцию функциональной активности макрофагов могут участвовать в формировании уже и специфических защитных реакций организма. Отдельные сведения в этом направлении исследований получены как отечественными (Долгушин, 1989), так и зарубежными (Tchorzewski et al., 1984) учеными. По их мнению, биологически активные соединения нейтрофилов могут играть важную роль в инициации каскада клеточно-гуморальных взаимодействий, направленных на формирование специфического иммунного ответа при инфекционной патологии.

Исследования последних лет продемонстрировали еще ряд возможных путей вовлечения антимикробных пептидов и белков в регуляцию защитных реакций организма. В частности, японскими исследователями (Yomigida et al., 1996) было изучено влияние дефенсинов как одного из ведущих молекулярных факторов кислороднезависимой антимикробной системы нейтрофильных гранулоцитов на ряд функциональных свойств этих клеток, таких как адгезия, хемотаксис, поглощение объектов фагоцитоза, продукция супероксид-аниона (OO_2^-). Дефенсины морской свинки в концентрации 15 нг/мл увеличивают экспрессию CD11b, CD11c и CD54 (межклеточная адгезивная молекула ICAM-1) на поверхности нейтрофильных гранулоцитов от 42.1±1.6 до 58.3±2.3 % и адгезию НГ морской свинки и человека. Они ингибируют продукцию супероксидных анионов в процессе фагоцитоза комплемент-опсонизированных частиц зимозана, но не влияют

на генерацию O_2^- при фагоцитозе IgG опсонизированного латекса и активацию нейтрофилов формилметиониллейцил-пептидами и фФПР-болмирилатацетатом.

7.3. ВЛИЯНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ И БЕЛКОВ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОСТАЗА

Известна способность таких катионных белков, как протамин (Rasapelli et al., 1985), тромбоцитарный фактор 4 (Niewiarowski, 1976), фактор из ткани селезенки (Ляпина, Азиева, 1985), вступать в электростатическое взаимодействие с гепарином и ингибировать в результате этого неферментативную фибринолитическую активность крови, определяемую комплексными соединениями гепарина с протеинами и аминами — основными гуморальными агентами противосвертывающей системы (Кудряшов, 1975; Ginsberg, Hirsh, 1988). В свете этих данных представляло интерес изучение влияния парентерально введенных дефенсинов на функциональное состояние противосвертывающей системы организма в условиях, моделирующих некоторые патологические состояния гемостаза. Такой подход тем более обоснован, что наличие дефенсинов в плазме крови человека (Panuytich et al., 1991) и кролика (Hu et al., 1993) доказано однозначно.

Дефенсины кролика, введенные в дозе 125 мкг/кг, или 1.25 мг/кг, достоверно снижают такие показатели противосвертывающей системы крови, как неферментативный фибринолиз и уровень гепарина (вариант 2) (табл. 7). Будучи инъецированными в тех же дозах на фоне активации функции противосвертывающей системы (вариант 4), полипептиды способствовали достоверному снижению суммарной фибринолитической активности плазмы в 1.4 раза в первом и 2.6 раза во втором случае по сравнению с вариантом 3, когда животным вводили тромбопластин. При этом резко снижался неферментативный фибринолиз плазмы (в 1.7 и 4.4 раза соответственно). В пользу этого свидетельствуют также данные об уровне гепарина в крови. Повышение концентрации свертываемого тромбином фибриногена в этот период указывает на блокирующий эффект дефенсинов в отношении комплексов гепарина с белками плазмы, в частности с фибриногеном. Дефенсин, по-видимому, разрывает связи между гепарином и белками крови, вследствие чего исчезает присущее комплексам гепарина антиполимеризационное действие и концентрация фибриногена, свертываемого тромбином, увеличивается. Следовательно, дефенсин влияет в рассматриваемых условиях в основном на неферментативный фибринолиз и антикоагулянтные свойства плазмы крови, обусловленные комплексными соединениями гепарина (Кудряшов и др., 1988).

В другой серии опытов выяснили действие дефенсинов в кровотоке при депрессии функции противосвертывающей системы, вызываемой аминазином. Установлено, что при введении в дозе 125 мкг/кг дефенсин приводит к достоверному снижению неферментативного фибринолиза плазмы в 1.3 раза и уменьшению уровня гепарина на 60 % по сравнению с контролем (табл. 8). Показатели коагулограммы плазмы

Таблица 7

Биохимические показатели крови крыс после внутривенного введения дефенсина животным с активацией функции противосвертывающей системы (M±m)

Варианты опыта	Суммарная фибринолитическая активность, мм ²		Неферментативный фибринолиз, мм ²	
	А	Б	А	Б
1	49±4.8	49±2.6	23.6±4.8	20.4±1.7
2	54±1.8	25±7.8	16±1.12	12±0.9
3	86.2±6.9	88.4±13.8	56.4±4.4	62.4±3.0
4	61±8.8	34.2±4.6	34±7.6	14.4±3.8
	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.01

Таблица 7 (продолжение)

Варианты опыта	Уровень гепарина, ед/мл		Концентрация фибриногена, мг%	
	А	Б	А	Б
1	0.2±0.05	0.16±0.01	215±17.5	332±12.5
2	0.15±0.05	—	225±28	—
3	0.26±0.02	0.24±0.02	74±11.5	146±9.6
4	0.16±0.02	0.21±0.02	152±12.5	216±18.0
	p < 0.01	—	p < 0.05	p < 0.01

Примечание. Вариант 1. Введение 0.85 % раствора NaCl, через 5 мин 0.85 % раствора NaCl.

Вариант 2. Введение 0.85 % раствора NaCl, через 5 мин раствора дефенсина.

Вариант 3. Введение тромбопластина, через 5 мин 0.85 % раствора NaCl.

Вариант 4. Введение тромбопластина, через 5 мин раствора дефенсина.

Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб варианта 3. А — дефенсин в дозе 125 мкг/кг, Б — дефенсин в дозе 1.25 мг/кг.

крови и концентрация фибриногена не отличались от контрольных величин. На основании этих данных можно считать, что дефенсин при депрессии функции противосвертывающей системы не усугубляет это состояние, влияя лишь на гепарин и его комплексные соединения. Уровень гепарина уменьшался, по-видимому, вследствие взаимодействия дефенсина с гепарином, при высвобождении последнего из комплексов с протеинами и аминами (Кудряшов и др., 1988; Ляпина и др., 1992).

Таким образом, как в условиях активации функции противосвертывающей системы, так и при ее депрессии внутривенно введенный дефенсин как катионный полипептид соединяется с отрицательно заряженным гепарином, высвобождая последний из комплексов с бел-

Таблица 8

Биохимические показатели крови через 20 мин после введения дефенсина в условиях депрессии функции противосвертывающей системы (M±m)

Условия опыта	Опыт (введение дефенсина в дозе 125 мкг/кг через 15 мин после введения аминазина)	Контроль (введение физиологического раствора через 15 мин после введения аминазина)
Суммарная фибринолитическая активность, мм ²	44.5±6.68 p > 0.5	52.4±6.68
Неферментативный фибринолиз, мм ²	29.9±2.49 p < 0.02	39.0±2.49
Концентрация фибриногена, мг%	328.0±11.30 p > 0.2	315±8.22
Уровень гепарина, %	40.5±6.36 p < 0.01	100±20.23
Данные коагулограммы:		
T ₁	90.4±5.77 p > 0.2	100.57±7.01
T ₂	151.2±32.3 p > 0.5	141.6±9.82
T	70.8±32.3 p > 0.5	41.0±5.05

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно проб контроля. T₁ — время начала свертывания крови (сек), T₂ — время конца свертывания крови (сек), T — разность T₂ - T₁.

ками крови. Вследствие этого в крови наблюдается умеренное снижение антикоагулянтных и неферментных фибринолитических свойств. Важно, что дефенсин не усугубляет депрессию функции противосвертывающей системы. На основании полученных данных можно заключить, что при различных состояниях организма появление в кровотоке дефенсинов приводит к умеренному снижению повышенного уровня антикоагулянтной и неферментативной фибринолитической активностей до контрольных значений. Следовательно, дефенсин может применяться в условиях чрезмерной активности неферментативного фибринолиза для нормализации свертывания крови в акушерской и хирургической практике. Использование дефенсина при повышенной свертываемости крови возможно, так как он не создает состояния предтромбоза.

Наряду с данными эффектами в этой же серии экспериментов нами была продемонстрирована ангиогенная активность дефенсинов (Кудряшов и др., 1989а), никем ранее не описанная. При длительном ежедневном (в течение 14 дней) внутримышечном введении в заднюю лапку крыс дефенсинов кролика в дозе 125 мкг/кг выявлено увеличение плотности микрососудов в скелетных мышцах, диаметра артериол и капилляров. Механизм подобного действия дефенсинов остается не расшифрованным. Однако в контексте нашего изложения следует предположить возможность реализации рассматриваемой активности

дефенсинов на репаративной стадии воспаления (Кудряшов и др., 1990). В пользу этого предположения свидетельствуют данные С. Murphy и др. (1993) о митогенной активности малых концентраций дефенсина, проявляемой в культуральных условиях.

Формирование полноценного в функциональном отношении очага воспаления немыслимо без поддержания гемостаза на уровне микроциркуляторного русла органов и тканей. Естественно предполагать участие в этом процессе катионных пептидов и белков, локализованных первоначально в гранулярном аппарате НГ и секретируемых во внеклеточное пространство под воздействием многочисленных медиаторов воспаления (Henson et al., 1992). Поскольку многие инициирующие воспаление факторы оказывают на сосуды повреждающее действие, перед организмом в этих условиях встает задача сокращения кровопотери до минимума. Первые сведения о прокоагулирующей активности низкомолекулярных катионных белков (дефенсинов) кролика были получены на моделях *in vitro* в конце 60-х годов (Saba et al., 1967; Nawiger et al., 1969). В ее основе лежит способность дефенсинов, как поликатионов, электростатически взаимодействовать с полианионным по природе гепарином, нейтрализуя при этом физиологические свойства последнего. Выше нами были рассмотрены результаты совместных исследований с сотрудниками кафедры физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова (руководитель — акад. РАМН И. П. Ашмарин) по изучению влияния общей фракции дефенсинов кролика на систему неферментативного фибринолиза крови. Основным выводом этих исследований заключается в признании за дефенсинами прокоагулирующей активности. Кроме того, зарубежными исследователями была продемонстрирована способность дефенсинов человека влиять ингибирующим образом и на каскад ферментативного фибринолиза крови. В частности, было показано, что дефенсины ингибируют фибринолиз, запускаемый активатором плазминогена тканевого типа (tPA) (Higazi et al., 1995, 1996). Они способствуют связыванию плазминогена с фибрином и культуральными эндотелиальными клетками человека. Этот эффект напоминает тот, который был описан для липопротеина (a) (Lin et al., 1994), ингибирующего фибринолиз посредством крингл-крингл-подобного взаимодействия. Так же, по-видимому, действует и дефенсин человека, который конкурирует с плазминогеном за связывание с фибрином. Возможно, что антифибринолитическая активность дефенсина в очагах воспаления служит фактором, препятствующим распространению инфекции благодаря иммобилизации бактерий в фибриновых сгустках.

Не последнюю роль в поддержании крови в растворимом состоянии играют, по-видимому, сериновые протеиназы (эластаза, кателпсин G) нейтрофильных гранулоцитов. Группой американских ученых продемонстрирована способность лейкоцитарной эластазы осуществлять фибринолиз (Plow, 1986). Причем данная фибринолитическая система функционирует в организме независимо от плазмينا. В пользу этого говорит неидентичность продуктов переваривания фибриногена двумя протеолитическими системами. Предполагают, что роль

дополнительной фибринолитической системы может значительно возрастать в условиях очага воспаления. Все эти данные свидетельствуют о возможной функции катионных пептидов и белков в гемостазе.

Один из важных механизмов поддержания гемостаза связан с тромбоцитами и их физиологически активными соединениями. В связи с этим представляет важный интерес изучение действия дефенсинов и протегринов на функциональную активность и метаболизм тромбоцитов. Исследование в этом направлении осуществлено отечественными учеными (Ашмарин и др., 1993; Ткаченко и др., 1994; Ткаченко и др., 1996; Tkachenko et al., 1993; Tkachenko et al., 1994). В этих работах было показано, что дефенсины человека (HNP-1, HNP-2, HNP-3) и протегрин PG-2 свиньи оказывают сходное действие на агрегацию и секрецию тромбоцитов *in vitro*. Обладая проагрегационной активностью в высоких концентрациях (50—100 мкг/мл), дефенсины и протегрины в низких дозах (0.1—40 мкг/мл) проявляют антиагрегационные и антисекреторные свойства в отношении тромбоцитов человека. Необходимо подчеркнуть, что в случае инфекционной патологии содержание дефенсинов человека в плазме крови может достигать 1 мкг/мл или более (Panyutich et al., 1993), т. е. того диапазона концентраций, при котором выражены преимущественно антиагрегационные свойства антибиотических пептидов. Возможно, что дефенсины и протегрины при их секреции из нейтрофилов могут выступать в роли медиаторов лейкоцитарно-тромбоцитарных взаимодействий, направленных на поддержание гемостаза при инфекционных заболеваниях и стрессорных ситуациях, которые сопровождаются мобилизацией из костно-мозгового депо значительного числа нейтрофилов.

Итак, сочетание в дефенсинах антимикробных и модулирующих гемостаз свойств позволяет рассматривать эти полипептиды в качестве перспективного объекта дальнейшего углубленного исследования с целью создания новых лекарственных средств для медицины и ветеринарии. Возможно, что именно с многонаправленными воздействиями дефенсинов на иммунную систему животного организма связан защитный эффект этих пептидов при экспериментальной герпетической инфекции, установленный в нашей лаборатории (Кокряков и др., 19896).

7.4. ДЕФЕНСИНЫ КАК МЕДИАТОРЫ ЭНДОКРИННО-ИММУННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ

Специальный интерес, с нашей точки зрения, представляют накапливаемые в последние годы сведения о возможном участии дефенсинов в регуляции стероидогенной функции надпочечников. В 1987 г. группа канадских исследователей (Zhu et al., 1987) выделила из легких кролика полипептиды, подавляющие в культуральных условиях продукцию глюкокортикоидов клетками коркового слоя надпочечников крысы, которая была индуцирована адреналокортикотропным гормоном (АКТГ). Как было установлено далее, эти вещества оказались

дефенсинами, а выявленное их новое свойство было названо кортико-статическим (Zhu et al., 1988). В последующих исследованиях были выделены дефенсины с кортикостатической активностью из лейкоцитов человека (Singh et al., 1988) и костного мозга морской свинки (Hu et al., 1991) и крысы (Belcourt et al., 1992). Изучение молекулярных механизмов кортикостатического действия дефенсинов показало, что рассматриваемый эффект обусловлен конкурентным связыванием пептида с рецепторами адренкортикотропного гормона (Zhu et al., 1989; Zhu, Solomon, 1992). Данное связывание приводит к блокированию каскада трансдукции гормонального сигнала и прерыванию вследствие этого процессов синтеза и секреции глюкокортикоидов клетками коркового слоя надпочечников. Подобный механизм кортикостатического действия дефенсинов был подтвержден и японскими исследователями (Tomimaga et al., 1990). По мнению канадских авторов (Bateman et al., 1989), биологическая роль рассматриваемого феномена может заключаться в модуляции дефенсинами нейроэндокринно-иммунных взаимодействий, опосредованных функционированием надпочечников. Экспериментальные данные в подтверждение этой гипотезы были получены нашим научным коллективом в НИИ экспериментальной медицины РАМН.

Нами было исследовано влияние экзогенных дефенсинов на некоторые показатели эндокринного и иммунологического статуса организма экспериментальных животных в условиях стресс- и АКТГ-индуцированной активности гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГТАКС). Поскольку при данных воздействиях имеет место интенсификация продукции глюкокортикоидных гормонов надпочечниками, эти модели можно рассматривать как адекватные для изучения кортикостатической активности дефенсинов *in vivo* (Шамова и др., 1993).

На модели ротационного стресса (10 мин при 78 об/мин) нами было установлено, что дефенсины кролика, вводимые внутривентриально за 10 мин до начала стрессорного воздействия, вызывают у мышей заметное снижение кортикостерона в крови (табл. 9). Подавляющее глюкокортикоидную реакцию действие дефенсинов было наиболее выражено через 30 мин после окончания стрессорного воздействия. Введение дефенсинов за 1 ч или через 30 мин после стресса оказалось неэффективным.

Сходные изменения в уровне кортикостерона в крови были получены при введении дефенсинов кролика крысам в период, предшествующий острому холодовому воздействию (-20 °С, 20 мин). Содержание гормона у таких животных было почти в 2 раза ниже по сравнению с группой, подвергнутой только стрессу (62—72 против 128—145 нг/мл).

Стереотипность гормональных сдвигов у исследованных животных под воздействием парентерально вводимых дефенсинов может свидетельствовать об единообразии морфобиохимических механизмов, вовлекаемых в формирование и модуляцию стрессобусловленных состояний. Вслед за канадскими исследователями можно допустить, что

Влияние дефенсинов на изменение концентрации кортикостерона в крови мышей, подвергнутых ротационному стрессу

Группа животных и условия эксперимента	Концентрация кортикостерона, нг/мл		
	через 30 мин	через 60 мин	через 120 мин
1. За 10 мин до стресса введен физраствор <i>n</i> = 6	290±27 <i>n</i> = 6	316±41 <i>n</i> = 6	295±46 <i>n</i> = 5
2. За 10 мин до стресса введен дефенсин кролика в дозе 20 нг/г <i>n</i> = 6	164±18* <i>n</i> = 6	213±32* <i>n</i> = 5	178±37 <i>n</i> = 5
3. За 10 мин до стресса введен дефенсин кролика в дозе 2 мкг/г <i>n</i> = 6	52±26* <i>n</i> = 6	114±12* <i>n</i> = 6	168±8* <i>n</i> = 6

Примечание. Здесь и в табл. 10—12 *n* — количество животных в группе.

* — *p* < 0.05 в сравнении с 1-й группой. Обработано по *t*-критерию Стьюдента.

одной из возможных мишеней воздействия дефенсинов могут быть рецепторы АКТГ-клеток коркового слоя надпочечников, конкурентное связывание полипептидов с которыми подавляет синтез и секрецию кортикостерона (Zhu et al., 1989).

В пользу этих представлений свидетельствуют данные нашей лаборатории о влиянии индивидуальных фракций дефенсинов кролика на характер АКТГ-индуцированной глюкокортикоидной реакции у мышей (табл. 10). Из шести использованных фракций дефенсинов наибольшее кортикостатическое действие проявили компоненты NP-3а и NP-3в, которые и в культуральных условиях были наиболее активны в рассматриваемом отношении (Zhu et al., 1989; Zhu, Solomon, 1992).

Специальный интерес представляло изучение кортикостатических свойств открытых нами полипептидов из лейкоцитов свиньи — протегринов, первичная структура которых характеризуется заметным сходством с таковой фракции NP-3а дефенсинов кролика. На той же экспериментальной модели было установлено кортикостатическое действие фракции PG-3 протегринов свиньи, тогда как PG-1 и PG-2 в использованных дозах оказались неэффективными (табл. 11). Интересно, что в структурном отношении именно фракция PG-3 наиболее схожа с NP-3а. Есть основания предполагать, что для конкурентного связывания дефенсинов и протегринов с рецептором кортикотропина определенную роль играет не только последовательность из трех остатков аргинина (RRR), но и аминокислота глицин, которая является N-концевой у NP-3а, занимает 4-ю позицию в полипептиде PG-3 и отсутствует у компонентов PG-1 и PG-2. На значимость глицина в реализации кортикостатического действия дефенсинов указывают данные японских исследователей (Fuse et al., 1993), которые из селезенки кроликов выделили новую фракцию. По своей первичной структуре она оказалась очень близкой к таковой фракции NP-3а (три замены в положении 11, 13 и 15), но без N-концевого глицина. Этот новый компонент дефенсинов не обладал кортикостатической активностью в культуральных условиях.

Таблица 10

Влияние индивидуальных фракций дефенсинов кролика на вызванное АКТГ повышение уровня кортикостерона (КС) в сыворотке крови мышей

Группа животных и условия эксперимента	Доза вводимого препарата	Концентрация КС в сыворотке, нг/г	n
1. Интактные	—	28.7±11.4	12
2. Введен физраствор	—	52.7±2.2	5
3. Введен ЛФ	0.5 мкг/г	31±4.5	4
4. Введен NP-2	0.5 мкг/г	42.5±3.2	5
5. Введен АКТГ	—	73.2±9.6	5
6. Введен физраствор за 30 мин до АКТГ	—	75.3±11.5	5
7. Введен NP-1 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	73.4±13.5 64.8±10.8	5 5
8. Введен NP-2 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	73.6±14.6 70±6.2	5 5
9. Введен NP-3а за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	60.6±9.1 45.8±8.1*	5 5
10. Введен NP-3в за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	44.6±5.7* 45.8±6.4*	5 5
11. Введен NP-4 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	80.3±6.7 65.3±13.8	5 5
12. Введен NP-5 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 0.5 мкг/г	64.4±1.9 75.4±5.4	5 5
13. Введен ЛФ за 30 мин до АКТГ	50 нг/г	65.5±9.3	5
14. Введен протамина-сульфат за 30 мин до АКТГ	0.5 мкг/г	74.3±13	4

* — $p < 0.05$ в сравнении с 6-й группой. Обработано по t-критерию Стьюдента.

Рассмотренные данные являются еще одним убедительным свидетельством в пользу существования закономерной связи между химической структурой полипептидов и их функциональной активностью.

Кортикостатическое действие отдельных фракций дефенсинов и протегринов может иметь далеко идущие последствия для физиологии человека и животных. Глюкокортикоидные гормоны оказывают разнообразное и существенное влияние на формирование защитных реакций организма, в том числе и иммунного ответа (Корнева, Шхинек, 1988). Известно, что гиперпродукция глюкокортикоидов надпочечниками является одной из причин стрессобусловленных дисфункций иммунной системы (Munck et al., 1984; Wateman et al., 1989). В свете полученных нами данных можно было предположить, что иммуносупрессивное действие некоторых видов стресса может быть отменено профилактическим введением дефенсинов. В нашей лаборатории на

Таблица 11

Влияние индивидуальных фракций протегринов на вызванное АКТГ повышение уровня кортикостерона (КС) в сыворотке крови мышей

Группа животных и условия эксперимента	Доза вводимого препарата	Концентрация КС в крови, нг/мл	n
1. Интактные	—	31±13	10
2. Введен физраствор	—	52±34	5
3. Введен физраствор за 30 мин до АКТГ	—	171±16	6
4. Введен PG-1 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 500 нг/г	183±47 161±26	5 5
5. Введен PG-2 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 500 нг/г	173±12 157±29	5 5
6. Введен PG-3 за 30 мин до АКТГ	50 нг/г 500 нг/г	132±19 122±15*	5 5
7. Введен протамин за 30 мин до АКТГ	500 нг/г	138±31	5
8. Введен БСА за 30 мин до АКТГ	500 нг/г	161±20	5

Примечание. БСА — бывший сывороточный альбумин.

* — $p < 0.05$ в сравнении с 3-й группой. Обработано по t-критерию Стьюдента.

Таблица 12

Влияние дефенсинов на уровень титров антител (АТ) к эритроцитам барана в сыворотке крови и число антителообразующих клеток (АОК/10⁶ кл) в селезенке при стрессиндуцированной иммуносупрессии у мышей

Показатель	Нестрессированные иммунизированные мыши	Стрессированные иммунизированные мыши	Введение дефенсина кролика, мкг/г			
			20	2	20	2
			Нестрессированные иммунизированные мыши		Стрессированные иммунизированные мыши	
	I	II	III	IV	V	VI
Титры АТ	2.4	0.15	2.4**	2.7**	3.2*	2.2*
n	7	7	7	7	4	5
АОК	49.0	1.7	85.7**	67.0**	53.0*	67.0*
n	7	7	7	7	4	5

Примечание. I—VI — группы животных. n — количество животных в группе. * — $p < 0.05$ по сравнению с группой I. * — $p < 0.05$ по сравнению с группой II. Обработано методом Вилкоксона—Манна—Уитни.

модели комбинированного стресса у мышей (последовательная иммобилизация животных сначала 1 ч при +4 °С, а затем в течение суток при комнатной температуре), который практически блокирует гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана (табл. 12), была продемонстрирована способность препарата суммарных дефенсинов кролика отменять стрессиндуцированную иммуносупрессию (варианты V и VI). Необходимо подчеркнуть, что иммунопротективное действие дефенсинов в условиях данного эксперимента может быть обусловлено не только их нормализующим (кортикостатическим) влиянием на стероидогенную функцию надпочечников. Учитывая установленную хемотаксическую активность дефенсинов в отношении моноцитов, можно допустить, что одним из дополнительных механизмов выявленного эффекта может быть функциональная мобилизация клеток мононуклеарной фагоцитирующей системы (Territo et al., 1989; Chertov et al., 1996). Не исключено, что именно множественное действие дефенсинов в условиях организма обеспечивает защитный эффект этих полипептидов при герпетической инфекции у животных, впервые продемонстрированный нами (Кокряков и др., 1989б).

В связи с рассмотренными экспериментальными и литературными данными можно предположить, что функциональная значимость нейтрофила при стрессе (Горизонтов и др., 1983) не ограничивается превентивным усилением антимикробного барьера организма. В процессе мобилизации нейтрофилов и их миграции в ткани, «пограничные к инфекции», имеет место постоянная секреция физиологически активных веществ их лизосомного (гранулярного) аппарата во внеклеточную среду, в том числе и дефенсинов (Panuytich et al., 1991). При этом последние уже в роли гуморальных факторов могут проявлять свои кортикостатические и иммунопротективные свойства, обеспечивая взаимодействие иммунной и нейроэндокринной систем, направленное на формирование защитных реакций при стрессе (Шамова и др., 1993).

Таким образом, дефенсины являются не только антимикробными молекулами широкого спектра действия, но и медиаторами отдельных реакций фагоцитарных, воспалительных и стрессорных процессов, что позволяет рассматривать их в качестве регуляторных пептидов адаптогенного действия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выживание всех видов животных — от простейших до позвоночных, включая человека, — в среде, изобилующей потенциально патогенными микроорганизмами, было возможным только при условии формирования у них в процессе эволюции механизмов, обеспечивающих невосприимчивость к инфекционным болезням, или иммунитет (Мечников, 1892, 1903; Votaw, 1991). И хотя в соответствии с современным уровнем знаний биологическая значимость механизмов иммунитета не ограничивается только поддержанием стерильности внутренней среды животного организма (Janeway, Travers, 1997), остается незабытым один из ранних постулатов иммунологии о ключевой роли процесса фагоцитоза в инактивации (киллинге, умерщвлении) и переваривании бактерий, низших грибов, простейших и некоторых оболочечных вирусов (Пигаревский, 1978; Войно-Ясенецкий, 1981; Фрейдлин, 1984; Маянский, Маянский, 1989; Кокряков, 1990; Klebanoff, Clark, 1978; Edvards, 1994).

Рассмотрение ряда физико-химических, структурных и функциональных свойств антибиотических пептидов и белков (дефенсины и структурно-родственные им соединения, цекропины, магейнины, лактоферрин, миелопероксидаза и др.) клеток и жидких сред животных, осуществленное в настоящей монографии, служит основанием для переосмысления ряда положений современной концепции иммунитета. В частности, принципиальная новизна представлений о механизмах антимикробной активности нейтрофилов заключается в обосновании ключевой роли катионных полипептидов и белков в инактивации (киллинге) фагоцитированных ими микроорганизмов (Кокряков и др., 1981, 1997; Пигаревский, 1983, 1988; Кокряков, 1988; Spitznagel, 1984; Elsbach, 1990; Gabay, 1994; Levy, 1996; Lehrer, Ganz, 1996). Это отличает их от распространенных еще в недавнем прошлом взглядов об определяющем значении в данном процессе кислых лизосомных гидролаз, которые нашли отражение в ряде монографий (Покровский, Тутельян, 1976; Swanson, Webster, 1977).

Именно совместное действие на микробы антибиотических пептидов и белков в фаголизосомах профессиональных фагоцитов (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, эозинофилы) в значительной степени определяет завершенность фагоцитоза, т. е. защитную направленность эволюционно закрепленного процесса. И в этом в первую очередь заключается основная функция антибиотиков животного происхождения. Функциональная

недостаточность системы антибиотических пептидов и белков, обусловленная либо дефицитом этих молекулярных факторов (Пигаревский и др., 1988), либо изменениями их структуры, которые снижают их активность, приводит к незавершенности фагоцитоза, к превращению его в патогенетический процесс поддержания и распространения инфекционных агентов (Gallin, 1992).

Необходимо подчеркнуть, что ряд антибиотических пептидов и белков являются не только внутриклеточными, но и гуморальными факторами врожденного иммунитета. Например, дефенсины, лизоцим, лактоферрин и лактопероксидаза человека продуцируются клетками барьерных эпителиев желудочно-кишечного, респираторного и мочеполового трактов и секретируются на поверхность слизистых, образуя вкупе с другими веществами на уровне клеточно-тканевых систем организма, «пограничных к инфекции», биохимический барьер, обеспечивающий превентивную инактивацию микроорганизмов. В дополнение к этому они играют, по-видимому, немаловажную роль в формировании и поддержании определенного видоспецифического профиля аутофлоры на кожных и слизистых поверхностях организма (Boman, 1996). К выяснению конкретных механизмов этого процесса медико-биологическая наука еще только приступает. Такие пептиды, как цекропины, реализуют свои антибиотические потенции во внутренней неклеточной среде насекомых (гемолимфе), что, например, несвойственно дефенсинам млекопитающих (Boman, 1994), которые в крови быстро инактивируются серпинами (Paputich et al., 1995). Преимущественно внеклеточно функционируют магейнины и бревинины кожи лягушек (Zasloff, 1992). Об эффективности системы защиты, базирующейся на антибиотических пептидах и белках, свидетельствует то обстоятельство, что преобладающее число видов животных в природе эффективно противостоит микробной агрессии, несмотря на отсутствие у них клеточно-гуморальных механизмов приобретенного (специфического) иммунитета (Zasloff, 1992; Boman, 1995; Hoffmann, 1995).

Антибиотические пептиды (дефенсины, протегрины, цекропины, магейнины, бревинины, бактенецины и др.) и белки (пероксидазы, лактоферрин, бактерицидная проникающая увеличивающая белок, серпроцидины, лизоцим, фосфолипаза А2) формируют в различных сочетаниях и представительстве молекулярную основу врожденного иммунитета всех видов животных — от простейших до позвоночных и человека. Рассмотренная в настоящей работе биохимическая система защиты животных от инфекции является эволюционно наиболее древней, а потому базисной для других механизмов, которые по отношению к ней могут рассматриваться как надстроечные. Необходимо помнить, что в ходе эволюционного усложнения и совершенствования структур и механизмов, обеспечивающих гомеостаз, повышенную жизнеспособность, выживание и размножение животных, наблюдается, как правило, включение ранее возникших молекул в новые функциональные и регуляторные связи. Не является исключением в этом отношении и иммунная система позвоночных. Исследования в об-

ласти механизмов взаимодействия врожденного и приобретенного блоков иммунной защиты относительно немногочисленны. Один из путей воздействия антибиотических пептидов на интенсивность реакций специфического иммунитета может быть связан с их способностью модулировать продукцию цитокинов, участвующих в гуморально-клеточной кооперации при инициации и развитии иммунного ответа. Известна способность дефенсинов поддерживать функционально значимый уровень интерлейкина-1 в крови стрессированных животных (Орлов, 1998; Korneva et al., 1997), ингибировать митоген-стимулируемую секрецию γ -интерферона и интерлейкина-6 мононуклеарными лейкоцитами крови человека (Mäser et al., 1996), а также стимулировать продукцию интерлейкина-8 эпителиальными клетками респираторного тракта *in vitro* (Van Wetering et al., 1997).

Дефенсины могут проявлять еще ряд функциональных свойств, важных для формирования защитно-приспособительных реакций организма. Они являются хемотаксическими факторами для макрофагов (Territo et al., 1989) и усиливают их фагоцитарную активность (Fleischmann et al., 1985), увеличивают проницаемость кровеносных сосудов непосредственно (Ranadive, Cochrane, 1968) и через дегрануляцию тучных клеток (Yamashita, Saito, 1989). В наших совместных исследованиях с сотрудниками кафедры физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова впервые было продемонстрировано свойство дефенсинов кролика, вводимых внутривенно или внутримышечно, нормализовывать свертываемость крови, нарушенную вследствие избыточного содержания в ней гепарина и его комплексных соединений с белками и аминами плазмы (Кудряшов и др., 1988, 1989а). В основе выявленного эффекта лежит способность катионных дефенсинов связывать анионный гепарин, в результате чего нейтрализуется фибринолитическая активность последнего (Ляпина и др., 1992). В дополнение к этому было установлено, что дефенсины усиливают ангиогенез в местах их внутримышечной инъекции (Кудряшов и др., 1989б) и стимулируют заживление кожных асептических ран (Кудряшов и др., 1990).

Другой, пока еще во многом остающийся гипотетическим, путь регулирующего влияния дефенсинов на реакции приобретенного иммунитета может быть связан со способностью этих антибиотических пептидов подавлять АКГГ- и стрессиндуцированную продукцию глюкокортикоидов клетками надпочечников (Шамова и др., 1993; Zhu et al., 1988; Bateman et al., 1989). Известно, что глюкокортикоиды крови являются одним из факторов, реализующих адекватный специфический иммунный ответ организма человека и позвоночных животных на антиген (Корнева, Шхинек, 1988). Однако длительная избыточная продукция глюкокортикоидов может приводить в ряде случаев к подавлению иммунных реакций организма, формированию приобретенного иммунодефицитного состояния. Возможно, что выброс дефенсинов нейтрофилами в кровь является одним из регуляторных механизмов, осуществляющих сдерживание гиперфункции клеток коры надпочечников и через нормализацию уровня глюкокортикоидов обеспечивающих адекватный иммунный ответ организма в стрессор-

ных ситуациях. Дефенсины в связи с этой активностью могут рассматриваться как медиаторы эндокринно-иммунных взаимодействий (Solomon, 1993; Корнева et al., 1997).

Не исключено, что функции дефенсинов в физиологических отправлениях животного организма существенно шире, чем мы это представляем на сегодняшний день. Немногочисленные пока работы свидетельствуют об активирующем воздействии дефенсинов с кортикостатической активностью на Са-каналы L-типа (MacLeod et al., 1991), модуляции активности медленных Na-каналов нейронов спинного мозга крыс (Ноздрачев и др., 1997), ингибировании дефенсинами насекомых Са-зависимых K⁺-каналов (Natori, 1994). Подобные эффекты предполагают более избирательный характер взаимодействия дефенсинов с регулирующими системами по типу лигандрецепторного. Через влияние на ионные каналы клеток может реализовываться и митогенное действие дефенсинов (Murphy et al., 1993).

Все эти данные указывают на функциональную полипотентность дефенсинов, реализация которой может в значительной степени определять эффективность защитных реакций, осуществляемых нейтрофилами при фагоцитозе, воспалении и стрессе (Кокряков и др., 1997).

Интересно, что дефенсины имеют черты структурного сходства с некоторыми олигопептидными токсинами из ядов актиний, морских моллюсков, пчел, скорпионов и змей (Hill et al., 1991; Lee et al., 1995). Наличие в первичной структуре дефенсинов, протегринов, додекапептида и ряда пептидов из кожи лягушек относительно большого количества остатков основных аминокислот (аргинина, лизина, гистидина) и цистеина, образующих внутримолекулярные дисульфидные мостики, объединяет по этим физико-химическим свойствам антибиотические пептиды с природными олигопептидными токсинами, обладающими нейро-, мио- и кардиотоксическими свойствами (Замятнин, 1996). Нельзя исключить и единого молекулярно-генетического происхождения двух распространенных в эволюции животного мира групп физиологически активных веществ, одна из которых специализировалась на защите от инфекции, в то время как другая стала молекулярным орудием агрессии и нападения. Предполагаемая общность происхождения дефенсинов насекомых (сапеллин В) и некоторых пептидных токсинов (харибдотоксин) скорпионов определенно просматривается при сравнении их первичных структур и конформаций. Наблюдаемая структурная гомология предполагает наличие у этих групп соединений общих функциональных свойств. Действительно, как харибдотоксин, так и сапеллин В обладают способностью блокировать Са-зависимые K⁺-каналы (Yamada, Natori, 1993). Вслед за академиком А. М. Уголевым (Уголев, 1985), обратившим внимание на структурное сходство пептидных гормонов желудочно-кишечного тракта и ядов кожи лягушки, можно предположить, что первоначальная физиологическая роль ряда антибиотических пептидов (дефенсины, цекропины, магейнины) и (или) их структурных предшественников состояла в поддержании регуляторных функций организма, например в регуляции активности ионных каналов клеток и некоторых ферментов, связанных с мембранами (протеинкиназы С), интенсивности

окислительного фосфорилирования, а также в воздействии на каскады трансдукции внешних сигналов, приводящих к делению клеток (митогенная активность некоторых дефенсинов). Эти же пептиды, продуцируемые в больших количествах фагоцитами и клетками барьерных эпителиев, «пограничных к инфекции», используются организмом животных в качестве защитных молекул, осуществляющих инактивацию микроорганизмов. В высоких дозах они являются цитотоксическими соединениями неотложного действия с широким спектром антимикробной активности. И эта функция антибиотических пептидов закрепились в эволюции на протяжении длительного периода развития от одноклеточных животных до человека, несмотря на то что ее конкретные молекулярные носители принадлежат подчас к различным пептидным семействам.

В частности, микробицидный потенциал нейтрофилов не ограничивается только цистеинсодержащими катионными полипептидами. Нами из нейтрофилов свиньи выделен линейный основной белок, богатый аргинином и пролином (PR-39), структурный гомолог которого был ранее обнаружен в слизистой тонкой кишки этого же животного (Agerberth et al., 1991). Несмотря на принципиальное различие в организации молекул PR-39 и дефенсинов, первые обладают таким же широким спектром антимикробного действия, как и вторые. Важную роль в защите животных от инфекции играют белки с избирательной антимикробной активностью в отношении грамотрицательных бактерий: бактерицидная проникающая способность увеличивающий белок из нейтрофилов человека, кролика и коровы (Weiss et al., 1978; Elsbach, Weiss, 1992, 1993), бактенецины Bac5 и Bac7 из нейтрофилов коров (Frank et al., 1990) и профенин (Harwig et al., 1995a). По-видимому, в процессе эволюции возникали и отбирались параллельно несколько групп антибиотических веществ белково-пептидной природы, взаимодействие (кооперация) между которыми обеспечивало надежность неотложной антимикробной защиты животных и их выживание в условиях постоянного соприкосновения с патогенной микрофлорой окружающей среды. Так, из слизистой кишечника свиньи был выделен антимикробный белок (SWLSKTAKKLENSAKKRISSEGLAIAIQGGPR) (Lee et al., 1989), относящийся по своей структуре к группе цекропинов — катионных полипептидов, которые широко представлены в гемолимфе куколок шелкопрядов (Boman, 1991). В выделениях кожных желез шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* обнаружен другой катионный полипептид с универсальной антимикробной активностью — магейнин (Zasloff, 1987). По мнению группы исследователей (Харченко и др., 1990), антимикробная активность рассмотренных специализированных катионных веществ белково-пептидной природы может дополняться в условиях очагов воспаления действием коротких пептидов типа KRFAE, выщепляемых из разных белков организма в результате ограниченного протеолиза. Подобные пептиды могут быть составным компонентом механизмов неспецифической защиты организма человека и животных от инфекций.

При всем структурном разнообразии дефенсинов, β-дефенсинов, дефенсинов насекомых, протегринов, тахиплезинов, цекропинов,

магейнинов, белка PR-39 и коротких щелочных пептидов всех их объединяет в один функциональный класс общий механизм антимикробного действия, который заключается в нарушении структурно-функциональной целостности цитоплазматической мембраны микроорганизмов (Ашмарин и др., 1972; Пигаревский, 1978, 1983; Кокряков, 1988; Voman, 1991, 1995; Lehrer et al., 1993).

Антимикробная активность дефенсинов, протегринов, белка PR-39, бактенецинов, профенинов дополняется эффективным воздействием на бактериальные клетки кислородозависимой миелопероксидазной системы и лактоферрина, синергические взаимодействия которых в инактивации стафилококков впервые были продемонстрированы нами. Именно благодаря совместному антимикробному действию лизосомных катионных белков нейтрофилов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидная проникающая способность увеличивающий белок, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефенсины, протегрины) осуществляются одновременно многонаправленные повреждающие воздействия на структурную целостность и обмен веществ микроорганизмов, приводящие к их гибели при фагоцитозе и воспалении. Данные о снижении фагоцитарной активности нейтрофилов новорожденных животных и человека, обусловленной транзиторным дефицитом рассматриваемых катионных белков, свидетельствуют в пользу их ключевой роли в осуществлении киллерной функции. Усиление микробицидного потенциала макрофагов в результате резорбции ими катионных белков нейтрофилов также подтверждает биологическую значимость этих соединений в процессе межклеточной кооперации в очагах воспаления (Пигаревский, 1978, 1992).

Роль антимикробных белков фагоцитов и секретов слизистых и кожных покровов организма человека и животных не ограничивается их функционированием в качестве антибиотических веществ. Известно, что лактоферрин повышает адгезивность нейтрофилов (Oseas, 1981a, 1981b), обладает опсонизирующей активностью для макрофагов (Lima, Kierszenbaum, 1985) и влияет на процесс гранулоцитопоза в костном мозге (Wrochmeyer et al., 1978; Wrochmeyer, Platzer, 1984). Эластаза и катепсин G нейтрофилов через участие в генерации физиологически активных пептидов ренин-ангиотензиновой (Dzau et al., 1987), калликреинкининовой (Wasi, Movat, 1979) и племен-тарной систем вовлекаются в регуляторные системные реакции, сопряженные с процессами фагоцитоза, воспаления и иммуногенеза (Янковский, Довнар, 1985; Havemann, Gramse, 1984).

Представленные в настоящей монографии данные служат основанием для вывода о том, что антимикробные белки и полипептиды фагоцитов, гемоцитов и жидких сред организма (пероксидазы, лактоферрин, бактерицидная проникающая способность увеличивающий белок, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефенсины, протегрины и структурно-родственные им полипептиды) являются физиологически активными веществами, участвующими в реализации и обеспечении взаимодействия защитных реакций при фагоцитозе, воспалении и стрессе.

ЛИТЕРАТУРА

- Адо А. Д. Патофизиология фагоцитов. М., 1961. 295 с.
- Анатолий С. А., Кокряков В. Н., Юнусова М. И. и др. Влияние катионных белков клеточного происхождения на выживаемость стафилококков // ЖМЭИ. 1977. № 3. С. 71—75.
- Афиногенов Г. Е., Панарин Е. Ф. Антимикробные полимеры. СПб., 1993. 264 с.
- Ашмарин И. П., Ждан-Пушкина С. М., Кокряков В. Н. и др. Антибактериальные и антивирусные функции основных белков клетки и перспективы практического их использования // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1972. № 4. С. 502—508.
- Ашмарин И. П., Кокряков В. Н., Пигаревский В. Е. Катионные белки лизосом лейкоцитов, деградация и возможности загрязнения гистонами при выделении // Вопр. мед. химии. 1973. Т. 19, вып. 4. С. 381—386.
- Ашмарин И. П., Кокряков В. Н., Лылова С. Н., Раменская Н. П. Взаимодействие катионных белков гранул и миелопероксидазы лейкоцитов // Вопр. мед. химии. 1977. № 4. С. 534—537.
- Ашмарин И. П., Ткаченко С. Б., Рудько И. А. и др. Влияние дефенсина на функциональную активность тромбоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1993. Т. 115, № 1. С. 23—25.
- Бережная Н. М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. Киев, 1988. 192 с.
- Борисов А. И., Кокряков В. Н., Слепенков С. В. и др. Сравнение физико-химических свойств двух пероксидаз лейкоцитов крови свиньи // Вестн. ЛГУ. 1982. № 15. С. 42—46.
- Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск, 1974. 208 с.
- Войно-Ясенецкий М. В. Биология и патология инфекционных процессов. Л., 1981. 208 с.
- Глебов Р. Н. Эндоцитоз и экзоцитоз. М., 1987. 95 с.
- Гончаров Н. П., Воронцов В. И., Кацля М. Изучение гормональной функции надпочечника и половых желез в опытах на обезьянах методом конкурентного связывания с белком плазмы // Вестн. АМН СССР. 1977. № 8. С. 13—20.
- Горьзонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова Н. И. Стресс и система крови. М., 1983. 240 с.
- Гусев А. И., Цветков В. С. К технике постановки реакции микропреципитации в агаре // Лаб. дело. 1961. № 2. С. 43—44.
- Гуткин В. С., Горбатов В. А., Феоктистова Т. А. Лизосомы в антибактериальном иммунитете животных. М., 1984. 304 с.
- Данилова М. А. Морфологические проявления антимикробного действия катионных белков нейтрофильных гранулоцитов // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л., 1988. С. 52—75.
- Долгушин И. И. Взаимодействие нейтрофилов с иммунокомпетентными клетками // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций. Горький, 1989. С. 74—81.

Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М., 1986. 448 с.

Егоров Н. С., Силаев А. Б., Катруха Г. С. и др. Антибиотики-полипептиды. М., 1987. 264 с.

Ермольева З. В. Антибиотики. Интерферон. Бактериальные полисахариды. М., 1965. 383 с.

Ждан-Пушкина С. М. О действии протаминов, гистонов и полипептидов основного характера на микроорганизмы // Науч. докл. высшей школы. 1973. Вып. 8. С. 82—98.

Замятин А. А. Физико-химические и биологические особенности природных олигопептидных токсинов // Нейрохимия. 1996. Т. 13, вып. 4. С. 243—259.

Земсков А. М., Караулов А. В., Земсков В. М. Комбинированная иммунокоррекция. М., 1994. 260 с.

Зильбер А. А. Основы иммунологии. М., 1958. 599 с.

Зимин Ю. И. Стресс: Иммунологические аспекты // Итоги науки и техники. Сер. Иммунология. М., 1983. Т. 12. С. 41—46.

Кагава Я. Биомембраны. М., 1985. 303 с.

Кокряков В. Н. Биохимические основы антимикробной активности нейтрофильных гранулоцитов // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л., 1988. С. 12—51.

Кокряков В. Н. Катионные белки лизосом нейтрофильных гранулоцитов при фагоцитозе и воспалении // Вопр. мед. химии. 1990. № 6. С. 13—16.

Кокряков В. Н., Ротова Г. М. Синергическое антимикробное действие миелопероксидазы и лактоферрина нейтрофилов свиньи. М., 1985. 10 с. Деп. в ВИНТИ, № 3519-85 деп.

Кокряков В. Н., Ашмарин И. П., Пигаревский В. Е. О природе некоторых фракций лизосомальных катионных белков лейкоцитов // Биохимия. 1973. Т. 38, вып. 6. С. 1276—1280.

Кокряков В. Н., Тольбеков А. С., Ашмарин И. П., Пигаревский В. Е. О влиянии *in vitro* катионных белков лейкоцитов на активность возбудителя менингопневмонии // ЖМЭИ. 1977. № 9. С. 94—96.

Кокряков В. Н., Ротова Г. М., Мазинг Ю. А. Морфобиохимические основы функциональной активности нейтрофилов млекопитающих // Морфофункциональные аспекты неспецифической резистентности и демиелинизирующих заболеваний. Л., 1981. С. 31—45.

Кокряков В. Н., Борисов А. И., Слепенков С. В., Лылова С. Н. Сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств миелопероксида свиньи и коровы // Биохимия. 1982. Т. 47, вып. 1. С. 100—107.

Кокряков В. Н., Алешина Г. М., Слепенков С. Н. и др. О степени структурной гомологии лактоферринов молока и нейтрофильных гранулоцитов // Биохимия. 1988. Т. 53, вып. 11. С. 1837—1843.

Кокряков В. Н., Пигаревский В. Е., Алешина Г. М., Шамова О. В. Синергическое антимикробное действие катионных белков при фагоцитозе // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Сб. науч. трудов под ред. А. Н. Маянского. Горький, 1989а. С. 98—103.

Кокряков В. Н., Пигаревский В. Е., Тарос Л. Ю. и др. Антивирусные свойства дефенсинов при экспериментальной герпетической инфекции // Патоморфология опухолей и фоновых заболеваний. Л., 1989б. С. 122—124.

Кокряков В. Н., Стефанов В. Е., Алешина Г. М. и др. Дефенсины и родственные им антибиотические пептиды в эволюции защитных систем животных // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1997. Т. 33, № 1. С. 109—123.

Колабская Л. С., Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А. и др. Лизосомально-катионный тест как показатель уровня неспецифической резистентности организма птиц // Морфологические основы иммунопатологических процессов / Тр. Лен. науч. об-ва патологоанатомов. Л., 1983. Вып. XXIV. С. 93—95.

Кондашевская М. В., Лейкина М. И., Полякова И. А. и др. Действие дефенсина на клетки в культуре // Вестн. МГУ. Сер. 16. 1991. № 2. С. 32—34.

Корнева Е. А., Шхинек Э. К. Гормоны и иммунная система. Л., 1988. 251 с.

Краева Л. Н., Кокряков В. Н., Чесноков И. Н. и др. Некоторые свойства катепсина G и эластазы из нейтрофилов периферической крови свиньи // Биохимия. 1988. Т. 53, вып. 4. С. 655—662.

Кудряшов Б. А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. М., 1975. 488 с.

Кудряшов Б. А., Ашмарин И. П., Ляпина Л. А. и др. Функциональное состояние противосвертывающей системы при введении в кровотоки дефенсина // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. 1988. Т. 74, № 12. С. 1759—1764.

Кудряшов Б. А., Кондашевская М. В., Ляпина Л. А. и др. Эффект многократного внутримышечного введения дефенсина на противосвертывающую систему и ангиоархитектонику скелетной мышцы // Докл. АН СССР. 1989а. Т. 304, № 2. С. 494—498.

Кудряшов Б. А., Ляпина Л. А., Кокряков В. Н. и др. Катионные белки из нейтрофилов как ингибиторы неферментативной фибринолитической и антикоагулянтной активности плазмы крови // Вопр. мед. химии. 1989б. № 3. С. 103—108.

Кудряшов Б. А., Кондашевская М. В., Ляпина Л. А. и др. Действие дефенсина на процесс заживления асептической кожной раны и на проницаемость кровеносных сосудов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1990. Т. 109, № 4. С. 391—393.

Ляпина Л. А., Азиева Л. Д. Физиологические свойства белкового фактора, выделенного из ткани селезенки крыс // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. 1985. Т. 71. С. 916—920.

Ляпина Л. А., Кондашевская М. В., Кокряков В. Н., Шамова О. В. Взаимодействие гепарина с неферментным катионным белком из нейтрофилов — дефенсином // Вопр. мед. химии. 1992. Т. 38, вып. 1. С. 39—42.

Мазинг Ю. А. Результаты применения лизосомально-катионного теста в клинической практике // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л., 1988. С. 102—137.

Мазинг Ю. А. Нейтрофильные гранулоциты и система защиты организма // Арх. патологии. 1991. № 9. С. 70—73.

Мазинг Ю. А., Данилова М. А. Резорбтивная клеточная резистентность // Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Сб. науч. трудов под ред. А. Н. Маянского. Горький, 1989. С. 103—109.

Мазинг Ю. А., Кокряков В. Н. Экспериментальные модели резорбтивной резистентности // Общие и частные вопросы воспаления и иммунитета. Л., 1988. С. 66—68.

Мазинг Ю. А., Юнусова М. И. Морфологическая характеристика спонтанной псевдотуберкулезной инфекции // Тр. Лен. науч. об-ва патологоанатомов. 1982. Вып. 23. С. 74—77.

Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск 1989. 344 с.

Мечников И. И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. СПб., 1892. 162 с.

Мечников И. И. Невосприимчивость в инфекционных болезнях. СПб., 1903. 604 с.

Ноздрачев А. Д., Крылов Б. В., Сабанов В. С. и др. Эндогенные антибиотики дефенсина как возможные регуляторы функционирования натриевых каналов нейронов спинномозговых ганглиев // Докл. РАН. 1997. Т. 355, № 5. С. 705—707.

Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. М., 1987. 815 с.

Орлов Д. С. Эффекты действия дефенсинов при стрессе: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. 1998. 20 с.

Осипов А. Н., Азиева О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. 1990. № 31. С. 180—208.

Пигаревский В. Е. Лизосомально-катионный тест // Патол. физиология и эксперим. терапия. 1975. № 3. С. 86—88.

Пигаревский В. Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. М., 1978. 128 с.

Пигаревский В. Е. Полиморфоядерный лейкоцит и макрофаг в реакциях гиперчувствительности // *Арх. патологии.* 1983. № 11. С. 14—22.

Пигаревский В. Е. Новое в клинико-морфологической оценке функционального состояния нейтрофильных гранулоцитов // *Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов.* Л., 1988. С. 3—11.

Пигаревский В. Е. Гипотеза о резорбтивной клеточной резистентности как особой форме антимикробной защиты организма // *Арх. патологии.* 1992. Вып. 8. С. 40—45.

Пигаревский В. Е., Ашмарин И. П., Толыбеков А. С., Кокряков В. Н. О влиянии *in vitro* лейкоцитарного и тимусного гистонов и их фракций на активность возбудителя менингопневмонии // *ЖМЭИ.* 1975. № 10. С. 76—78.

Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А., Кокряков В. Н. Методика совместного выявления пероксидазы и катионных белков в гранулоцитах крови // *Лаб. дело.* 1982. № 5. С. 7—9.

Пигаревский В. Е., Кокряков В. Н., Мазинг Ю. А., Селиверстова В. Г. Возрастные иммунодефициты системы нейтрофильных гранулоцитов // *Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций / Сб. науч. трудов под ред. А. Н. Мажанского.* Горький, 1989. С. 109—115.

Пигаревский В. Е., Мазинг Ю. А., Кокряков В. Н. Возрастные иммунодефициты системы нейтрофильных гранулоцитов // *Арх. патологии.* 1990. № 6. С. 43—46.

Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М., 1976. 382 с.

Раменская Н. П., Янковский О. Ю., Кокряков В. Н. Изучение кооперативного антибактериального эффекта миелопероксидазы и катионных белков нейтрофилов кролика // *Вестн. ЛГУ.* 1977. № 9. С. 137.

Роговин В. В., Пирузян Л. А., Муравьев Р. А. Пероксидазосомы. М., 1977. 205 с.

Ротова Г. М., Кокряков В. Н., Слепенков С. В. и др. Получение и некоторые физико-химические свойства лактоферрина нейтрофилов свиньи // *Биохимия.* 1985. Т. 50, вып. 9. С. 1448—1452.

Рыбакова Л. П. Ядерные и гранулярные белки лейкоцитов при миело- и лимфо-пролиферативных заболеваниях // *Лейкозы (патогенез, клиника, лечение).* Л., 1988. С. 28—34.

Рыбакова Л. П., Харченко М. Ф. Белки и гликозаминогликаны лизосом гранулоцитов разной степени зрелости у больных хроническим миелолейкозом // *Структура и функции лизосом.* М., 1986. С. 174—175.

Салев Р. К., Романенко А. С. Эндозитоз. Новосибирск, 1979. 112 с.

Сент-Дьердьи А. Биоэлектроника. М., 1971. 80 с.

Ткаченко С. Б., Кокряков В. Н., Ашмарин И. П. и др. Влияние дефенсинов человека на содержание цитоплазматического Ca^{2+} в тромбоцитах // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1994. Т. 118, № 12. С. 600—603.

Ткаченко С. Б., Кокряков В. Н., Ашмарин И. П., Кубатиев А. А. Протеогрины — новое семейство пептидов лейкоцитарного происхождения, модулирующих функциональную активность тромбоцитов // *Докл. РАН.* 1996а. Т. 347, № 1. С. 126—128.

Ткаченко С. Б., Кокряков В. Н., Ашмарин И. П., Кубатиев А. А. Профенин и PR39х — новые антимикробные пептиды лейкоцитов, регулирующие функциональную активность тромбоцитов // *Докл. РАН.* 1996б. Т. 350, № 5. С. 704—706.

Толыбеков А. С., Пигаревский В. Е., Ашмарин И. П., Кокряков В. Н. О роли продуктов распада лейкоцитов в повышении резистентности макрофагов к возбудителю орнитоза // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1976. Т. 81, № 6. С. 584—587.

Уголев А. М. Эволюция пищеварения и принципы эволюции функций. Л., 1985. 544 с.

Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. М., 1984. 240 с.

Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов. М., 1984. 272 с.

Хадорн Э., Венер Р. Общая зоология. М., 1989. 528 с.

Харченко Е. П., Самедов А. Ш., Калихевич В. Н. и др. Пептидные антибиотики на основе фрагмента из препроэнкефалина А человека // *Докл. АН СССР.* 1989. Т. 307, № 1. С. 249—252.

Харченко Е. П., Самедов А. Ш., Калихевич В. Н., Ардемасова З. А. Малые пептиды белков животных как антибиотики и возможные факторы неспецифического иммунитета // *Укр. биохим. журн.* 1990. Т. 62, № 4. С. 21—26.

Чернух А. М. Воспаление. М., 1979. 448 с.

Шамова О. В., Лесникова М. П., Кокряков В. Н. и др. Действие дефенсинов на уровень кортикостерона в крови и иммунный ответ при стрессе // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1993. Т. 115, № 6. С. 646—649.

Шамова О. В., Орлов Д. С., Лесникова М. П. и др. Отмена дефенсином иммуносупрессии, обусловленной стрессом или введением высоких доз гидрокортизона // *Успехи физиол. наук.* 1995. № 1. С. 113—114.

Шафран М. Г. Миелопероксидаза нейтрофильных лейкоцитов // *Успехи соврем. биологии.* 1981. Т. 92, вып. 3. С. 365—379.

Шварцман Я. С., Хазенсон Л. Б. Местный иммунитет. М., 1978. 224 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. М., 1987. 567 с.

Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М., 1982. 354 с.

Янковский О. Ю., Довнар Т. Е. Роль протеиназ и продуктов деградации белков в защитных реакциях // *Журн. общ. биологии.* 1985. № 44. С. 93—101.

Янковский О. Ю., Раменская Н. П., Кокряков В. Н. и др. Метод выявления пероксидазы из полиморфно-ядерных лейкоцитов кролика и коровы // *Вестн. ЛГУ.* 1978. № 15, вып. 3. С. 99—103.

Янковский О. Ю., Кокряков В. Н., Лылова С. Н. Физико-химические и кинетические характеристики миелопероксидазы нейтрофильных лейкоцитов коров // *Укр. биохим. журн.* 1979. Т. 51, № 5. С. 492—496.

Янковский О. Ю., Довнар Т. Е., Ткаченко А. А. К механизму антимикробного действия миелопероксидазы. Роль адсорбции фермента на поверхности клетки-мишени // *ЖМЭИ.* 1981. № 6. С. 58—61.

Ackerman S. J., Loegering D. A., Venge P. et al. Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule: major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin // *J. Immunol.* 1983. Vol. 131, N6. P. 2977—2982.

Agawa Y., Lee S., Ono S. et al. Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic α -helical model peptides of various chain lengths // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 20 218—20 222.

Agerberth B., Lee J. Y., Bergman T. et al. Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antimicrobial peptides // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 202. P. 849—854.

Agerberth B., Boman A., Andersson M. et al. Isolation of three antibacterial peptides from pig intestine: gastric inhibitory polypeptide (7—42), diazepam-binding inhibitor (32—86) and a novel factor, peptide-3910 // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 216. P. 623—629.

Agerberth B., Gunne H., Odeberg J. et al. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 195—199.

Agerberth B., Gunne H., Odeberg J. et al. PR-39, a proline-rich peptide antibiotic from pig, and FALL-39, a tentative human counterpart // *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 1996. Vol. 54. P. 127—131.

Agner K. Verdoperoxidase. A ferment isolated from leukocytes // *Acta physiol. scand.* 1941a. Vol. 2 (Suppl. 8). P. 1—62.

Agner K. Detoxicating effect of verdoperoxidase on toxins // *Nature (London).* 1941b. Vol. 159. P. 271—272.

Agner K. Studies on peroxidative detoxification of purified diphtheria toxin // *J. Exp. Med. (USA)*. 1950. Vol. 92. P. 317—342.

Agner K. Crystalline myeloperoxidase // *Acta chem. scand.* 1958. Vol. 12, N1. P. 89—94.

Agner K. Biological effects of hypochlorous acid formed by MPO — peroxidation in the presence of chloride ions // *Structure and function of oxidation-reduction enzymes* / Ed. A. A. Akeson, A. Ehrenberg. Oxford, 1972. P. 329—335.

Aisen P., Listowsky I. Iron transport and storage proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. Vol. 49. P. 357—393.

Akin D. T., Lu M. Q., Lu S. J. et al. Bactericidal activity of different forms of lactoferrin // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, 1994. Vol. 357. P. 61—70.

Aleshina G. M., Harwig S. S. L., Lehrer R. I., Kokryakov V. N. Proline-arginine-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes // *Abstracts of ICONE'95*. July 17—24. St.-Peterburg. Russia. 1995. P. 88.

Allen R. C. Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1975. Vol. 63, N3. P. 675—683.

Allen R. C., Stjernholm L. R., Steele R. H. Evidence for the generation of an electronic excitation states in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1972. Vol. 47. P. 679—684.

Ammons W. S., Kohn F. R., Kung A. H. C. Protective effects of an N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein in rodent models of Gram-negative sepsis: role of bactericidal properties // *J. Infect. Diseases*. 1994. Vol. 170. P. 1473—1482.

Andersen M. R., Atkins C. L., Eyre H. J. Intact form of myeloperoxidase from normal human neutrophils // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1982. Vol. 214, N1. P. 273—283.

Anderson B. F., Baker H. M., Dodson E. J. et al. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. P. 1769—1773.

Andersson M., Gunne H., Agerberth B. et al. NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumor activity // *EMBO J.* 1995. Vol. 14, N8. P. 1615—1625.

Appelmelk B. J., An Y., Geerts I. et al. Lactoferrin is a lipid A-binding protein // *Infect. and Immun.* 1994. Vol. 62. P. 2628—2632.

Arnold R. R., Cole M. F., McGhee J. R. A bactericidal effect for human lactoferrin // *Science*. 1977. Vol. 197, N4300. P. 263—265.

Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin. Sensitivity of a variety of microorganisms // *Infect. and Immun.* 1980. Vol. 28, N3. P. 893—898.

Arnold R. R., Russell J. S., Champion W. J., Gauthier J. J. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical condition and metabolic state of the target microorganism // *Infect. and Immun.* 1981. Vol. 32, N2. P. 655—660.

Arnold R. R., Russell J. E., Champion W. J. et al. Bactericidal activity of human lactoferrin: differentiation from stasis of iron deprivation // *Infect. and Immun.* 1982. Vol. 35. P. 792—799.

Bach A. C., Selsted M. E., Pardi A. Two-dimensional NMR studies of the antimicrobial peptide NP-5 // *Biochemistry*. 1987. Vol. 26. P. 4389—4397.

Baehner R. L., Nathan D. G. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease // *Science*. 1967. Vol. 155. P. 835—836.

Bagella L., Scozzi M., Zanetti M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 376. P. 225—228.

Baggiolini M., Dewald B. The neutrophil // *Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.* 1985. Vol. 76 (Suppl. 1). P. 13—20.

Baggiolini M., De Duve C., Masson P. L., Heremans J. F. Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes // *J. Exp. Med. (USA)*. 1970. Vol. 131, N3. P. 559—570.

Baggiolini M., Bretz U., Dewald B. Subcellular localization of granulocyte enzymes // *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes*. Baltimore, 1978. P. 3—17.

Baggiolini M., Horisberger U., Gennaro R., Dewald B. Identification of three types of granules in neutrophils of ruminants. Ultrastructure of circulating and maturing cells // *Lab. Invest.* 1985. Vol. 52. P. 151—158.

Bainton D. F. Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocytes during phagocytoses of microorganisms // *J. Cell Biol.* 1973. Vol. 58, N1. P. 249—264.

Bainton D. F. Developmental biology of neutrophils and eosinophils // *Inflammation*. Basic principles and clinical correlates. New York, 1992. P. 303—324.

Bainton D. F., Farquhar M. G. Differences in enzyme content of azurophil and specific granules of polymorphonuclear leukocytes // *J. Cell Biol.* 1968. Vol. 39. P. 299—317.

Bainton D. F., Ulliyot J. L., Farquhar H. The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules // *J. Exp. Med. (USA)*. 1971. Vol. 134, N4. P. 907—934.

Baker M. A., Maloy W. L., Zasloff M., Jacob L. S. Anticancer efficiency of magainin 2 and analogue peptides // *Cancer Res.* 1993. Vol. 53. P. 3052—3057.

Bakkenist A. R. J., Wever R., Vulsma T. et al. Isolation procedure and some properties of myeloperoxidase from human leukocytes // *Biochim. et biophys. acta*. 1978. Vol. 524. P. 45—54.

Bakkenist A. R. J., De Boer J. B. G., Plat H., Wever R. The halide complexes of myeloperoxidase and the mechanism of the halogenation reactions // *Biochim. et biophys. acta*. 1980. Vol. 613. P. 337—348.

Baldrige C. W., Gerard W. The extra respiration of phagocytosis // *Amer. J. Physiol.* 1933. Vol. 103, N6. P. 235—236.

Bals R., Goldman M. J., Wilson J. M. Mouse β -defensin is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract // *Infect. and Immun.* 1998. Vol. 66, N3. P. 1225—1232.

Balsinde J., Diez E., Schuller A., Mollinedo F. Phospholipase A2 activity in resting and activated human neutrophils. Substrate specificity, pH dependence, and subcellular localization // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 1929—1936.

Bangalore N., Travis J., Onunka V. C. et al. Identification of the primary antimicrobial domains in human neutrophil cathepsin G // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 13 584—13 588.

Barker R. L., Gleich G. J., Pease L. R. Acidic precursor revealed in human eosinophil granule major basic protein cDNA // *J. Exp. Med. (USA)*. 1988. Vol. 168. P. 1493—1498.

Barker R. L., Loegering D. A., Ten R. M. et al. Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143. P. 952—955.

Barker R. L., Loegering D. A., Arakawa K. C. et al. Cloning and sequence analysis of the human gene encoding eosinophil major basic protein // *Gene*. 1990. Vol. 86. P. 285—289.

Barrett A. J. Cathepsin G // *Meth. Enzymol.* 1981a. Vol. 80. P. 561—565.

Barrett A. J. Leukocyte elastase // *Meth. Enzymol.* 1981b. Vol. 80. P. 581—588.

Bashford C. L., Alder G. M., Menestrina G. et al. Membrane damage by hemolytic toxins, complement, and other cytotoxic agents // *J. Biol. Chem.* 1986. Vol. 261, N20. P. 9300—9308.

Bateman A., Sigh A., Kral Th., Solomon S. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Endocrine Revs.* 1989. Vol. 10, N1. P. 92—112.

Bateman A., Sigh A., Congote F., Solomon S. The effect of HP-1 and related neutrophil

granule peptides on DNA synthesis in HL60 cells // *Regulatory Peptides*. 1991. Vol. 35. P. 135—143.

Bateman A., MacLeod R. J., Lembessis P. et al. The isolation and characterization of a novel corticostatin/defensin-like peptide from the kidney // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N 18. P. 10 654—10 659.

Baugh R., Travis J. Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization // *Biochemistry*. 1976. Vol. 15, N 4. P. 836—841.

Baynes R. D., Bezwoda W. R., Mansoor N. Neutrophil lactoferrin content in viral infection // *Amer. J. Clin. Pathol.* 1988. Vol. 89, N 2. P. 225—228.

Bechinger B., Zasloff M., Opella S. J. Structure and orientation of the antibiotic peptide in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy // *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P. 2077—2084.

Beckerdite S., Mooney C., Weiss J. et al. Early and discrete changes in permeability of *Escherichia coli* and certain other gram-negative bacteria during killing by granulocytes // *J. Exp. Med. (USA)*. 1974. Vol. 140. P. 396—409.

Belcourt D., Singh A., Bateman A. et al. Purification of cationic cysteine rich peptides from rat bone marrow. Primary structures and biological activity of the rat corticostatin family of peptides // *Regul. Peptide*. 1992. Vol. 40. P. 87—100.

Belding M. E., Klebanoff S. J., Ray C. G. Peroxidase — mediated virucided systems // *Science*. 1970. Vol. 167, N 1. P. 195—196.

Bellamy W., Takase M., Yamauchi K. et al. Identification of the bactericidal domain of lactoferrin // *Biochim. et biophys. acta*. 1992. Vol. 1121. P. 130—136.

Bensch K. W., Raida M., Magert H.-J. et al. hBD-I: a novel β -defensin from human plasma // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 368. P. 331—335.

Berendes H., Bridges R. A., Good R. A. Fatal granulomatous of childhood: clinical study of a new syndrome // *Minn. Med.* 1957. Vol. 40. P. 309—312.

Bernheimer A. W., Rudy B. Interaction between membranes and cytolytic peptides // *Biochim. et biophys. acta*. 1986. Vol. 864. P. 123—141.

Bessalle R., Haas H., Gorla A. et al. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992. Vol. 36. P. 313—334.

Bevins C. L. Antimicrobial peptides as agents of mucosal immunity // *Antimicrobial peptides*. 1994. P. 250—269.

Bevins C. L., Zasloff M. Peptides from frog skin // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 395—414.

Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P. Human lactoferrin inhibits growth of solid tumors and development of experimental metastases in mice // *Cancer Res.* 1994. Vol. 54. P. 2310—2312.

Bezkorovainy A. Antimicrobial properties of iron-binding proteins // *Diet Resist. Disease: Proc. Symp. New York; London*, 1981. P. 139—154.

Blondin J., Janoff A. The role of lysosomal elastase in the digestion of *Escherichia coli* proteins by human polymorphonuclear leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1976. Vol. 58, N 6. P. 971—979.

Boman H. G. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity // *Cell*. 1991. Vol. 65. P. 205—207.

Boman H. G. Cecropins: antibacterial peptides from insects and pigs // *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defense*. Austin, 1994. P. 24—37.

Boman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 61—92.

Boman H. G. Peptide antibiotic: holy or heretic grails of innate immunity? // *Scand. J. Immunol.* 1996. Vol. 43. P. 475—482.

Boman H. G., Hultmark D. Cell-free immunity in insects // *Annu. Rev. Microbiol.* 1987. Vol. 41. P. 103—126.

Boman H. G., Boman I. A., Andreu D. et al. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B // *J. Biol. Chem.* 1989a. Vol. 264. P. 5852—5860.

Boman H. G., Wade D., Boman I. A. et al. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids // *FEBS Lett.* 1989b. Vol. 259. P. 103—106.

Boman H. G., Faye I., Gudmundsson G. H. et al. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 201. P. 23—31.

Boman H. G., Agerberth B., Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin PI and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine // *Infect. and Immun.* 1993. Vol. 61. P. 2978—2984.

Bonmatin J.-M., Bonnat J. L., Gallet X. et al. Two-dimensional ¹H-NMR study of recombinant insect defensin A in water. Resonance assignments, secondary structure and global folding // *J. Biomolec. NMR*. 1992. Vol. 2. P. 235—256.

Bontems F., Roumestand C., Gilquin B. et al. Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins // *Science*. 1991. Vol. 254. P. 1521—1523.

Borenstein L. A., Selsted M. E., Lehrer R. I., Miller J. N. Antimicrobial activity of rabbit leukocyte defensins against *Treponema pallidum* // *Infect. and Immun.* 1991a. Vol. 59, N 4. P. 1359—1367.

Borenstein L. A., Ganz T., Sell S. et al. Contribution of rabbit leukocyte defensins to the host response in experimental syphilis // *Infect. and Immun.* 1991b. Vol. 59, N 4. P. 1368—1377.

Bories D., Raynal M., Rolomon D. H. et al. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells // *Cell*. 1989. Vol. 59. P. 959—968.

Bortner C. A., Miller R. D., Arnold R. R. Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila* // *Infect. and Immun.* 1986. Vol. 51. P. 373—377.

Bos A., Wever R., Dirk R. Characterization and quantification of the peroxidase in human monocytes // *Biochim. et biophys. acta*. 1978. Vol. 525. P. 37—44.

Boxer L. A., Coates T. D., Haak R. A. et al. Lactoferrin deficiency associated with altered granulocyte function // *N. Engl. J. Med.* 1982a. Vol. 307. P. 404—410.

Boxer L. A., Hack R. A., Yang H.-H. et al. Membrane-bound lactoferrin alters the surface properties of polymorphonuclear leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1982b. Vol. 70, N 5. P. 1049—1057.

Breton-Gorius J., Mason D. Y., Buriot D. et al. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in recurrent infections // *Amer. J. Clin. Pathol.* 1980. Vol. 99. P. 413—419.

Bretz U., Baggiolini M. Biochemical and morphological characterization of azurophilic and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes // *J. Cell Biol.* 1974. Vol. 63, N 1. P. 251—269.

Brey P. T., Lee W. J., Yamakawa M. et al. Role of the integument in insect immunity — epicuticular abrasion and induction of cecropin synthesis in cuticular epithelial cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 6275—6279.

Britigan B. E., Serody J. S., Hayck M. B. et al. Uptake of lactoferrin by mononuclear phagocytes inhibits their ability to form hydroxyl radical and protects them from membrane autooxidation // *J. Immunol.* 1991. Vol. 147, N 12. P. 4271—4277.

Broekaert W. F., Terras F. R., Cammue B. P., Osborn R. W. Plant defensin: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 108. P. 1353—1358.

Broxmeyer H. E., Platzer E. Lactoferrin acts on Ia⁻ and Ie/c antigen subpopulation of mouse peritoneal macrophages in the absence of T-lymphocytes and other cell types to inhibit production of granulocyte — macrophage colony stimulatory factors in vitro // *J. Immunol.* 1984. Vol. 133, N 1. P. 306—314.

Broxmeyer H. E., Smithyman A., Eger R. R. et al. Identification of lactoferrin as the granulocytederived inhibitor of colony-stimulating activity production // *J. Exp. Med. (USA)*. 1978. Vol. 148, N4. P. 1052—1067.

Broxmeyer H. E., De Sousa M., Smithyman A. et al. Specificity and modulation of lactoferrin, a negative feedback regulator of myelopoiesis // *Blood*. 1980. Vol. 55. P. 324—333.

Brune K., Shitznagel J. K. Peroxidaseless chicken leukocytes: isolation and characterization of antibacterial granules // *J. Infect. Diseases*. 1973. Vol. 127, N1. P. 84—94.

Brune K., Leffell M. S., Spitznagel J. K. Microbicidal activity of peroxidaseless chicken heterophile leukocyte // *Infect. and Immun.* 1972. Vol. 5, N3. P. 283—287.

Büchner H. Neuere fortschritte in der immunitätsfrage // *München med. Wochenschr.* 1894. Vol. 41. P. 497—500.

Bulet Ph., Cociancich S., Dimarcq J.-L. et al. Insect immunity. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensins family // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, N36. P. 24 520—24 525.

Bulet Ph., Cociancich S., Reuland M. et al. A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in larvae of the dragon fly *Aeschna cyanea* (Paleoptera, Odonata) // *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 209. P. 977—984.

Bulet Ph., Dimarcq J. L., Hetru C. et al. A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila carriei* an O-glycosylated substitution // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 14 893—14 897.

Bulet Ph., Hegy G., Lambert J. et al. Insect immunity. The inducible antibacterial peptide dipterin carries two O-glycans necessary for biological activity // *Biochemistry*. 1995. Vol. 34. P. 7394—7400.

Bullen J. J., Armstrong J. The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leukocytes // *Immunology*. 1979. Vol. 36. P. 781—791.

Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E. Role of iron in bacterial infection // *Curr. Top. Microbiol. and Immunol.* 1978. Vol. 80. P. 1—35.

Caaveiro J. M., Molina A., Gonzalez-Manas J. M. et al. Differential effects of five types of antipathogenic plant peptides on model membranes // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 410 (2—3). P. 338—342.

Cairo M. S., Calif I. Neonatal neutrophil in host defense // *Amer. J. Diseases Child.* 1989. Vol. 143, N1. P. 40—50.

Cammue B. Gene-encoded antimicrobial peptides from plants // *Antimicrobial Peptides*. Chichester, 1994. P. 91—106.

Campanelli D., Melchior M., Fu Y. et al. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic and autoantigen from human neutrophils // *J. Exp. Med. (USA)*. 1990a. Vol. 172. P. 1709—1715.

Campanelli D. C., Detmers P. A., Nathan C. F., Galay J. E. Azurocidin and homologous serine protease from neutrophils: differential antimicrobial and proteolytic properties // *J. Clin. Invest.* 1990b. Vol. 85. P. 904—915.

Campbell E. J., Wald M. S. Fate of human neutrophil elastase following receptor-mediated endocytosis by human alveolar macrophages. Implications for connective tissue injury // *J. Lab. and Clin. Med.* 1983. Vol. 101, N4. P. 527—536.

Campbell E. J., Silverman E. K., Campbell M. A. Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase mediated proteolytic activity // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143, N3. P. 2961—2968.

Casteels P., Tempst P. Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-pore-forming mechanism involving stereospecificity // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1994. Vol. 189. P. 339—345.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F. et al. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees // *EMBO J.* 1989. Vol. 8. P. 2387—2391.

Casteels P., Ampe C., Riviere L. et al. Isolation and characterization of abaeicin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*) // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 187. P. 381—386.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Tempst P. Functional and chemical characterization of hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*) // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 7044—7054.

Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. Apidaecin multipetide precursor structure — a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response // *EMBO J.* 1993. Vol. 12. P. 1569—1578.

Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T. et al. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translation conversation of the precursor structures // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 28 569—28 575.

Cech P., Lehrer R. I. Phagolysosomal pH of human neutrophils // *Blood*. 1984. Vol. 63, N1. P. 88—95.

Cech P., Stalder H., Widman J. J. et al. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associated with *Candida albicans* liver abscess // *Amer. J. Med.* 1979. Vol. 66. P. 149—153.

Chalk R., Townson H., Natori S. et al. Purification of an insect defensin from the mosquito *Aedes aegypti* // *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 1994. Vol. 24. P. 403—410.

Chang S. K., Trujillo J. M., Cook R. G., Stass S. A. Human myeloperoxidase gene: molecular cloning and expression in leukemic cells // *Blood*. 1986. Vol. 68. P. 1411—1414.

Charlet M., Chernysh S., Philippe H. et al. Innate immunity. Isolation of several cysteine rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc *Mytilus edulis* // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N36. P. 21 808—21 813.

Charp P. A., Rice W. G., Raynor R. L. et al. Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils // *Biochem. Pharmacol.* 1988. N37. P. 951—956.

Chen N., Brock R., Luh F. et al. The solution structure of the active domain of CAP18 — a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 370. P. 46—52.

Chen H. M., Wang W., Smith D., Chan S. C. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells // *Biochim. et biophys. acta*. 1997. Vol. 1336 (2). P. 171—179.

Chernysh S., Cociancich S., Briand J.-P. et al. The inducible antibacterial peptides of the Hemipteran insect *Palomena prasina*: identification of a unique family of proline-rich peptides and of a novel insect defensin // *J. Insect Physiol.* 1996. Vol. 42, N1. P. 81—89.

Chertov O., Michiel D. F., Xu L. et al. Identification of defensin-1, defensin-2, and CFP37/azurocidin as T-cell chemoattractant protein released from interleucine-8-stimulated neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N6. P. 2935—2940.

Chin G. J., Marx J. Resistance to antibiotics // *Science*. 1994. Vol. 264. P. 359—393.

Chirico G., Markoni M., Amici D. et al. Deficiency of neutrophil bactericidal activity interm and preterm infants // *Biol. Neonate*. 1985. Vol. 47, N5. P. 125—129.

Christensen B., Fink J., Merrifield R. B., Mauzerall D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. Vol. 85. P. 5072—5076.

Christensen R. D., Rothstein G. Neutrophil myeloperoxidase concentration: changes with development and during bacterial infection // *Pediat. Res.* 1985. Vol. 19, N12. P. 1278—1282.

Chung L. P., Keshav S., Gordon S. Cloning of the human lysozyme cDNA: inverted Alu repeat in the mRNA and in situ hybridization for macrophages and Paneth cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1988. Vol. 85. P. 6227—6230.

Clark D. P., Durell S., Maloy W. L., Zasloff M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana cutesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic polymyxin // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 10 849—10 855.

Clark R. A. Oxidative inactivation of pneumolysin by the myeloperoxidase system and stimulated human neutrophils // *J. Immunol.* 1986. Vol. 136. P. 4617—4622.

Clark R. A., Klebanoff S. J. Myeloperoxidase-H₂O₂-halide system: Cytotoxic effect on human blood leukocytes // *Blood.* 1977. Vol. 50. P. 65—70.

Clark R. A., Klebanoff S. J. Myeloperoxidase-mediated platelet release reaction // *J. Clin. Invest.* 1979a. Vol. 63. P. 177—183.

Clark R. A., Klebanoff S. J. Chemotactic factor inactivation by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system // *J. Clin. Invest.* 1979b. Vol. 64. P. 913—920.

Clark R. A., Klebanoff S. J. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide // *J. Immunol.* 1980. Vol. 124. P. 399—407.

Clark R. A., Szot S. Chemotactic factor inactivation by stimulated human neutrophils mediated by myeloperoxidase-catalyzed methionine oxidation // *J. Immunol.* 1982. Vol. 128. P. 1507—1513.

Clark R. A., Klebanoff S. J., Einstein A. B., Fefer A. Peroxidase-H₂O₂-halide system: cytotoxic effect on mammalian tumor cells // *Blood.* 1975. Vol. 45. P. 161—170.

Clark R. A., Szot S., Venkatasubramanian K., Schiffmann E. Chemotactic factor inactivation by myeloperoxidase mediated oxidation of methionine // *J. Immunol.* 1980. Vol. 124. P. 2020—2029.

Clark R. A., Stone P. J., El-Hag A. et al. Myeloperoxidase-catalyzed inactivation of alpha-1 protease inhibitor by human neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256. P. 3348—3353.

Clark R. A., Szot S., Williams M. A., Kagan H. M. Oxidation of lysine side-chains of elastin by the myeloperoxidase system and by stimulated neutrophils // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 135. P. 451—457.

Cochrane C. J., Aikin B. A. Polymorphonuclear leukocytes in immunologic reactions: the destruction of vascular basement membrane in vivo and in vitro // *J. Exp. Med. (USA).* 1966. Vol. 124. P. 733—751.

Cociancich S., Ghazi A., Hetru C. et al. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus* // *J. Biol. Chem.* 1993a. Vol. 268. P. 19 239—19 245.

Cociancich S., Goyffon M., Bontems F. et al. Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4 kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1993b. Vol. 194. N1. P. 17—22.

Cociancich S., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. A. The inducible antibacterial peptides of insects // *Parasitol. Today.* 1994a. Vol. 10. P. 132—139.

Cociancich S., Dupont A., Hegy G. et al. Novel inducible antibacterial peptides from a Hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus* // *Biochem. J.* 1994b. Vol. 300. P. 567—575.

Cohn Z. A. The fate of bacteria within phagocytic cells. I. The degradation of isotopically labeled bacteria by polymorphonuclear leukocytes and macrophages // *J. Exp. Med. (USA).* 1963. Vol. 117, N1. P. 27—42.

Cohn Z. A., Hirsch J. G. The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med. (USA).* 1960a. Vol. 112, N6. P. 1015—1022.

Cohn Z. A., Hirsch J. G. The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med. (USA).* 1960b. Vol. 112, N6. P. 983—1014.

Conlon J. M., Sower S. A. Isolation of a peptide structurally related to mammalian corticosteroids from lamprey *Petromyzon marinus* // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1996. Vol. 114B, N2. P. 133—137.

Cornet B., Bonmatin J.-M., Hetru C. et al. Refined three-dimensional structure of insect defensin A in water from NMR data // *Structure.* 1995. Vol. 3. P. 435—448.

Couto M. A., Harwig S. S., Cullor J. S. et al. eNAP-2, a novel cysteine-rich bactericidal peptide from equine leukocytes // *Infect. and Immun.* 1992a. Vol. 60, N2. P. 5042—5047.

Couto M. A., Harwig S. S., Cullor J. S. et al. Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils // *Infect. and Immun.* 1992b. Vol. 60, N8. P. 3065—3071.

Couto M. A., Harwig S. S., Lehrer R. I. Selective inhibition of microbial serine proteases by eNAP-2, an antimicrobial peptide from equine neutrophils // *Infect. and Immun.* 1993. Vol. 61, N7. P. 2991—2994.

Couto M. A., Liu L., Lehrer R. I., Ganz T. Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin // *Infect. and Immun.* 1994. Vol. 62. P. 2375—2378.

Cowland J. B., Johnsen A. H., Borregaard N. hCAP-18, a cathelin/probactenecin-like protein of human neutrophil specific granules // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 368. P. 173—176.

Crowl R. M., Stoller T. J., Conroy R. H., Stoner C. R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 2647—2651.

Cruciani R. A., Barker J. L., Zasloff M. et al. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 3792—3796.

Cuervo J. H., Rodriguez B., Houghten R. A. The magainins: sequence factors relevant to increased antimicrobial activity and decreased hemolytic activity // *Peptide Res.* 1988. Vol. 1. P. 81—86.

Daffre S., Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D. The lysozyme locus in *Drosophila melanogaster*: an expanded family adapted for expression in the digestive tract // *Mol. Gen. Genet.* 1994. Vol. 242. P. 152—162.

Daher K. A., Selsted M. E., Lehrer R. T. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensin // *J. Virol.* 1986. Vol. 60, N3. P. 1068—1074.

Daher K. A., Lehrer R. I., Ganz T., Kronenberg M. Isolation and characterization of human defensin cDNA clones // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 7327—7331.

Davis J. M., Dineen P., Gallin J. I. Neutrophil degranulation and abnormal chemotaxis after thermal injury // *J. Immunol.* 1980. Vol. 124. P. 1467—1471.

De Duve C., Wattiaux R. Functions of lysosomes // *Ann. Rev. Physiol.* 1966. Vol. 28. P. 435—492.

De Duve C., Pressman B. C., Gianetto R. et al. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in liver tissue // *Biochem. J.* 1955. Vol. 60. P. 604—617.

Del Sal G., Storici P., Schneider C. et al. cDNA cloning of the neutrophil bactericidal peptide indolocidin // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1992. Vol. 187. P. 467—472.

De Sousa M., Breedvelt F., Dynesius-Trentham R. et al. Iron, iron-binding proteins and immune system cells // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1988. Vol. 526. P. 310—322.

Dennis E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2 // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 13 057—13 060.

Desser R. K., Himmelhoch S. R., Evans W. H. et al. Guinea pig heterophil and eosinophil peroxidase // *Arch. Biochem. and Biophys.* 1972. Vol. 148, N2. P. 452—465.

Dewald B., Rindler-Ludwig R., Britz U., Baggiolini M. Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med. (USA).* 1975. Vol. 141. P. 709—723.

Dewald B., Britz U., Baggiolini M. Release of gelatinase from a novel secretory compartment of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1982. Vol. 70, N3. P. 518—525.

Diamond G., Bevins C. L. Endotoxin up-regulates expression of an antimicrobial peptide gene in mammalian airway epithelial cells // *Chest.* 1994. Vol. 105 (Suppl.). P. 51—52.

Diamond G., Zasloff M., Eck H. et al. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 3952—3956.

Diamond G., Jones D. E., Bevins Ch. L. Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 4596—4600.

Diamond G., Russell J. P., Bevins C. L. Inducible expression of an antibiotic peptide gene in lipopolysaccharide-challenged tracheal epithelial cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 5156—5160.

Dickinson L., Russell V., Dunn P. E. A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta* // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 19 424—19 429.

Dimarcq J. L., Keppi E., Dunbar B. et al. Purification and characterization of a family of novel inducible antibacterial proteins from immunized larvae of the dipteran *Phormia terranova* and complete amino-acid sequence of the predominant member, dipterin A // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 171. P. 17—22.

Dimarcq J. L., Hoffmann D., Meister M. et al. Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 221. P. 201—209.

Dzau V. J., Gonzales D., Kaempffer C. et al. Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin // Circulation Res. 1987. Vol. 60, N4. P. 595—601.

Drazin R. E., Lehrer R. I. Fungicidal properties of a chymotrypsin-like cationic protein from human neutrophils adsorption to *Candida parapsilosis* // Infect. and Immun. 1977. Vol. 17, N2. P. 382—388.

Dubin A., Koj A., Chudzik J. Isolation and some molecular parameters of elastase-like neutral proteinases from horse blood leukocytes // Biochem. J. 1976. Vol. 153. P. 389—396.

Durack D. T., Ackerman S. J., Loegering D. A., Gleich G. J. Purification of human eosinophil-derived neurotoxin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78. P. 5165—5169.

Edwards S. W. Biochemistry and physiology of the neutrophils. Cambridge, 1994. P. 299.

Ehret-Sabatier L., Loew D., Goyffon M. et al. Characterization of novel cysteine-rich antimicrobial peptides from scorpion blood // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271, N47. P. 29 357—29 364.

Eisenhauer P. B., Lehrer R. I. Mouse neutrophils lack defensins // Infect. and Immun. 1992. Vol. 60. P. 3446—3447.

Eisenhauer P. B., Harwig S. S., Lehrer R. I. Cryptidins: antimicrobial defensins of the murine small intestine // Infect. and Immun. 1992. Vol. 60, N9. P. 3556—3565.

Eisenhauer P. B., Harwig S. S. L., Szklarek D. et al. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils // Infect. and Immun. 1989. Vol. 57, N7. P. 2021—2027.

El-Hag A., Clark R. A. Inmunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system // J. Immunol. 1987. Vol. 139. P. 2406—2413.

Ellison R. T. The effects of lactoferrin on Gram-negative bacteria // Advances in experimental medicine and biology. New York, 1994. Vol. 357. P. 71—90.

Ellison R. T., Giehl T. J. Killing of Gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme // J. Clin. Invest. 1991. Vol. 88. P. 1080—1091.

Ellison R. T., Giehl T. J., LaForce F. M. Damage to the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin // Infect. and Immun. 1988. Vol. 56. P. 2774—2781.

Ellison R. T., LaForce F. M., Giehl T. J. et al. Lactoferrin and transferrin damage of the gram-negative outer membrane is modulated by Ca²⁺ and Mg²⁺ // J. Gen. Microbiol. 1990. Vol. 136. P. 1437—1446.

Elsbach P. On the interaction between phagocytes and microorganisms // N. Engl. J. Med. 1973a. Vol. 16. P. 846—852.

Elsbach P. On the interaction between phagocytes and microorganisms // N. Engl. J. Med. 1973b. Vol. 289. P. 846—852.

Elsbach P. Degradation of microorganisms by phagocytic cells // Rev. Infect. Dis. 1980. Vol. 2, N1. P. 106—128.

Elsbach P. Antibiotics from within: antibacterials from human and animal sources // TIB TECH. 1990. Vol. 8. P. 26—30.

Elsbach P., Weiss J. Oxygen-independent bactericidal systems of polymorphonuclear leukocytes // Advances in inflammation research. New York, 1981. Vol. 2. P. 95—113.

Elsbach P., Weiss J. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes // Rev. Infect. Dis. 1983. Vol. 5, N5. P. 843—853.

Elsbach P., Weiss J. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanisms of microbicidal activity of neutrophils // Immunol. Lett. 1985. Vol. 11. P. 159—163.

Elsbach P., Weiss J. Bactericidal/permeability increasing protein (BPI) of granulocytes: structure and function // Bacteria-host cell interaction. New York, 1988a. P. 47—62.

Elsbach P., Weiss J. Phagocytic cells oxygen-independent antimicrobial systems // Inflammation: basic principles and clinical correlates. New York, 1988b. P. 445—470.

Elsbach P., Weiss J. Oxygen-independent antimicrobial systems of phagocytes // Inflammation. Basic principles and clinical correlates. New York, 1992. P. 603—636.

Elsbach P., Weiss J. The bactericidal permeability-increasing (BPI) protein, a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide // Immunobiology. 1993. Vol. 187. P. 417—429.

Elsbach P., Weiss J. Prospects for the use of recombinant BPI in the treatment of Gram-negative bacterial infections // Infect. Agents Dis. 1995. Vol. 4. P. 102—109.

Elsbach P., Pettis P., Beckerdite S., Franson R. The effect of phagocytosis by rabbit granulocytes on macromolecular synthesis and degradation in different species of bacteria // J. Bacteriol. 1973. Vol. 115. P. 490—497.

Elsbach P., Weiss J., Franson R. et al. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 254. P. 11 000—11 009.

Elsbach P., Weiss J., Kao L. The role of intramembrane Ca²⁺ in the hydrolysis of the phospholipids of *Escherichia coli* by Ca²⁺-dependent phospholipases // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260. P. 1618—1622.

Elsbach P., Weiss J., Forst S. Determinants of the action of phospholipases on the phospholipids of gram-negative bacteria (*E. coli*) // Lipids and membranes: past, present and future. Amsterdam, 1986. P. 259—286.

Elsbach P., Weiss J., Wright G., Verheij H. Phospholipase A2 structure-function relationships in biological settings // Cell activation and signal initiation: phospholipase control of inositol phosphate, PAF and eicosanoid production. New York, 1989. P. 323—329.

Elsbach P., Weiss J., Levy O. Integration of antimicrobial host defenses: role of the bactericidal/permeability-increasing protein // Trends Microbiol. 1994. Vol. 2. P. 324—328.

Engstrom Y., Kadalayil L., Sun S. C. et al. κ B-like motifs regulate the induction of immune genes in *Drosophila* // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 232. P. 327—333.

Evans E. W., Beach G. G., Wunderlich J., Hannon B. G. Isolation of antimicrobial peptides from avian heterophils // J. Leukocyte Biol. 1994. Vol. 56. P. 661—665.

Farner R. L., Dieckmann T., Harwig S. S. et al. Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes // Chem. Biol. 1996. Vol. 3. P. 543—550.

Fearon D. T., Locksley R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response // Science. 1996. Vol. 272. P. 50—54.

Fehlbaum P., Bulet Ph., Michant L. et al. Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induced the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptide // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 31 159—31 163.

Fischer C. J., Opal S. M., Marra M. N. et al. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) neutralizes endotoxin and reduces mortality in sepsis // *Crit. Care Med.* 1991. Vol. 19. Suppl. P. 97.

Fleischmann J., Selsted M. E., Lehrer R. I. Opsonic activity of MCP-1 and MCP-2 cationic peptides from rabbit alveolar macrophages // *Diagn. Microbiol. Dis.* 1985. Vol. 3. P. 233—242.

Fleming A. On a remarkable bacteriolytic ferment found in tissues and secretions // *Proc. Roy. Soc. London. B.* 1922. Vol. 93. P. 306—317.

Fletcher J., Willars J. The role lactoferrin released by phagocytosing neutrophils in the regulation of colony-stimulating activity production by human mononuclear cells // *Blood. Cells.* 1986. Vol. 11. P. 447—454.

Flodgaard H., Ostergard E., Bayne S. et al. Covalent structure of two novel neutrophil leukocyte-derived proteins of porcine and human origin. Neutrophil elastase homologues with strong monocyte and fibroblast chemotactic activities // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 197. P. 535—547.

Forst S., Weiss J., Elsbach P., Maraganore J. M. et al. Structural and functional properties of a phospholipase A2 purified from an inflammatory exudate // *Biochemistry.* 1986. Vol. 25. P. 8381—8385.

Forst S., Weiss J., Maraganore J. M. et al. Relation between binding and the action of phospholipases A2 on *Escherichia coli* exposed to the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils // *Biochim. et biophys. acta.* 1987. Vol. 920. P. 221—225.

Frank R. W., Gennaro R., Schneider K. et al. Amino acid sequences of two proline-rich bactericins // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, N31. P. 18 871—18 874.

Freeman K. L., Anderson D. S., Hughes S., Buffone G. J. Rapid radiometric assay used to access lactoferrin in granulocytes // *Clin. Chem.* 1985. Vol. 31, N3. P. 407—409.

Frohnm M., Agerberth B., Ahangari G. et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, N24. P. 15 258—15 263.

Fujii G., Selsted M. E., Eisenberg D. Defensin promote fusion and lysis of negatively charged membranes // *Protein Sci.* 1993. Vol. 2. P. 1301—1312.

Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M. et al. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, N19. P. 11 333—11 337.

Furth R. Development and distribution of mononuclear phagocytes // *Inflammation. Basic principles and clinical correlates.* New York, 1992. P. 325—340.

Fuse N., Hayashi Y., Fukata J. et al. Purification and characterization of new antiadrenocorticotropin rabbit neutrophil peptides (defensins) // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 216. P. 653—659.

Gabay J. E. Ubiquitous natural antibiotics // *Science.* 1994. Vol. 264, N5157. P. 373—374.

Gabay J. E., Almeida R. P. Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes: defensins and azurocidin // *Curr. Opin. Immunol.* 1993. Vol. 5. P. 97—102.

Gabay J. E., Scott R. W., Campanelli D. et al. Antimicrobial proteins of human polymorphonuclear leukocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86, N14. P. 5610—5614.

Gahr M., Speer C. P., Dameran B., Sawatzki G. Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocyte and monocytes // *J. Leukocyte Biol.* 1991. Vol. 49, N5. P. 427—433.

Gallagher D. S., Ryan A. M., Diamond G. et al. Somatic cell mapping of β -defensin genes to cattle syntenic group U25 and fluorescent in situ hybridization localization to chromosome 27 // *Mammal. Genome.* 1995. Vol. 6. P. 554—556.

Gallin J. I. Disorders of phagocytic cells // *Inflammation. Basic Principles and clinical correlates.* New York, 1992. P. 859—874.

Gallin J. I., Fletcher M. P., Seligman B. E. et al. Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response // *Blood.* 1982. Vol. 59. P. 1317—1329.

Gallo R. L., Ono M., Povsic T. et al. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 11 035—11 039.

Gallo R. L., Kim K. J., Bernfield M. et al. Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, N20. P. 13 088—13 093.

Ganz T. Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes // *Infect. and Immun.* 1987. Vol. 55, N3. P. 568—571.

Ganz T. Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides // *Antimicrobial Peptides.* New York, 1994. Vol. 186. P. 62—76.

Ganz T., Lehrer R. I. Defensins // *Pharm. Ther.* 1995. Vol. 66. P. 191—205.

Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D. et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1985. Vol. 76. P. 1427—1435.

Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Antimicrobial activity of phagocyte granule proteins // *Semin. Respir. Infect.* 1986. Vol. 1. P. 107—117.

Ganz T., Metcalf J. A., Gallin J. I. et al. Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and «specific» granule deficiency // *J. Clin. Invest.* 1988a. Vol. 82. P. 552—556.

Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Defensins: Antimicrobial cytotoxic peptides of phagocytes // *Bacteria-Host cell interaction / Ed. M. A. Horwitz.* New York, 1988b. P. 3—14.

Ganz T., Ragyner J. R., Valore E. V. et al. The structure of rabbit macrophage defensin genes and their organ-specific expression // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143. P. 1358—1365.

Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Defensins // *Eur. J. Hematol.* 1990. Vol. 44, N1. P. 1—8.

Ganz T., Oren A., Lehrer R. I. Defensins: microbicidal and cytotoxic peptides of mammalian host defense cells // *Med. Microbiol.* 1992. Vol. 181. P. 99—105.

Ganz T., Liu L., Valore E., Oren A. Posttranslational processing and targeting of transgenic human defensin in murine granulocyte, macrophage, fibroblast, and pituitary adenoma cell lines // *Blood.* 1993. Vol. 82, N2. P. 641—650.

Gazzano-Santoro H., Parent J. B., Grinna L. et al. High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide // *Infect. and Immun.* 1992. Vol. 60. P. 4754—4761.

Gazzano-Santoro H., Meszaros E., Birr C. et al. Competition between rBP123, a recombinant fragment of bactericidal/permeability-increasing protein, and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein for binding to LPS and Gram-negative bacteria // *Infect. and Immun.* 1994. Vol. 62. P. 1185—1191.

Gennaro R., Dolzani L., Romeo D. Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils // *Infect. and Immun.* 1983. Vol. 40, N2. P. 684—690.

Gennaro R., Skerlavaj B., Romeo D. Purification, composition and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils // *Infect. and Immun.* 1989. Vol. 57, N10. P. 3142—3146.

Gennaro R., Romeo D., Skerlavaj B., Zanetti M. Neutrophil and eosinophil granules as storage of «defense» proteins // *Lymphocytes and granulocytes.* New York, 1991. Vol. 3. P. 335—368.

Georgel P., Meister M., Kappler C. et al. Insect immunity: the dipterin promoter contains multiple functional regulatory sequences homologous to mammalian acute phase response elements // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 197. P. 508—517.

Gibson B. W., Tang D. Z., Mandrell R. et al. Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the asian toad, *Bombina orientalis* // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 23 103—23 111.

Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. Biological mediators of insect immunity // Annu. Rev. Entomol. 1997. Vol. 42. P. 611—643.

Gilljam H., Ellin A., Strandvik B. Increased bronchial chloride concentration in cystic fibrosis // Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 1989. Vol. 49. P. 121—124.

Ginsberg J. S., Hirsh J. Optimum use of anticoagulants in pregnancy // Drugs. 1988. Vol. 36. P. 505—512.

Ginsburg I. Cationic polyelectrolytes: a new look at their possible roles as opsonins, as stimulators of respiratory burst in leukocytes, in bacteriolysis and as modulators of immune-complex diseases (a review hypothesis) // Inflammation. 1987. Vol. 11, N 4. P. 489—515.

Gleich G. J., Adolphson C. R. The eosinophilic leukocyte: structure and function // Adv. Immunol. 1986. Vol. 39. P. 177—253.

Gleich G. J., Frigas E., Loegering D. A. et al. S. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein // J. Immunol. 1979. Vol. 123. P. 2925—2927.

Goldman M. J., Anderson G. M., Stolzenberg E. D. et al. Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis // Cell. 1997. Vol. 88. P. 553—560.

Goldstein R. A., Bawen D. L., Fauci A. S. Adrenal corticosteroids // Inflammation. Basic principles and clinical correlates. New York, 1992. P. 1061—1082.

Gordon W. E., Groves M. L., Basch J. J. Bovine milk «red protein»: amino acid composition and comparison with blood transferrin // Biochemistry. 1963. Vol. 2, N 3. P. 817—820.

Goren M. B. Phagocyte lysosomes: interactions with infections and experimental perturbations in function // Annu. Rev. Microbiol. 1977. Vol. 31. P. 507—533.

Gough M., Hancock R. E., Kelly N. M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents // Infect. and Immun. 1996. Vol. 64, N 12. P. 4922—4927.

Gray P. W., Flaggs G., Leong S. R. et al. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and function correlations // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 9505—9509.

Grignaschi V. J., Sperperato A. M., Etsheverry M., Macario A. J. Un nuevo cuatro citoquímico: negatividad espontánea de las reacciones de peroxidases, oxidasas y lípidos en la citos de dos hermanos // Rev. Asoc. Med. Argent. 1963. Vol. 77. P. 218—221.

Groisman E. A. How bacteria resist killing by host-defense peptides // Trends Micro. 1995. Vol. 2. P. 444—449.

Groisman E. A., Saier M. H., Jr. *Salmonella virulence*: new clues to intramacrophage survival // Trends Biochem. Sci. 1990. Vol. 15. P. 30—33.

Groisman E. A., Parra-Lopez C., Salcedo M. et al. Resistance to host antimicrobial peptides is necessary for *Salmonella virulence* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89, N 24. P. 11 939—11 943.

Groves M. L. The isolation of a red protein from milk // J. Amer. Chem. Soc. 1960. Vol. 82, N 12. P. 3345—3350.

Gudmundsson G. H., Lidholm D.-A., Asling B. et al. The cecropin locus. Cloning and expression of a gene cluster encoding three antibacterial peptides in *Hyalophora cecropia* // J. Biol. Chem. 1991. Vol. 266. P. 11 510—11 517.

Gudmundsson G. H., Magnusson K. P., Chowdhary B. P. et al. Structure of the gene for porcine peptide antibiotic PR-39, a cathelin gene family member: comparative mapping of the locus of the human peptide antibiotic FALL-39 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 7085—7089.

Gwadz R. W., Kaslow D., Lee J.-Y. et al. The effects of magainins and cecropins on the sporogonic development of malaria parasites in mosquitoes // Infect. and Immun. 1989. Vol. 57. P. 2628—2633.

Hancock R. E. W. Peptide antibiotics // Lancet. 1997a. Vol. 349. P. 412—422.

Hancock R. E. W. Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli [editorial] // J. Med. Microbiol. 1997b. Vol. 46, N 1. P. 1—3.

Hankin E. H. A bacteria-killing globulin // Proc. Roy. Soc. London. B. 1891. Vol. 48. P. 93.

Hanzava H., Shimada I., Kuzuhara T. et al. The nuclear magnetic resonance the solution conformation of an antibacterial protein, sapecin // FEBS Lett. 1990. Vol. 269. P. 413—420.

Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M. A peptide antibiotic from human skin // Nature. 1997. Vol. 387. P. 861.

Harisson J. E., Pabalan S., Schultz J. The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase // Biochim. et biophys. acta. 1977. Vol. 493, N 2. P. 247—259.

Harmsen M. C., Swart P. J., Bethune M. D. et al. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro // J. Infect. Diseases. 1995. Vol. 172. P. 380—388.

Hartshorn K. L., Daignault D., Tauber A. I. Phagocyte responses to viral infection // Inflammation. Basic principles and clinical correlates. New York, 1992. P. 1017—1032.

Harwig S. S., Park A. S., Lehrer R. I. Characterization of defensin precursors in mature human neutrophils // Blood. 1992. Vol. 79, N 6. P. 1532—1537.

Harwig S. S., Chen N. P., Park A. S. K., Lehrer R. I. Purification of cysteine-rich bioactive peptides from leukocytes by continuous acid-urea-polyacrylamide gel electrophoresis // Anal. Biochem. 1993a. Vol. 208. P. 382—386.

Harwig S. S., Kokryakov V. N., Swiderek K. M. et al. Gallinacins: cysteine-rich antimicrobial peptides of avian leukocytes // Protein Sci. 1993b. Vol. 2, suppl. 1. P. 256S.

Harwig S. S., Swiderek K. M., Kokryakov V. N. et al. Primary structure of gallinacin-1 an antimicrobial β -defensin from chicken leukocytes // Techniques in Protein Chemistry. San Diego, 1994a. P. 49—57.

Harwig S. S., Swiderek K. M., Kokryakov V. N. et al. Gallinacins: Cystein-rich antimicrobial peptides of chicken leukocytes // FEBS Lett. 1994b. Vol. 342. P. 281—285.

Harwig S. S., Kokryakov V. N., Swiderek K. M. et al. Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes // FEBS Lett. 1995a. Vol. 362, N 1. P. 65—69.

Harwig S. S., Tan L., Qu X. D. et al. Bactericidal properties of murine intestinal phospholipase A // J. Clin. Invest. 1995b. Vol. 95. P. 603—610.

Havemann K., Gramse M. Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes // Proteases: potent role in health and disease. Wursburg, 1984. P. 1—20.

Hawiger J., Horn R. G., Koenig W. G., Collins R. D. Activation and release of lysosomal enzymes from isolated leukocytic granules by liposomes // Jale J. Biol. Med. 1969. Vol. 42. P. 57—69.

He J., Furmanski P. Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA // Nature. 1995. Vol. 373. P. 721—724.

Heifets L., Imai K., Goren M. B. Expression of peroxidase-dependent iodination by macrophages ingesting neutrophil debris // RES-J. Reticuloendothel. Soc. 1980. Vol. 28, N 4. 391—404.

Henson P. M., Henson J. E., Fittschen C. et al. Degranulation and secretion by phagocytic cells // Inflammation. New York, 1992. P. 511—540.

Hetru C., Bulet P., Cociancich S. et al. Antibacterial peptides/polypeptides in the insect host defense. A comparison with vertebrate antibacterial peptides/polypeptides // Phylogenetic Perspectives in Immunity. Austin, 1994. P. 43—67.

Hiemstra P. S., Eisenhauer P. B., Harwig S. S. et al. Antimicrobial proteins of murine macrophage // Infect. and Immun. 1993. Vol. 61, N 7. P. 3038—3046.

Higazi A. A., Barghouti I. I., Abu-Much R. Identification of an inhibitor of tissue-type plasminogen activator-mediated fibrinolysis in human neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 9472—9477.

Higazi A. A., Ganz T., Kariko K. et al. Defensins modulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen binding to fibrin and endothelial cells // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N30. P. 17 650—17 655.

Higazi A. A., Lavi E., Bdeir K. et al. Defensins stimulates the binding of lipoprotein (a) to human vascular endothelial and smooth muscle cells // *Blood.* 1997. Vol. 89, N2. P. 4290—4298.

Hill C. P., Yee J., Selsted M. E., Eisenberg D. Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization // *Science.* 1991. Vol. 251. P. 1481—1485.

Hill H. R. Clinical disorders of leukocyte functions // *Contemp. Top. Immunobiol.* 1984. Vol. 14. P. 345—393.

Hill H. R. Biochemical, structural and functional abnormalities of polymorphonuclear leukocytes in the neonate // *Pediat. Res.* 1987. Vol. 22, N4. P. 375—382.

Hindenburg F., Spitznagel J. K., Arnheim N. Isozymes of lysozyme in leukocytes and egg white: evidence for the specific control of egg-white lysozyme synthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. Vol. 71. P. 1653—1657.

Hirata M., Shimomura Y., Yoshida M. et al. Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity // *Infect. and Immun.* 1994. Vol. 62. P. 1421—1426.

Hirsch J. G. Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med. (USA).* 1956. Vol. 103, N5. P. 589—611.

Hirsch J. G. Bactericidal action of histone // *J. Exp. Med. (USA).* 1958. Vol. 108. P. 925—944.

Hirsch J. G. Antimicrobial factors in tissues and phagocytic cells // *Bacteriol Revs.* 1960. Vol. 24. P. 133—140.

Hodinka R. L., Modrzakowski M. C. Bactericidal activity of granule contents from rat polymorphonuclear leukocytes // *Infect. and Immun.* 1983. Vol. 40, N1. P. 139—146.

Hoek K. S., Milne J. M., Grieve P. A. et al. Antibacterial activity in bovine lactoferrin-derived peptides // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. Vol. 41, N1. P. 54—59.

Hoffmann J. A. Innate immunity of insects // *Curr. Opin. Immunol.* 1995. Vol. 7. P. 4—10.

Hoffmann J., Hetru Ch. Insect defensins: inducible antibacterial peptides // *Immunol. Today.* 1992. Vol. 13. P. 411—415.

Hoffmann J. A., Hetru C., Reichhart J. M. The humoral antibacterial response of *Drosophila* // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 325. P. 63—66.

Hoffmann J. A., Reichhart J.-M. *Drosophila* immunity // *Trends in Cell Biology.* 1997. Vol. 7. P. 309—316.

Hohn P. A., Popescu N. S., Hanson R. D. et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human cathepsin G gene // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 13 412—13 419.

Holak T. A., Engstrom A., Kraulis P. J. et al. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study // *Biochemistry.* 1988. Vol. 27. P. 7620—7629.

Hook W. A., Tsuji S., Siraganian R. P. Magainin-2 releases histamine from rat mast cells // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1990. Vol. 193. P. 50—55.

Horikawa R., Parker D. S., Herring P. L., Pisano J. J. Pipinins: a new mast cell degranulating peptides from *Rana pipiens* // *Fed. Proc.* 1985. Vol. 44. P. 695—700.

Horwitz D. A., Bakke A. C., Abo W., Nishiya K. Monocyte and NK cell cytotoxic activity in human adherent cell preparations: discriminating effects of interferon and lactoferrin // *J. Immunol.* 1984. Vol. 312. P. 2370—2374.

Hovde C. J., Gray B. H. Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* // *Infect. and Immun.* 1986a. Vol. 54, N1. P. 142—148.

Hovde C. J., Gray B. H. Physiological effects of a bactericidal protein from human polymorphonuclear leukocytes on *Pseudomonas aeruginosa* // *Infect. and Immun.* 1986b. Vol. 52. P. 90—95.

Hristova K., Selsted M. E., White S. H. Critical role of lipid composition in membrane permeabilization by rabbit neutrophil defensins // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, N39. P. 24 224—24 233.

Hu J., Bennett H., Lazure C., Solomon S. Isolation and characterization of corticostatic peptides from quinea pig bone marrow // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 180, N1. P. 558—565.

Hu J., Jothy S., Solomon S. Localization and measurement of corticostatin-1 in non-pregnant and pregnant rabbit tissues during late gestation // *Endocrinology.* 1993. Vol. 132, N6. P. 2351—2359.

Huang C. M., Chen H. C., Zierdt C. H. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. Vol. 34. P. 1824—1826.

Huang H. J., Ross C. R., Blecha F. Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide // *J. Leukocyte Biol.* 1997. Vol. 61, N5. P. 624—629.

Hugles F. L., Jeager M. Coordinated amino acid changes in the evolution of mammalian defensins // *J. Mol. Evol.* 1997. Vol. 44. P. 675—682.

Hultmark D. Immune reactions in *Drosophila* and other insects — a model for innate immunity // *Trends Genet.* 1993. Vol. 9. P. 178—183.

Hultmark D. Insect immunology — ancient relationships // *Nature.* 1994. Vol. 367. P. 116—117.

Hultmark D., Steiner H., Rasmuson T., Boman H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia* // *Eur. J. Biochem.* 1980. Vol. 106. P. 7—16.

Hurst J. K. Myeloperoxidase: active site structure and catalytic mechanisms // *Peroxi-dases in chemistry and biology.* Boca Raton, 1991. Vol. 1. P. 37—62.

Hutchens T. W., Rumball S. V., Lonnerdal B. Lactoferrin. Structure and function // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994. 295 p.

Huttner K. M., Selsted M. E., Ouellette A. J. Structure and diversity of the murine cryptdin gene family // *Genomics.* 1994. Vol. 19. P. 448—453.

Huttner K. M., Kozak C. A., Bevins C. L. The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human β -defensin 1 // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 413. P. 45—49.

Huttner K. M., Lambeth M. R., Burkin H. R. et al. Localization and genomic organization of sheep antimicrobial peptide genes // *Gene.* 1998. Vol. 206, N1. P. 85—91.

Iannuzzi L., Gallagher D. S., Di Meo G. P. et al. High-resolution FISH mapping of β -defensin genes to river buffalo and sheep chromosomes suggests a chromosome discrepancy in cattle standard karyotypes // *Cytogenet. and Cell Genet.* 1996. Vol. 75. P. 10—13.

Ip Y. T., Reach M., Engstrom Y. et al. Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila* // *Cell.* 1993. Vol. 75. P. 1—20.

Iyer S., Lonnerdal B. Review: Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism // *Eur. J. Clin. Nutr.* 1993. Vol. 47. P. 232—241.

Jacobs A. A., Lew J. E., Paul B. B. Mycoplasma activity of peroxidase-H₂O₂-halide systems // *Infect. and Immun.* 1972. Vol. 5, N1. P. 127—131.

Janeway Ch. A., Jr., Travers P. Immunobiology. The immune system in health and disease. New York; London, 1997.

Janoff A., Feinstein G. Granulocyte elastase: isolation and characterization // *Neutral Proteases of human polymorphonuclear leukocytes.* Baltimor-Munich, 1978. P. 102—117.

- Janoff A., Scherer J. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes # *J. Exp. Med. (USA)*. 1968. Vol. 128. P. 1137—1155.
- Janoff A., Zweifach B. W. Production of inflammatory changes in the microcirculation by cationic proteins extracted from lysosomes # *J. Exp. Med. (USA)*. 1964. Vol. 120. P. 747—760.
- Jenne D. E., Tschopp J. Granzymes, a family of serine proteases released from granules of cytolytic T lymphocytes upon T cell receptor stimulation # *Immunol. Rev.* 1988. Vol. 103. P. 53—71.
- Jensen M. S., Bainton D. F. Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocyte # *J. Cell Biol.* 1973. Vol. 56. P. 379—383.
- Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells # *Science*. 1963. Vol. 140, N4. P. 405.
- Johanson B. Isolation of an iron-containing red protein from human milk # *Acta Chem. Scand.* 1960. Vol. 14, N2. P. 510—512.
- Johnson D., Travis J. The oxidative inactivation of human alpha 1-proteinase inhibitor # *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 4022—4026.
- Johnson K. R., Nauseef M., Care A. et al. Characterization of cDNA clones for human myeloperoxidase: Predicted amino acid sequence and evidence for multiple mRNA species # *Nucl. Acids Res.* 1987. Vol. 15. P. 2013—2028.
- Johnson U., Ohlsson K., Olsson I. Effects of granulocyte neutral proteases on complement components # *Scand. J. Immunol.* 1976. Vol. 5. P. 421—435.
- Jolles J., Donda A., Amiguet P., Jolles P. Mare lactotransferrin: purification, analysis, and N-terminal sequence determination # *FEBS Lett.* 1984. Vol. 176, N1. P. 185—188.
- Jolles P. Lysozyme, a chapter of molecular biology # *Angew. Chem. Int. Ed.* 1969. Vol. 8. P. 227.
- Jolles P., Jolles J. What's new in lysozyme research? # *Mol. Cell Biochem.* 1984. Vol. 63. P. 165—189.
- Jones D. E., Bevins C. L. Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene # *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, N32. P. 23 216—23 225.
- Jones D. E., Bevins C. L. Defensin-6 messenger RNA in human paneth cells — implications for antimicrobial peptides in host defense of the human bowel # *FEBS Lett.* 1993. Vol. 315. P. 187—192.
- Jorg A., Pasquier J.-M., Portmann P. A comparison of eosinophil and neutrophil peroxidases from horse leukocytes # *Experientia*. 1979. Vol. 35, N7. P. 936.
- Juvvadi P., Vunnam S., Merrifield E. L. et al. Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids # *J. Pept. Sci.* 1996. Vol. 2, N4. P. 223—232.
- Kagan B. L., Selsted M. E., Ganz T., Lehrer R. I. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes # *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87, N1. P. 210—214.
- Kania A., Natori S. Cloning of gene cluster for sarcotoxin I, antibacterial proteins of *Sarcophaga peregrina* # *FEBS Lett.* 1989. Vol. 258. P. 199—202.
- Kao R. C., Wehner N. G., Skubitz K. M., Gray B. H., Hoidal J. R. Proteinase 3: A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters # *J. Clin. Invest.* 1988. Vol. 82. P. 1963—1973.
- Kappler C., Meister M., Lagueux M. et al. Insect immunity. Two 17-bp repeats nesting a κ B-related sequence confer inducibility to the dipterin gene and bind a polypeptide in bacteria-challenged *Drosophila* # *EMBO J.* 1993. Vol. 12. P. 1561—1568.
- Kato Y., Komatsu S. ASABF, a novel cysteine-rich antibacterial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Purification, primary structure, and molecular cloning of cDNA # *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271, N48. P. 30 493—30 498.
- Kato Y., Taniai K., Hirochika H., Yamakawa M. Expression and characterization of cDNAs for cecropin B, an antibacterial protein of the silkworm, *Bombyx mori* # *Insect. Biochem. Molec. Biol.* 1993. Vol. 23. P. 285—290.
- Kawano K., Yoneya T., Miyata T. et al. Antimicrobial peptide, Tachyplesin 1, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypterus tridentatus*) — NMR determination of the β -sheet structure # *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 15 365—15 367.
- Kemp L. M., Estridge J. K., Brennan A. et al. Mononuclear phagocytes and HSV-1 infection # *J. Leukocyte. Biol.* 1990. Vol. 47. P. 483—489.
- Keller R., Muller-Eckhardt C., Kayser F. H., Keller H. U. Interrelation between different types of cell. A comparative study of the biological properties of a cationic polypeptide from lysosomes of polymorphonuclear leukocytes and other cationic components # *Int. Arch. Allergy. and Appl. Immunol.* 1968. Vol. 33. P. 239—258.
- Kini R. M., Evans H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides # *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1989. Vol. 134. P. 277—286.
- Kitahara M., Eyre H. J., Simonian Y. et al. Hereditary myeloperoxidase deficiency # *Blood*. 1981. Vol. 57. P. 888—893.
- Klebanoff S. J. Isolation of estrogen by rat uterine preparation # *Endocrinology*. 1965. Vol. 76, N2. P. 301—311.
- Klebanoff S. J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism # *J. Exp. Med. (USA)*. 1967. Vol. 126. P. 1063—1078.
- Klebanoff S. J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxidase antibacterial system # *J. Bacteriol.* 1968. Vol. 96, N10. P. 2131—2138.
- Klebanoff S. J. Myeloperoxidase-mediated antimicrobial systems and their role in leukocyte function # *Biochemistry of the Phagocytic Process: Localization and the Role of Myeloperoxidase and the Mechanism of the Halogenation Reaction*. Amsterdam, 1970. P. 89—110.
- Klebanoff S. J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes # *Semin. Hematol.* 1975. Vol. 12. P. 117—142.
- Klebanoff S. J. Myeloperoxidase-mediated cytotoxic systems # *The Reticuloendothelial System*. Vol. 2. Biochemistry and Metabolism. New York, 1980a. P. 279—308.
- Klebanoff S. J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes # *Ann. Int. Med.* 1980b. Vol. 93. P. 480—489.
- Klebanoff S. J. Phagocytic cells: products of oxygen metabolism # *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York, 1988. P. 391—444.
- Klebanoff S. J. Myeloperoxidase: occurrence and biological function # *Peroxidases in chemistry and biology*. Boca Raton, 1991. P. 1—35.
- Klebanoff S. J. Oxygen metabolites from phagocytes # *Inflammation. Basic principles and clinical correlates*. New York, 1992. P. 541—588.
- Klebanoff S. J., Clark R. A. Hemolysis and iodination of erythrocyte components by a myeloperoxidase-mediated system # *Blood*. 1975. Vol. 45. P. 699—707.
- Klebanoff S. J., Clark R. A. The neutrophil: function and clinical disorder. Amsterdam, 1978. 810p.
- Klebanoff S. J., Luecke R. G. The antilactobacillus system of saliva. Role of salivary peroxidase # *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1965. Vol. 118. P. 483—486.
- Klebanoff S. J., Pincus S. H. Hydrogen peroxide utilization in myeloperoxidase-deficient leukocytes: A possible microbicidal control mechanism # *J. Clin. Invest.* 1971. Vol. 50. P. 2226—2229.
- Klebanoff S. J., Smith D. C. The source of H₂O₂ for the uterine fluid-mediated sperm-inhibitory system # *Biol. Reprod.* 1970. Vol. 3. P. 236—242.
- Klebanoff S. J., Clark R. A., Rosen H. Myeloperoxidase-mediated cytotoxicity # *Cancer Enzymology*. New York, 1976. P. 267—288.
- Klebanoff S. J., Henderson W. R., Jong E. C. et al. Role of peroxidase in eosinophil function # *Immunobiology of the eosinophil*. 1983. P. 261—282.

Klebanoff S. J., Waktorsdirogn A. M., Rosen H. Antimicrobial activity of myeloperoxidase // *Meth. Enzymol.* 1984. Vol. 105. P. 399—423.

Klebanoff S. J., Agosti J. M., Jorg A., Waltersdorff A. M. Comparative toxicity of the horse eosinophil peroxidase-H₂O₂-halide system and granule basic proteins // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143, N 1. P. 239—244.

Klempner M. S., Dinarello C. A., Gallin J. I. Human leukocyte pyrogen induces release of specific granule contents from human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1978. Vol. 61. P. 1330—1336.

Klickstein L. B., Kaempfer C. E., Weintraub B. U. The granulocyte angiotensin system: angiotensin 1 converting activity of cathepsin G // *J. Biol. Chem.* 1982. Vol. 257. P. 1504—1506.

Ko Y. H., Delannoy M., Pederson P. L. Cystic fibrosis, lung infections, and a human tracheal antimicrobial peptide (hTAP) // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 405. P. 200—208.

Kobayashi A., Matsui M., Kubo T., Natori S. Purification and characterization of a 59 kilodalton protein that specifically binds to NF- κ B-binding motifs of the defense protein genes of *Surcophaga peregrina* (the Flesh Fly) // *Mol. Cell Biol.* 1993. Vol. 13. P. 4049—4056.

Kokryakov V. N., Harwig S. S. L., Panyutich E. A. et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and tachyplesins // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 327, N 2. P. 231—236.

Kondejewski L. H., Farmer S. W., Wishart D. S. et al. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria // *Int. J. Peptide and Protein Res.* 1996. Vol. 47, N 6. P. 460—466.

Konisky J. Colicin and other bacteriocins with established modes of action // *Annu. Rev. Microbiol.* 1982. Vol. 36. P. 125—144.

Korneva E. A., Kokryakov V. N., Rybakina E. G. et al. Stress-induced dysfunction of the immune system and their rehabilitation // *Int. J. Immunorehabilit.* 1994. N 1. P. 181—182.

Korneva E. A., Rybakina E. G., Orlov D. S. et al. Interleukin-1 and defensins in thermoregulation, stress and immunity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997. Vol. 813. P. 465—473.

Kowabata S., Nagayama R., Hirata M. et al. Tachycitin, a small granular component in horseshoe crab hemocytes, is an antimicrobial protein with chitin-binding activity // *J. Biochem.* 1996. Vol. 120, N 6. P. 1253—1260.

Kramer R. M., Hession C., Johansen B. et al. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2 // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 5768—5775.

Kreil G. Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview // *Antimicrobial Peptides*. Chichester, 1994. P. 77—90.

Krishnakumari V., Nagaraj R. Antimicrobial and hemolytic activities of crabrolin, a 13-residue peptide from the venom of the European hornet, *Vespa crabro*, and its analogs // *J. Pept. Res.* 1997. Vol. 50, N 2. P. 88—93.

Kurdowska A., Travis J. Acute phase protein stimulation by \rightarrow 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 21 023—21 026.

Kurose I., Yamada T., Wolf R., Granger D. N. P-selectin-dependent leukocyte recruitment and intestinal mucosal injury induced by lactoferrin // *J. Leukocyte. Biol.* 1994. Vol. 55. P. 771—777.

Kusner D. J., King C. H. Protease-modulation of neutrophil superoxide response // *J. Immunol.* 1989. Vol. 143. P. 1696—1702.

Kylsten P., Samakovlis C., Hultmark D. The cecropin locus in *Drosophila* — a compact gene cluster involved in the response to infection // *EMBO J.* 1990. Vol. 9. P. 217—224.

Laible N. J., Germaine G. R. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Strep-*

tococcus faecalis: inhibition by chitin oligosaccharides // *Infect. and Immun.* 1985. Vol. 48. P. 720—728.

Lambert J., Keppi E., Dimarcq J. L. et al. Insect immunity: isolation from immune hemolymph of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence similarity to rabbit lung macrophages bactericidal peptides // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 262—266.

Larrick J. W., Hirata M., Shimomoura Y. et al. Antimicrobial activity of rabbit CAP18-derived peptides // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993. Vol. 37. P. 2534—2539.

Larrick J. W., Hirata M., Zheng H. et al. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity // *J. Immunol.* 1994. Vol. 152. P. 231—240.

Larrick J. W., Hirata M., Balint R. F. et al. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein // *Infect. and Immun.* 1995. Vol. 63. P. 1291—1297.

Larson H. E., Smith G. P., Shah L. Antitoxin activity of human polymorphonuclear leukocytes // *Brit. J. Exp. Pathol.* 1985. Vol. 66, N 2. P. 243—250.

Lee J. J., Boman A., Chuanxin S. et al. Antimicrobial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 9159—9162.

Lee S. Y., Moon H. J., Kurata S. et al. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* // *J. Biochem.* 1994. Vol. 115. P. 82—86.

Lee S. R., Kurata S., Natori S. Molecular cloning of cDNA for sapecin B, an antibacterial protein of *Sarcophaga* and its detection in larval brain // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 368, N 3. P. 485—487.

Lee I. H., Cho Y., Lehrer R. I. Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava* // *Comp. Biochem. and Physiol. B.* 1997. Vol. 118B. P. 515—521.

Leffel M. S., Spitznagel J. K. Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes // *Infect. and Immun.* 1972. Vol. 5, N 5. P. 761—765.

Lehrer R. I. Antifungal effects of peroxidase systems // *J. Bacteriol.* 1969. Vol. 99, N 2. P. 361—365.

Lehrer R. I. The fungicidal mechanisms of human monocytes. 1. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidicidal mechanisms // *J. Clin. Invest.* 1975. Vol. 55. P. 338—346.

Lehrer R. I., Cline M. J. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis: The role of myeloperoxidase in resistance to *Candida* infection // *J. Clin. Invest.* 1969. Vol. 48. P. 1478—1488.

Lehrer R. I., Ganz T. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils // *Blood.* 1990. Vol. 76, N 11. P. 2169—2181.

Lehrer R. I., Ganz T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins and other cysteine-rich antimicrobial peptides // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996. Vol. 797. P. 228—239.

Lehrer R. I., Hanifk J., Cline M. J. Defective bacterial activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils // *Nature.* 1969. Vol. 223, N 5238. P. 78—79.

Lehrer R. I., Ladra K. M., Hake R. B. Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demonstration of components with candidicidal activity in human, rabbit and guinea pig leukocytes // *Infect. and Immun.* 1975. Vol. 11. P. 1226—1234.

Lehrer R. I., Szklarek D., Selsted M. E., Fleischmann J. Increased content of microbicidal cationic peptides in rabbit alveolar macrophages elicited by complete Freund adjuvant // *Infect. and Immun.* 1981. Vol. 33, N 3. P. 775—778.

Lehrer R. I., Daher K., Ganz T., Selsted M. E. Direct inactivation of viruses by MCP-1

and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes // *J. Virol.* 1985. Vol. 54. P. 467—472.

Lehrer R. I., Szklarek D., Ganz T., Selsted M. E. Synergistic activity of rabbit granulocyte peptides against *Candida albicans* // *Infect. and Immun.* 1986. Vol. 52. P. 902—904.

Lehrer R. I., Ganz T., Selsted M. E. et al. Neutrophils and host defense // *Ann. Int. Med.* 1988a. Vol. 109. P. 127—142.

Lehrer R. I., Ganz T., Szklarek D., Selsted M. E. Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations // *J. Clin. Invest.* 1988b. Vol. 81. P. 1829—1835.

Lehrer R. I., Barton K. A., Daher S. S. et al. Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity // *J. Clin. Invest.* 1989a. Vol. 84, N 2. P. 553—561.

Lehrer R. I., Szklarek D., Barton A. et al. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein // *J. Immunol.* 1989b. Vol. 142, N 12. P. 4428—4434.

Lehrer R. I., Ganz T., Selsted M. E. Defensins: natural peptide antibiotics from neutrophils // *ASM News.* 1990. Vol. 56. P. 315—318.

Lehrer R. I., Ganz T., Selsted M. E. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells // *Cell.* 1991a. Vol. 64. P. 229—230.

Lehrer R. I., Rosenman M., Harwig S. S. et al. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides // *J. Immunol. Meth.* 1991b. Vol. 137. P. 167—173.

Lehrer R. I., Lichtenstein A. K., Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells // *Annu. Rev. Immunol.* 1993. Vol. 11. P. 105—128.

Lehrer R. I., Harwig S. S., Ganz T. Defensins and protegrins. Vertebrate analogs of arthropod antimicrobial peptides // *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect-Host Defense.* Austin, 1994. P. 19—30.

Leippe M. Ancient weapons: NK-Lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite // *Cell.* 1995. Vol. 83, N 1. P. 17—18.

Leippe M., Ebel S., Schoenberger O. L. et al. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 7659—7663.

Leippe M., Andra J., Nickel R. et al. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes // *Mol. Microbiol.* 1994. Vol. 14, N 5. P. 895—904.

Lenarcic B., Ritonja A., Dolenc I. et al. Pig leukocyte cysteine proteinase inhibitor (PLCPI), a new member of the stefin family // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 336. P. 289—292.

Leong S. R., Camerata T. Nucleotide sequence of the bovine bactericidal permeability increasing protein (BPI) // *Nucl. Acids Res.* 1990. Vol. 18. P. 3052.

Lesnikova M. P., Kokryakov V. N., Sckhinek E. K. Effect of low molecular weight cationic protein (LMWCP) from rabbit neutrophils on the level of glucocorticoid hormones and activity of spleen lymphocytes // *Proceedings International Society for Pathophysiology I. Abstracts.* Moscow, 1991. P. 194—195.

Lesnikova M. P., Kokryakov V. N., Shamova O. V. Stress-protective activity of defensin // *Abstracts. I Baltic Sea Conference on Psychosomatics and Psychotherapy.* Kiel (Germany), 1992. P. 44.

Leung K. P., Coren M. B. Uptake and utilization of human polymorphonuclear leukocyte granule myeloperoxidase by mouse peritoneal macrophages // *Cell Tissue Res.* 1989. Vol. 257, N 3. P. 653—656.

Levashina E. A., Ohressor S., Bulet Ph. et al. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties // *Eur. J. Biochem.* 1995. Vol. 233. P. 694—700.

Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes // *Eur. J. Haematol.* 1996. Vol. 56. P. 263—277.

Levy O., Weiss J., Zarembek K. et al. Antibacterial 15 kDa protein isoforms (pl5s) are members of a novel family of leukocyte proteins // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 6058—6063.

Levy O., Ooi C. E., Weiss J. et al. Individual and synergistic effects of rabbit granulocyte proteins on *Escherichia coli* // *J. Clin. Invest.* 1994. Vol. 94. P. 672—682.

Levy O., Ooi C. E., Elsbach P. et al. Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin: comparison of bactericidal permeability-increasing protein, pl5s, and defensins // *J. Immunol.* 1995. Vol. 154. P. 5403—5410.

Levy R. M., Bassolino D. A., Kitchen D. B., Pardi A. Solution structures of proteins from NMR data and modeling: alternative folds for neutrophil peptide 5 // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28. P. 9361.

Lewis K. Multidrug resistance pumps in bacteria: variation on a theme // *TIBS.* 1994. Vol. 19. P. 119—123.

Lichtenstein A. K. Spontaneous tumor cytolysis mediated by inflammatory neutrophils: Dependence upon divalent cations and reduced oxygen intermediates // *Blood.* 1986. Vol. 67. P. 657—665.

Lichtenstein A. K. Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins // *J. Clin. Invest.* 1991. Vol. 88. P. 93—100.

Lichtenstein A. K., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Cytocidal effects of human defensins, cationic peptides of neutralized primary granules // *Clin. Res.* 1986a. Vol. 34. P. 462A.

Lichtenstein A. K., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes // *Blood.* 1986b. Vol. 68. P. 1407—1410.

Lichtenstein A. K., Ganz T., Nguyen T.-M. et al. Mechanism of target cytolysis by peptide defensins // *J. Immunol.* 1988a. Vol. 140, N 8. P. 2686—2694.

Lichtenstein A. K., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Synergistic cytolysis mediated by hydrogen peroxide combined with peptide defensins // *Cell Immunol.* 1988b. Vol. 114. P. 104—116.

Lidholm D. A., Gudmundsson G. H., Xanthopoulos K. G., Boman H. G. Insect immunity: cDNA clones coding for the precursor forms of cecropins A and D, antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia* // *FEBS Lett.* 1987. Vol. 226. P. 8—12.

Lima M. F., Kierszenbaum F. Lactoferrin effects on phagocytic cell function I. Increased uptake and killing of an intracellular parasite by murine macrophages and human monocytes // *J. Immunology.* 1985. Vol. 134, N 6. P. 4176—4183.

Lima M. F., Kierszenbaum F. Lactoferrin effects on phagocyte cell function // *J. Immunol.* 1987. Vol. 139, N 5. P. 1647—1651.

Lin J., Harper P. C., Gurewich V. Fibrin-bound lipoprotein (a) promotes plasminogen binding but inhibits fibrin degradation by plasmin // *Biochemistry.* 1994. Vol. 33. P. 2554—2560.

Linzmeier R., Michaelson D., Liu L., Ganz T. The structure of neutrophil defensin genes // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 321. P. 267—277.

Liu L., Ganz T. The pro region of human neutrophil defensin contains a motif that is essential for normal subcellular sorting // *Blood.* 1995. Vol. 85. P. 1095—1103.

Liu L., Zhao C., Heng H. H. Q., Ganz T. The human β -defensin-1 and α -defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with different disulphide topology share a common ancestry // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 43. P. 316—320.

Locksley R. M., Klebanoff S. J. Oxygen-dependent microbicidal systems of phagocytes and host defense against intracellular Protozoa // *J. Cell. Biochem.* 1983. Vol. 22, N 3. P. 17—29.

Lohner K., Latal A., Lehrer R. I., Ganz T. Differential scanning microcalorimetry indicates that human defensin, HNP-2, interacts specifically with biomembrane mimetic systems // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 1525—1531.

Miller T. E. Killing and lysis of gram-negative bacteria through the synergistic effect of hydrogen peroxide, ascorbic acid and lysozyme // *J. Bacteriol.* 1969. Vol. 98. P. 949—955.

Mirgorodskay O. A., Shevchenko A. A., Abdalla K. O. M. A. et al. Primary structure of three cationic peptides from porcine neutrophils. Sequence determination by combined usage of electrospray ionization mass spectrometry and Edman degradation // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 330, N3. P. 339—342.

Miyakawa Y., Rainakar P., Rao A. et al. In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. and Immun.* 1996. Vol. 64, N3. P. 926—932.

Miyashita A., Hara S., Sugiyama M. et al. Isolation and characterization of a new member of the insect defensin family from a beetle, *Allomyrina dichotoma* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Vol. 220, N3. P. 526—531.

Miyasaki K. T., Bodeau A. L. Human neutrophil azurocidin synergizes with leukocyte elastase and Cathepsin G in the killing of *Capnocytophaga sputigena* // *Infect. and Immun.* 1992. Vol. 60. P. 4973—4975.

Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T. et al. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes tachyplesin II, polyphemusins I and II: chemical structure and biological activity // *J. Biochem.* 1989. Vol. 104. P. 663—668.

Miyachi J., Watanabe Y. Immunocytochemical localisation of lactoferrin in human neutrophils // *Cell Tissue Res.* 1987. Vol. 247. P. 249—258.

Moguilevsky N., Retegui L. A., Masson P. L. Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leukocytes // *Biochem. J.* 1985. Vol. 229, N2. P. 353—359.

Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S. Preparation et propriétés de la lactosiderophiline (lactotransferrine) du lait de femme // *Biochim. et biophys. acta.* 1960. Vol. 45. P. 413—421.

Moon H. J., Lee S. J., Kurata S. et al. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the Coleopteran, *Tenebrio molitor* // *J. Biochem.* 1994. Vol. 116, N1. P. 53—58.

Moore K. S., Bevins C. L., Brasseur M. M. et al. Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis* // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 19 851—19 857.

Moore K. S., Wehrli S., Roder H. et al. Squalamine — an aminosterol antibiotic from the shark // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 1354—1358.

Mor A., Nicolas P. The N-terminal alpha-helical domain 1—18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 1934—1939.

Mor A., Nguyen V. H., Delfour A. et al. Isolation, amino acid sequence, and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30. P. 8824—8830.

Moretta A. Molecular mechanism in cell-mediated cytotoxicity // *Cell.* 1997. Vol. 90. P. 13—18.

Morgan J. G., Sukiennicki T., Pereira H. A. et al. Cloning of the cDNA for the serine protease homolog CAP37/azurocidine a microbicidal and chemotactic protein from human granulocytes // *J. Immunol.* 1991. Vol. 147, N9. P. 3210—3214.

Morikawa N., Hagiwara K., Nakajima T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog *Rana brevipoda porsa* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1992. Vol. 189. P. 184—190.

Morimoto M., Mori H., Otake T. et al. Inhibitory effect of tachyplesin I on the proliferation of human immunodeficiency virus in vitro // *Chemotherapy.* 1991. Vol. 37. P. 206—211.

Morishima I., Suginaka S., Ueno T., Hirano H. Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides from the silkworm *Bombyx mori* // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1990. Vol. 95B. P. 551—554.

Morishita K., Kubota N., Asano S. et al. Molecular cloning and characterization of cDNA for human myeloperoxidase // *J. Biol. Chem.* 1987. Vol. 262. P. 3844—3851.

Morrison D. C., Dinarello C. A., Manford R. S. Current status of bacterial endotoxins // *ASM News.* 1994. Vol. 60, N9. P. 479—484.

Morrison M., Shonbaum G. R. Peroxidase-catalyzed halogenation // *Ann. Rev. Biochem.* 1976. Vol. 45. P. 861—888.

Movot H. Z., Habal F. M., Mac Morine D. R. L. Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes with kininogenase activity // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1976. Vol. 50. P. 257—270.

Müller-Eberhard H. J. Complement: chemistry and pathways // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates.* New York, 1992. P. 33—62.

Munck A., Guyre P. M., Holbrook N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions // *Endocrine reviews.* 1984. Vol. 5, N1. P. 25—44.

Murphy C. J., Foster B. A., Mannis M. J. et al. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 1993. Vol. 155. P. 408—413.

Nakamura T., Furunaka H., Miyata T. et al. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 16 709—16 713.

Nauseef W. M., Malech H. L. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase // *Blood.* 1986. Vol. 67. P. 1504—1507.

Nauseef W. M., Olsson I., Arnljots K. Biosynthesis processing of myeloperoxidase — a marker for myeloid cell differentiation // *Eur. J. Haematol.* 1988. Vol. 40. P. 97—100.

Newton N., Morell D. B., Clarke L. Myeloperoxidase and associated porphyrins in rat chloroma tissue // *Biochim. et biophys. acta.* 1965. Vol. 96, N3. P. 463—475.

Niewiarowski S. Platelet factor 4 (PF4) — platelet protein with heparin neutralizing activity // *Thromb. Haemost.* 1976. Vol. 36, N1. P. 273—276.

Nikaido H., Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability // *Microbiol. Rev.* 1985. Vol. 49. P. 1—32.

Niles J. L., McCluskey R. T., Ahmad M. F., Arnaout M. A. Wegener's granulomatosis autoantigen is a novel neutrophil // *Blood.* 1989. Vol. 74. P. 1888—1893.

Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1975. Vol. 63. P. 463—468.

Nolan G., Baltimore D. The inhibitory ankyrin and activator Rel proteins // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1992. Vol. 2. P. 211—220.

Nygaard S. D., Ganz T., Peterson M. W. Defensins reduce the barrier integrity of a cultured epithelial monolayer without cytotoxicity // *Amer. J. Respirat. Cell and Molec. Biol.* 1993. Vol. 8. P. 193—200.

Odajima T. Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. Nature of the prosthetic group of myeloperoxidase // *J. Biochem.* 1980. Vol. 87. P. 379—391.

Odeberg H., Olsson I. Antibacterial activity of cationic proteins from human granulocytes // *J. Clin. Invest.* 1975. Vol. 56. P. 1118—1142.

Odeberg H., Olsson I. Microbicidal mechanisms of human granulocyte: synergistic effects of granulocyte elastase and myeloperoxidase on chymotrypsin-like cationic protein // *Infect. and Immun.* 1976a. Vol. 14, N6. P. 1276—1283.

Odeberg H., Olsson I. Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes // *Infect. and Immun.* 1976b. Vol. 14. P. 1269—1275.

Odeberg H., Olsson I., Venge P. Antibacterial cationic proteins of human granulocytes // *J. Clin. Invest.* 1975. Vol. 56. P. 1118—1124.

Odeberg H., Oloffson T., Olsson I. Primary and secondary granule contents and bactericidal capability of neutrophils in acute leukemia // *Blood Cells.* 1976. Vol. 2. P. 553—556.

Ohlsson K. Purification and properties of granulocyte collagenase and elastase // Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Baltimore, 1978a. P. 89—101.

Ohlsson K. Interaction of granulocyte neutral proteases with alpha 1-antitrypsin, alpha 2-macroglobulin and alpha 1-antichymotrypsin // Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Baltimore, 1978b. P. 167—177.

Ohlsson K., Olsson I. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of granulocyte elastase // Eur. J. Biochem. 1974. Vol. 42. P. 519—527.

Ohlsson K., Olsson I., Spitznagel J.K. Localization of chymotrypsin-like cationic protein, collagenase and elastase in azurophilic granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes // Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 1977. Vol. 358. P. 361—366.

Ohno N., Morrison D.C. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme: binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 4434—4441.

Oishi O., Yamashita S., Nishimoto E. et al. Conformations and orientations of aromatic amino acid residues of tachyplein I in phospholipid membranes // Biochemistry. 1997. Vol. 36, N 14. P. 4352—4359.

Okada M., Natori S. Mode of action of a bactericidal protein in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh-fly) larvae // Biochem. J. 1984. Vol. 222. P. 119—124.

Okrent D.G., Lichtenstein A., Ganz T. Direct cytotoxicity of PMN granule proteins to human lung-derived cell and endothelial cells // Amer. Rev. Respirat. Disease. 1990. Vol. 141. P. 179—185.

Olofsson T., Odeberg H., Olsson I. Granulocyte function in chronic granulocytic leukemia // Blood. 1976. Vol. 48, N 4. P. 581—593.

Olsen R.L., Little C. Purification and some properties of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase from human blood // Biochem. J. 1983. Vol. 209. P. 781—787.

Olsson I. Biochemical properties of neutral proteases of human neutrophils // Movement, metabolism and bactericidal mechanisms of phagocytes. Padua, 1977. P. 103—114.

Olsson I., Odeberg H., Weiss J., Elsbach P. Bactericidal cationic proteins of human granulocytes // Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes. Baltimore-Munich, 1978. P. 18—32.

Ooi C.E., Weiss J., Elsbach P. et al. A 25 kDa NH₂-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60 kDa bactericidal/permeability-increasing protein // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 14 891—14 894.

Ooi C.E., Weiss J., Levy O., Elsbach P. Isolation of two isoforms of a novel 15 kDa protein from rabbit polymorphonuclear leukocytes that modulate the antibacterial actions of other leukocyte proteins // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265. P. 15 956—15 962.

Ooi C.E., Weiss J., Doerfler V.E., Elsbach P. Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD c-terminal fragment of the 55—60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils // J. Exp. Med. (USA). 1991. Vol. 174. P. 649—655.

Ooi W., Levine H.G., La Mont J.T., Clark R.A. Inactivation of *Clostridium difficile* cytotoxin by the neutrophil myeloperoxidase system // J. Infect. Diseases. 1984. Vol. 149, N 2. P. 215—219.

Opal S.M., Fisher C.J., Marra M.N. et al. Bactericidal/permeability — increasing protein as a novel therapeutic modality in the treatment of endotoxic shock // Clin. Res. 1991. Vol. 30. P. 351A.

Opal S.M., Palardy J.E., Marra M.N. et al. Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection // Lancet. 1994. Vol. 344. P. 429—431.

Opie E.L. Intracellular digestion: the enzymes and antienzymes concerned // Phys. Revs. 1922. Vol. 2. P. 522.

Oram J.D., Reiter B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents // Biochim. et biophys. acta. 1968. Vol. 170, N 3. P. 351—365.

Oseas R.S., Allen J., Yang H.H. et al. Rabbit cationic protein enhances leukocyte adhesiveness // Immunology. 1981a. Vol. 33. P. 523—526.

Oseas R.S., Yang H.H., Baehner R.L., Boxer L.A. Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness // Blood. 1981b. Vol. 57. P. 939—945.

Osserman E.F., Canfield E., Bagchok S. Lysozyme. New York; London, 1974.

Ouellette A.J., Lualdi J.C. A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine-rich peptides // J. Biol. Chem. 1990. Vol. 265, N 17. P. 9831—9837.

Ouellette A.J., Greco R.M., James M. et al. Developmental regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor in RNA in mouse small intestinal cryptepithelium // J. Cell Biol. 1989a. Vol. 108. P. 1687—1695.

Ouellette A.J., Prautcheva D., Ruddle F.H., James M. Localization of the cryptdin locus on mouse chromosome 8 // Genomics. 1989b. Vol. 5. P. 233—239.

Ouellette A.J., Miller S.I., Henschen A.H., Selsted M.E. Purification and primary structure of murine cryptdin-1, a Paneth cell defensin // FEBS Lett. 1992. Vol. 304, N 2. P. 146—148.

Ouellette A.J., Hsieh M.M., Nosek M.T. et al. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms // Infect. and Immun. 1994. Vol. 62. P. 5040—5047.

Owen C.A., Campbell M.A., Sannes P.L. et al. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases // J. Cell Biol. 1995. Vol. 131. P. 775—789.

Palfree R.G., Sadro L., Solomon S. The gene encoding the human corticostatin HP-4 precursor contains a recent 86-base duplication and is located on chromosome 8 // Mol. Endocrin. 1993. Vol. 7, N 2. P. 199—205.

Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // Arch. Biochem. and Biophys. 1969. Vol. 130, N 2. P. 337—346.

Panyutich A.V., Ganz T. Activated alpha 2-Macroglobulin is a principal defensin-binding protein // Amer. J. Respirat. Cell and Molec. Biol. 1991. N 5. P. 101—106.

Panyutich A.V., Voitenok N.N., Lehrer R.J., Ganz T. An enzyme immunoassay for human defensins // J. Immunol. Meth. 1991. Vol. 141. P. 149—155.

Panyutich A.V., Baturevich E.A., Kolesnikova T.S., Ganz T. The effect of biotinylation on the antigenic specificity of anti-defensin monoclonal antibodies // J. Immunol. Meth. 1993a. Vol. 158. P. 237—242.

Panyutich A.V., Panyutich E.A., Krapivin V.A. et al. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis // J. Lab. and Clin. Med. 1993b. Vol. 122, N 2. P. 202—207.

Panyutich A.V., Szold O., Poon P.H. et al. Identification of defensin binding to C1 complement // FEBS Lett. 1994. Vol. 356. P. 169—173.

Panyutich A.V., Hiemstra P.S., Van Wetering S., Ganz T. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other // Amer. J. Respirat. Cell and Molec. Biol. 1995. Vol. 12. P. 351—357.

Pardi A., Hare D., Selsted M.E. et al. Solution structures of the rabbit neutrophil defensin NP-5 // J. Mol. Biol. 1988. Vol. 201, N 3. P. 625—636.

Parra-Lopez C., Baer M.T., Groisman E.A. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium* // EMBO J. 1993. Vol. 12. P. 4053—4062.

Parry M.F., Root R.K., Metcalf J.A. et al. Myeloperoxidase deficiency: Prevalence and clinical significance // Amer. Int. Med. 1981. Vol. 95, N 3. P. 293—301.

Patterson-Delafield J., Martinez R.J., Lehrer R.J. Microbicidal cationic proteins in rabbit alveolar macrophages: a potential host defense mechanism // Infect. and Immun. 1980. Vol. 30. P. 180—192.

Patterson-Delafield J., Szklarek D., Martinez R., Lehrer R.I. Microbicidal cationic proteins of rabbit alveolar macrophages: amino acid composition and functional attributes // *Infect. and Immun.* 1981. Vol. 31, N2. P. 723—731.

Penniall R., Spitznagel J.K. Chicken neutrophils: oxidative metabolism in phagocytic cells devoid of myeloperoxidase // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72. P. 5012—5015.

Penniall R., Holbrook J.P., Zeya H.I. The inhibition of cytochrome oxidase by lysosomal cationic proteins of rabbit polymorphonuclear leukocytes // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1972. Vol. 47. P. 1270.

Peppin G.J., Weiss S.J. Activation of endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. P. 4322—4326.

Pereira H.A. CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator // *J. Leukocyte. Biol.* 1995. Vol. 57. P. 805—812.

Pereira H.A., Martin L.E., Spitznagel J.K. Quantitation of a cationic antimicrobial granule protein of human polymorphonuclear leukocytes by ELISA // *J. Immunol. Meth.* 1989. Vol. 117, N1. P. 115—120.

Pereira H.A., Shafer W.M., Pohl J. et al. CAP37, a human neutrophil derived chemotactic factor with monocyte specific activity // *J. Clin. Invest.* 1990a. Vol. 85, N4. P. 1468—1476.

Pereira H.A., Spitznagel J.K., Pohl J. et al. CAP37, a 37 kDa human neutrophil granule cationic protein shares homology with inflammatory proteinases // *Life Sci.* 1990b. Vol. 46, N3. P. 189—196.

Pereira H.A., Spitznagel J.K., Winton E.F. et al. The ontogeny of a 57 kDa cationic antimicrobial protein of human polymorphonuclear leukocytes: localization to a novel granule population // *Blood.* 1990c. Vol. 76. P. 825—834.

Pereira H.A., Erdem I., Pohl J., Spitznagel J.K. Synthetic bactericidal peptide based on CAP37 — a 37 kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1993. Vol. 90. P. 4733—4737.

Peters C.W., Kruse U., Pollwein R. et al. The human lysozyme gene-sequence organization and chromosomal localization // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 182, N3. P. 507—516.

Peters M.S., Rodrigues M., Gleich G.J. Localization of human eosinophil granule major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin by immunoelectron microscopy // *Lab. Invest.* 1986. Vol. 54. P. 656—662.

Peterson M.W. Neutrophil cathepsin G increases transendothelial albumin flux // *J. Lab. and Clin. Med.* 1989. Vol. 113, N3. P. 297—308.

Petterson A. Ueber die bacteriziden leukocyten Stoffe und ihre Beziehungen // *Immunitat und Bacteriol. Parasitink.* 1905. Vol. 139. P. 423—437.

Pierce A., Colavizza D., Bennaissa M. et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 196. P. 177—184.

Plow E.F. The contribution of leukocyte proteases to fibrinolysis // *Blut.* 1986. Vol. 53, N1. P. 1—9.

Pohl J., Pereira H.A., Martin N.M., Spitznagel J.K. Amino acid sequence of CAP37, a human neutrophil granule-derived antibacterial and monocyte-specific chemotactic glycoprotein structurally similar to neutrophil elastase // *FEBS Lett.* 1990. Vol. 272. P. 200—204.

Popsueva A.E., Zinivieva M., Visser J. et al. A novel murine cathelin-like protein expressed in bone marrow // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 391, N1—2. P. 5—8.

Porter E., Liu L., Oren A. et al. Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules // *Infect. and Immun.* 1997a. Vol. 65. P. 2389—2395.

Porter E., Van Dam E., Valore E., Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5 // *Infect. and Immun.* 1997b. Vol. 65. P. 2396—2401.

Pruzanski W., Ranadive N.S., Saito S. Modulation of phagocytosis and intracellular bactericidal activity of polymorphonuclear and mononuclear cells by cationic proteins from human granulocytes. Alternative pathway of phagocytic enhancement // *Inflammation.* 1984. Vol. 8, N4. P. 445—457.

Pryzwansky K.B., Martin L.E., Spitznagel J.K. Immunocytochemical localization of myeloperoxidase, lactoferrin, lysozyme and neutral proteases in human monocytes and neutrophilic granulocyte // *J. Reticuloendothel. Soc.* 1978. Vol. 24. P. 295—310.

Pungercar J., Strukelj B., Kopitar G. et al. Molecular cloning of a putative homolog of proline/arginine-rich antibacterial peptides from porcine bone marrow // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 336, N2. P. 284—288.

Qu X.-M., Steiner H., Engstrom A. et al. Insect immunity: isolation and structure of cecropine B and D from pupae of the Chinese oak silk moth, *Antreraea pernyi* // *Eur. J. Biochem.* 1982. Vol. 127. P. 219—224.

Qu X.D., Harwig S.S., Oren A. et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins // *Infect. and Immun.* 1996. Vol. 64, N4. P. 1240—1245.

Racanelli A., Fareed J., Walenga J.M., Coyne E. Biochemical and pharmacologic studies on the protamine interactions with heparin, its fractions and fragments // *Semin. Thromb. Haemost.* 1985. Vol. 11, N2. P. 176—189.

Rademacher S.W., Schoop V.M., Schluesener H.J. Bactenecin, a leukocytic antimicrobial peptide, is cytotoxic to neuronal and glial cells // *J. Neurosci. Res.* 1993. Vol. 36. P. 657—662.

Rado T.A., Bolleckens J., St. Laurent G. et al. Lactoferrin biosynthesis during granulocytopenesis // *Blood.* 1984. Vol. 64. P. 1103—1109.

Rado T.A., Wei X., Benz E.J. Isolation of lactoferrin cDNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis // *Blood.* 1987. Vol. 70, N4. P. 989—993.

Raetz Ch.R.H. Biochemistry of endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 129—170.

Ranadive N.S., Cochran C.G. Isolation and characterization of permeability factors from rabbit neutrophils // *J. Exp. Med. (USA).* 1968. Vol. 128. P. 605—622.

Ranadive N.S., Sajani A.N., Alimurka K., Movat H.Z. Release of basic proteins and lysosomal enzymes from neutrophils leukocytes of the rabbit // *Int. Arch. Allergy.* 1973. Vol. 45. P. 880—898.

Rausch P.G., Moore T.G. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils. A phylogenetic comparison // *Blood.* 1975. Vol. 46, N6. P. 913—919.

Raynor R.L., Zheng B., Kuo J.F. Membrane interactions of amphiphilic polypeptides mastoparan, melittin, polymyxin B, and cardiotoxin // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266, N5. P. 2753—2758.

Redhead K., Hill T., Chart H. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis* // *J. Gen. Microbiol.* 1987. Vol. 133. P. 891—898.

Rees J.A., Moniatte M., Bulet P. Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea) // *Insect Biochem. Molec. Biol.* 1997. Vol. 27, N5. P. 413—422.

Register K.B., Davis C.H., Wyrick P.B. et al. Nonoxidative antimicrobial effects of human polymorphonuclear leukocyte granule proteins on *Chlamydia* spp. in vitro // *Infect. and Immun.* 1987. Vol. 55, N10. P. 2420—2427.

Reichhart J.-M., Petit I., Legrain M. et al. Expression and secretion in yeast of active insect defensin, an inducible antibacterial peptide from the fleshfly *Phormia terranova* // *Invert. Reprod. Dev.* 1992a. Vol. 21. P. 15—24.

Reichhart J.-M., Meister M., Dimarcq J.L. et al. Insect immunity — developmental and inducible activity of the *Drosophila* dipterin promoter // *EMBO J.* 1992b. Vol. 11. P. 1469—1477.

Selsted M. E. Investigational approaches for studying the structures and biological functions of myeloid antimicrobial peptides / *Genetic Engineering*. 1993. Vol. 15. P. 131—147.

Selsted M. E., Harwig S. S. Purification, primary structure and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin / *Infect. and Immun.* 1987. Vol. 55, N9. P. 2281—2286.

Selsted M. E., Harwig S. S. Determination of the disulfide array in human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide / *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 4003—4007.

Selsted M. E., Ouellette A. J. Defensins in granules of phagocytic and non-phagocytic cells / *Trends in Cell Biology*. 1995. Vol. 5. P. 114—119.

Selsted M. E., Brown D. M., De Lange R. J., Lehrer R. I. Primary structures of MCP-I and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages / *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, N23. P. 14 485—14 489.

Selsted M. E., Szklarek D., Lehrer R. I. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes / *Infect. and Immun.* 1984. Vol. 45. P. 150—154.

Selsted M. E., Brown D. M., De Lange R. J. et al. Primary structures of six antimicrobial peptides of rabbit peritoneal neutrophils / *J. Biol. Chem.* 1985a. Vol. 260. P. 4579—4584.

Selsted M. E., Harwig S. S., Ganz T. et al. Primary structures of three human neutrophil defensins / *J. Clin. Invest.* 1985b. Vol. 76. P. 1436—1439.

Selsted M. E., Szklarek D., Ganz T., Lehrer R. I. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans* / *Infect. and Immun.* 1985c. Vol. 49. P. 202—206.

Selsted M. E., Miller S. I., Henschen A. H., Ouellette A. J. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense / *J. Cell Biol.* 1992a. N118. P. 929—936.

Selsted M. E., Novotny M. J., Morris W. L. et al. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils / *J. Biol. Chem.* 1992b. Vol. 267. P. 4292—4295.

Selsted M. E., Tang Y. Q., Morris W. L. et al. Purification primary structures and antibacterial activity of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils / *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N9. P. 6641—6648.

Selvaraj R. J., Paul B. B., Strauss R. R. et al. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H₂O₂-Cl antimicrobial system / *Infect. and Immun.* 1974. Vol. 9. P. 255—260.

Shafer W. M., Martin L. E., Spitznagel J. K. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate / *Infect. and Immun.* 1984. Vol. 45. P. 29—35.

Shafer W. M., Martin L. E., Spitznagel J. K. Late intraphagosomal hydrogen ion concentration favors the in vitro antimicrobial capacity of a 37 kilodalton cationic granule protein of human neutrophil granulocytes / *Infect. and Immun.* 1986a. Vol. 53, N3. P. 651—655.

Shafer W. M., Onunka V. C., Martin L. E. Antigonococcal activity of human neutrophil cathepsin G / *Infect. and Immun.* 1986b. Vol. 54, N1. P. 184—188.

Shau H., Kim A., Golub H. Modulation of natural killer and lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by lactoferrin / *J. Leukocyte Biol.* 1992. Vol. 51. P. 343—349.

Sheu M. J., Baldwin W. W., Brunson K. W. Cytotoxicity of rabbit macrophage peptides MCP-1 and MCP-2 for mouse tumor cells / *Antimicrob. Agents Chemother.* 1985. Vol. 28. P. 626—629.

Shigenaga T., Muta T., Toh Y. et al. Antimicrobial tachyplesin peptide precursor — cDNA cloning and cellular localization in the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) / *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265. P. 21 350—21 354.

Shimoda M., Ohki K., Shimamoto Y., Kohashi O. Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus* / *Infect. and Immun.* 1995. Vol. 63. P. 2886—2891.

Shiomi A., Nakazato M., Ihi T. et al. Establishment of radioimmunoassay for human neutrophil peptides and their increases in plasma and neutrophil in infection / *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 195, N3. P. 1336—1344.

Showell H. J., Freer R. J., Zigmund S. H. et al. The structure activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzyme secretion for neutrophils / *J. Exp. Med. (USA)*. 1976. Vol. 143. P. 1154—1169.

Siden I., Boman H. G. *Escherichia coli* mutants with an altered sensitivity to cecropin D / *J. Bacteriol.* 1983. Vol. 154. P. 170—176.

Siebens H., Tevethia S. S., Babor B. Neutrophil-mediated antibody killing of herpes-simplex-infected cells / *Blood*. 1979. Vol. 54. P. 88—97.

Simmaco M., Barra D., Chiarini F. et al. A family of bombinin-related peptides from the skin of *Bombina variegata* / *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 199. P. 217—236.

Simmaco M., Mignogna G., Barra D., Bossa F. Novel antimicrobial peptides from skin secretion of the European frog *Rana esculenta* / *FEBS Lett.* 1993. Vol. 324. P. 159—161.

Simmaco M., Mignogna G., Barra D., Bossa F. Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and isolation of new active peptides / *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 11 956—11 961.

Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S. et al. Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria* / *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 242, N3. P. 788—792.

Singh A., Bateman A., Zhu Q. Z. et al. Structure of a novel human granulocytic peptide with anti ACTH activity / *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1988. Vol. 155, N1. P. 524—529.

Sinha S., Watorek W., Karr S. et al. Primary structure of human neutrophil elastase / *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. P. 2228—2232.

Sipos D., Andersson M., Ehrenberg A. The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR / *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 209. P. 163—169.

Sips H. J., Hamers M. N. Mechanism of bactericidal action of myeloperoxidase: Increased permeability of the *Escherichia coli* cell envelope / *Infect. and Immun.* 1981. Vol. 31. P. 11—16.

Sitaram N., Nagaraj R. Interaction of the 47-residue antibacterial peptide seminalplasmin and its 13-residue fragment which has antibacterial and hemolytic activities with model membranes / *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 3124—3130.

Skerlavaj B., Romeo D., Gennaro R. Rapid membrane permeabilization and inhibition of vital functions of gramnegative bacteria by bactenecins / *Infect. and Immun.* 1990. Vol. 58, N11. P. 3724—3730.

Slater K., Fletcher J. Lactoferrin derived from neutrophils inhibits the mixed lymphocyte reaction / *Blood*. 1987. Vol. 69, N5. P. 1328—1333.

Smith J. J., Travis S. M., Greenberg E. P., Welsh M. J. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid / *Cell*. 1996. Vol. 85. P. 229—236.

Solomon S. Corticostatins / *TEM*. 1993. Vol. 4, N8. P. 260—264.

Soravia E., Martini G., Zasloff M. Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus* granular gland secretions / *FEBS Lett.* 1988. Vol. 228. P. 337—340.

Sorensen M., Sorensen J. P. L. The proteins in whey / *C. r. trav. Lab. Carlsberg*. 1939. Vol. 23, N1. P. 55—99.

Sparkes R. S., Kronenberg M., Heinzmann C. et al. Assignment of defensin genes to human chromosome 8p 23 / *Genomics*. 1989. Vol. 5, N2. P. 240—244.

Spitznagel J. K. Antibacterial effects associated with changes in bacterial cytology produced by cationic polypeptides / *J. Exp. Med. (USA)*. 1961. Vol. 114, N 6. P. 1079—1091.

Spitznagel J. K. Microbial interaction with neutrophils // *Rev. Infect. Dis.* 1983. Vol. 5, N4. P. 806—822.

Spitznagel J. K. Non-oxidative antimicrobial actions of leukocytes // *Contemporary topics in immunobiology.* New York, 1984. Vol. 14. P. 283—343.

Spitznagel J. K. Antibiotic proteins of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1990. Vol. 86, N4. P. 1381—1386.

Spitznagel J. K., Chi H.-J. Cationic protein and antibacterial properties of infected tissues and leukocytes // *Amer. J. Pathol.* 1963. Vol. 43, N4. P. 697—711.

Spitznagel J. K., Okamura N. Oxygen independent microbicidal mechanisms of human polymorphonuclear leukocytes // *Host Def. Intracell. Pathog. Proc. Conf., Philadelphia*, 10—12 June. 1981. New York; London, 1983. P. 5—17.

Spitznagel J. K., Shafer W. M. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary // *Rev. Infect. Dis.* 1985. Vol. 7, N3. P. 398—403.

Spitznagel J. K., Cooper M. R., McCall A. et al. Selective deficiency of granules associated with lysozyme and lactoferrin in human polymorphs (PMN) with reduced microbicidal capacity // *J. Clin. Invest.* 1972. Vol. 51, N1. P. 93a.

Spitznagel J. K., Dalldorf F. G., Leffell M. et al. Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes // *Lab. Invest.* 1974. Vol. 30. P. 774—785.

Stahmann M. A., Spencer A. K. Deamination of protein lysyl epsilon-amino groups by peroxidase in vitro // *Biopolymers.* 1977. Vol. 16. P. 1299—1306.

Stahmann M. A., Spencer A. K., Honold G. R. Crosslinking of proteins in vitro by peroxidase // *Biopolymers.* 1977. Vol. 16. P. 1307—1318.

Stanfield R. L., Westbrook E. M., Selsted M. E. Characterization of two crystal forms of human defensin neutrophil cationic peptide 1, a naturally occurring antimicrobial peptide of leukocytes // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263, N12. P. 5933—5935.

Starkey P. M., Barrett A. J. Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties // *Biochem. J.* 1976. Vol. 155. P. 273—278.

Steimann G., Broxmeyer H. E., De Harven E., Moore M. A. S. Immuno-electron microscopic tracing of lactoferrin, a regulator of myelopoiesis, into a subpopulation of human peripheral blood monocytes // *Brit. J. Haematol.* 1982. Vol. 50. P. 75—84.

Steinberg D. A., Hurst M. A., Fujii C. A. et al. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. Vol. 41, N8. P. 1738—1742.

Steinborner S. T., Waugh R. J., Bowie J. H., Tyler M. J. New caerin antibacterial peptides from the skin glands of the Australian tree frog *Litoria xanthomera*. Part 2. Sequence determination using mass spectrometry and associated techniques // *Rapid Commun. Mass Spectrometry.* 1997. Vol. 11, N9. P. 997—1000.

Steiner H. Secondary structure of the cecropins; antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia* // *FEBS Lett.* 1982. Vol. 137. P. 283—287.

Steiner H., Hultmark D., Engstrom A. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity // *Nature.* 1981. Vol. 292. P. 246—248.

Steiner H., Andreu D., Merrifield R. B. Binding and action of cecropin and cecropin analogues: antibacterial peptides from insects // *Biochim. et biophys. acta.* 1988. Vol. 939. P. 260—266.

Stendahl O., Coble B. I., Dahlgren C. et al. Myeloperoxidase modulates the phagocytic activity of polymorphonuclear neutrophil leukocytes. Studies with cells from a myeloperoxidase-deficient patient // *J. Clin. Invest.* 1984. Vol. 73. P. 366—373.

Stolzenberg E. D., Anderson G. M., Ackermann M. R. et al. Epithelial antibiotic induced in states of disease // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94. P. 8686—8690.

Storici P., Zanetti M. A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to the intestinal antibacterial peptide PR-39 // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1993a. Vol. 196, N3. P. 1058—1065.

Storici P., Zanetti M. A novel cDNA sequence encoding a pig leukocyte antimicrobial peptide with a cathelin-like prosequence // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1993b. Vol. 196, N3. P. 1363—1368.

Storici P., Del Sal G., Schneider C., Zanetti M. cDNA sequence analysis of an antibiotic dodecapeptide from neutrophils // *FEBS Lett.* 1992. Vol. 314. P. 187—190.

Storici P., Scocchi M., Tossi A. et al. Chemical synthesis and biological activity of a novel antibacterial peptide deduced from a pig myeloid cDNA // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 337. P. 303—307.

Stosel T. P. Phagocytoses // *N. Engl. J. Med.* 1974. Vol. 290, N14. P. 774—780.

Stosel T. P., Pollard T. D., Mason R. J., Vaugham M. Isolation and properties of phagocytic vesicles from polymorphonuclear leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1971. Vol. 50. P. 1745—1757.

Strauss R. G., Bove K. E., Jones J. F. et al. An anomaly of neutrophil morphology with impaired function // *N. Engl. J. Med.* 1974. Vol. 290. P. 478—484.

Sun S. C., Faye I. Affinity purification and characterization of CIF, an insect immunoresponsive factor with NF- κ B-like properties // *Comp. Biochem. and Physiol.* 1992a. Vol. 103B. P. 225—233.

Sun S. C., Faye I. Cecropia immunoresponsive factor, an insect immunoresponsive factor with DNA-binding properties similar to nuclear factor κ B // *Eur. J. Biochem.* 1992b. Vol. 204. P. 885—892.

Svinarich D. M., Wolf N. A., Gomez R. et al. Detection of human defensin in reproductive tissues // *Amer. J. Obstet. and Gynecol.* 1997. Vol. 176. P. 470—475.

Swanson C. P., Webster P. L. *The Cell.* New Jersey, 1977. 217 p.

Taguchi S., Ozaki A., Nakagawa K., Momose H. Functional mapping of amino acid residues responsible for the antibacterial action of apidaecin // *Appl. and Environ. Microbiol.* 1996. Vol. 62, N12. P. 4652—4655.

Takahashi H., Nukiwa T., Yoshimura K. et al. Structure of the human elastase gene // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 14 739—14 747.

Takemura H., Kaku M., Kohno S. et al. Evaluation of susceptibility of gram-positive and negative bacteria to human defensins by using radial diffusion assay // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. Vol. 40, N10. P. 2280—2284.

Tamamura H., Kuroda M., Masuda M. et al. A comparative study of the solution structures of tachyplesin I and a novel anti-HIV synthetic peptide, T22 (Tyr 5,12,Lys 7—polyphemusin II), determined by nuclear magnetic resonance // *Biochem. et biophys. acta.* 1993. Vol. 1163. P. 209—216.

Tamamura H., Murakami T., Horiuchi S. et al. Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and anti-human immunodeficiency virus activity // *Chem. Pharm. Bull.* 1995. Vol. 43. P. 853—858.

Tang Y.-Q., Selsted M. E. Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β -defensin peptide from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N9. P. 6649—6653.

Tarver A. P., Clark D. P., Diamond G. et al. Enteric β -defensins: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection // *Infect. and Immunity.* 1998. Vol. 66, N3. P. 1045—1056.

Tchorzewski H., Sulowska Z., Zeman K. Modulation of immune response in vitro and in vivo by human granulocyte factors // *Immunol. Lett.* 1984. Vol. 8. P. 187—195.

Ten R. M., Pease L. R., McKean D. J. et al. Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase // *J. Exp. Med. (USA).* 1989. Vol. 169. P. 1757—1769.

Teng C. T., Pentecost B. T., Marshall A. et al. Assignment of the lactotransferrin gene to human chromosome 3 and to mouse chromosome 9 // *Somat. Cell Molec. Genet.* 1987. Vol. 13, N6. P. 689—695.

Territo M. C., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R. I. Monocyte chemotactic activity of defensins from human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1989. Vol. 84, N6. P. 2017—2020.

- Teshima T., Ueki Y., Nakai T. et al.* Structure determination of lepidopteran, self-defense substance by silkworm // *Tetrahedron*. 1986. Vol. 42. P. 829—834.
- Thomas E. L.* Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chloride derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli* // *Infect. and Immun.* 1979. Vol. 23, N2. P. 522—531.
- Thomas E. L., Aune T. M.* Peroxidase-catalyzed oxidation of protein sulfhydryls mediated by iodine // *Biochemistry*. 1977. Vol. 16, N16. P. 3581—3586.
- Thomas E. L., Aune T. M.* Cofactor role of iodide in peroxidase antimicrobial action against *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978a. Vol. 13. P. 1000—1005.
- Thomas E. L., Aune T. M.* Oxidation of *Escherichia coli* sulfhydryl components by the peroxidase-hydrogen peroxide-iodide antimicrobial system. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1978b. Vol. 13. P. 1006—1010.
- Thorne K. J. I., Oliver R. C., Barrett A. J.* Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases // *Infect. and Immun.* 1976. Vol. 14, N2. P. 555—563.
- Tkachenko S., Rudko I., Korneva E. et al.* Defensin modulates functional activity of platelets // *Neuropeptides*. 1993. Vol. 24, N4. P. 245.
- Tkachenko S., Kokryakov V., Ashmarin I., Kubatov A.* Antimicrobial proteins of neutrophils as regulators of platelet activity // *Int. J. Immunotherapy*. 1994. Vol. 10, N4. P. 159—162.
- Tobias P. S., Mathison J., Mintz D. et al.* Participation of lipopolysaccharide-dependent macrophage activation // *J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992. Vol. 7. P. 239—245.
- Tobias P. S., Soldau K., Ulevitch R. J.* Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum // *J. Exp. Med. (USA)*. 1986. Vol. 164. P. 777—793.
- Tobias P. S., Mathison J. C., Ulevitch R. J.* A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram-negative sepsis // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 13479—13481.
- Tominaga T., Fukata J., Naito Y. et al.* Effects of corticostatin-1 on rat adrenal cells in vitro // *J. Endocrinol.* 1990. Vol. 125. P. 287—292.
- Tominaga T., Fukata J., Hayashi Y. et al.* Distribution and characterization of immunoreactive corticostatin in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Endocrinology*. 1992. Vol. 130, N3. P. 1593—1598.
- Tomita M., Takase M., Wakabayashi H., Bellamy W.* Antibacterial peptides of lactoferrin // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994. Vol. 357. P. 209—218.
- Tossi A., Scocchi M., Skerlavaj B., Gennaro R.* Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 339. P. 108—112.
- Tryselius Y., Samakovlis C., Kimbrell D. A., Hultmark D.* CecC, a cecropin gene expressed during metamorphosis in *Drosophila* pupae // *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 204. P. 395—399.
- Valore E., Ganz T.* Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells // *Blood*. 1992. Vol. 79, N6. P. 1538—1544.
- Van Wetering S., Mannesse-Lazeroms S., Van Sterkenburg M. et al.* Effect of defensins on interleukin-8 synthesis in airway epithelial cells // *Amer. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. P. L888—L896.
- Verbanac D., Zanetti M., Romeo D.* Chemotactic and protease-inhibiting activities of antibiotic peptide precursors // *FEBS Lett.* 1993. Vol. 317. P. 255—258.
- Viljanen P., Koski P., Vaara M.* Effect of small cationic leukocyte peptides (defensins) on the permeability barrier of the outer membrane // *Infect. and Immun.* 1988. Vol. 56, N9. P. 2324—2329.
- Von der Mohlen M. A. M., Kimmings A. N., Wedel N. I. et al.* Inhibition of endotoxin-induced cytokine release and neutrophil activation in humans by use of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein // *J. Infect. Diseases*. 1995a. Vol. 172. P. 144—151.
- Von der Mohlen M. A. M., Van Deventer S. J. H., Levi M. et al.* Inhibition of endotoxin-induced activation of the coagulation and fibrinolytic pathways using a recombinant endotoxin-binding protein (rBP123) // *Blood*. 1995b. Vol. 85. P. 3437—3443.
- Von Hofsten P., Faye I., Kockum K. et al.* Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1985. Vol. 82. P. 2240—2243.
- Vunnam S., Juvvadi P., Merrifield R. B.* Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine // *J. Pept. Res.* 1997. Vol. 49, N1. P. 59—66.
- Wade D., Boman A., Wahlin B. et al.* All D-amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 4761—4765.
- Wade D., Andreu D., Mitchell S. A. et al.* Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1992. Vol. 40. P. 429—436.
- Waksman Y., Golde D. W., Savion N., Fabian I.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances cationic antimicrobial protein synthesis by human neutrophils // *J. Immunol.* 1990. Vol. 144. P. 3437—3443.
- Walton E.* The preparation, properties and action on *Staphylococcus aureus* of purified fractions from the cationic proteins of rabbit polymorphonuclear leukocytes // *Brit. J. Exp. Pathol.* 1978. Vol. 59. P. 416—431.
- Walton E., Gladstone G. P.* Factors affecting the susceptibility of staphylococci to killing by the cationic proteins from rabbit polymorphonuclear leukocytes: the effects of alteration of cellular energetics and of various ion compounds // *Brit. J. Exp. Pathol.* 1976. Vol. 57. P. 560—570.
- Wang D., Pabst K. M., Aida Y., Pabst M. J.* Lipopolysaccharide-inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin // *J. Leukocyte Biol.* 1995. Vol. 57. P. 865—874.
- Wasi S., Movat H.* Phlogistic substances in neutrophil leukocyte lysosomes their possible role in vivo and their in vivo properties // *Curr. Top. Pathol.* 1979. Vol. 68. P. 213—237.
- Watson R. W. G., Redmond H. P., Bouchier-Hayes D.* Role of endotoxin in mononuclear phagocyte-mediated inflammatory responses // *J. Leukocyte Biol.* 1994. Vol. 56. P. 95—103.
- Weersink A. J., Van Kessel K. P., Van den Tol M. E. et al.* Human granulocytes express a 55 kDa lipopolysaccharide-binding protein on the cell surface that is identical to the bactericidal/permeability-increasing protein // *J. Immunol.* 1993. Vol. 150. P. 253—263.
- Weil S. C., Rosner G. L., Reid M. S. et al.* cDNA cloning of human myeloperoxidase: Decrease of myeloperoxidase mRNA upon induction of HL-60 cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1987. Vol. 84. P. 2057—2061.
- Weinberg E. D.* Iron withholding: a defense against infection and neoplasia // *Phys. Revs.* 1984. Vol. 64, N1. P. 65—102.
- Weintraub B. U., Klickstein L. B., Dzau V. J., Watt K. W.* Granulocyte angiotensin system: identification of angiotensin as the plasma protein substrate of leukocyte cathepsin G // *Biochemistry*. 1984. Vol. 23. P. 227—232.
- Weinrauch Y., Foreman A., Shu C. et al.* Extracellular accumulation of potentially microbicidal bactericidal/permeability-increasing protein and p15s in an evolving sterile rabbit peritoneal inflammatory exudate // *J. Clin. Invest.* 1995. Vol. 95. P. 1916—1924.
- Weinrauch Y., Elsbach P., Madsen L. M. et al.* The potent anti-*Staphylococcus aureus* activity of a sterile rabbit inflammatory fluid is due to a 14 kDa phospholipase A // *J. Clin. Invest.* 1996. Vol. 97. P. 250—257.
- Weiss J.* Tissue destruction by neutrophils // *N. Engl. J. Med.* 1989. Vol. 320, N6. P. 365—376.

Weiss J., Elsbach P. The use of a phospholipase A-less *Escherichia coli* mutant to establish the action of granulocyte phospholipase A on bacterial phospholipids during killing by a highly purified granulocyte fraction // *Biochim. et biophys. acta.* 1977. Vol. 466. P. 23—33.

Weiss J., Olsson I. Cellular and subcellular localization of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils // *Blood.* 1987. Vol. 69. P. 652—659.

Weiss J., Wright G. Mobilization and function of extracellular phospholipase A2 in inflammation // *Phospholipases A2.* New York, 1990.

Weiss J., Franson R. C., Beskerdite-Quagliata S. et al. Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increase permeability of *Escherichia coli* // *J. Clin. Invest.* 1975. Vol. 55. P. 33—42.

Weiss J., Franson R., Schmeidler K., Elsbach P. Reversible envelope effects during and after killing of *Escherichia coli* by a highly purified rabbit polymorphonuclear leukocyte fraction // *Biochim. et biophys. acta.* 1976. Vol. 1436. P. 154—169.

Weiss J., Elsbach P., Olsson I., Odeberg H. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes // *J. Biol. Chem.* 1978. Vol. 253, N8. P. 2664—2672.

Weiss J., Beckerdite-Quagliata S., Elsbach P. Determinants of the action of phospholipases A on the envelope phospholipids of *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 11 010—11 014.

Weiss J., Beckerdite-Quagliata S., Elsbach P. Resistance of gram-negative bacteria to purified bactericidal leukocyte proteins. Relation to binding and bacterial lipopolysaccharide structure // *J. Clin. Invest.* 1980. Vol. 65. P. 619—628.

Weiss J., Stendahl O., Elsbach P. O₂-independent killing of gram-negative bacteria by intact granulocytes: the role of a potent bactericidal membrane-perturbing protein // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1982a. Vol. 141. P. 129—137.

Weiss J., Victor M., Cross A. S., Elsbach P. Sensitivity of K1-encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal/permeability-increasing protein of rabbit and human neutrophils // *Infect. and Immun.* 1982b. Vol. 38. P. 1149—1153.

Weiss J., Victor M., Stendahl O., Elsbach P. Killing of gram-negative bacteria by polymorphonuclear leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1982c. Vol. 69. P. 959—970.

Weiss J., Victor M., Elsbach P. Role of charge and hydrophobic interactions in the action of the bactericidal/permeability-increasing protein of neutrophils on gram-negative bacteria // *J. Clin. Invest.* 1983. Vol. 71. P. 540—549.

Weiss J., Muello K., Victor M., Elsbach P. The role of lipopolysaccharides in the action of the bactericidal/permeability-increasing neutrophil protein on the bacterial envelope // *J. Immun.* 1984. Vol. 132. P. 3109—3115.

Weiss J., Kao L., Victor M., Elsbach P. Oxygen-independent intracellular and oxygen-dependent extracellular killing of *Escherichia coli* S15 by human polymorphonuclear leukocytes // *J. Clin. Invest.* 1985. Vol. 76. P. 206—212.

Weiss J., Hutzler M., Kao L. Environmental modulation of lipopolysaccharide chain length alters the sensitivity of *Escherichia coli* to the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein // *Infect. and Immun.* 1985. Vol. 51. P. 594—599.

Weiss J., Kao L., Victor M., Elsbach P. Respiratory burst facilitates the digestion of *Escherichia coli* killed by polymorphonuclear leukocytes // *Infect. and Immun.* 1987. Vol. 55. P. 2141—2147.

Weiss J., Wright G., Bekkers A. C. et al. Conversion of pig pancreas phospholipase A2 by protein engineering into enzyme active against *Escherichia coli* treated with the bactericidal/permeability increasing protein // *J. Biol. Chem.* 1991. Vol. 266. P. 4162—4167.

Weiss J., Elsbach P., Shu C. et al. Human bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by the bacteria // *J. Clin. Invest.* 1992. Vol. 90. P. 1122—1130.

Weiss J., Inada M., Elsbach P., Crowl R. M. Structural determinants of the action against *Escherichia coli* of a human inflammatory fluid phospholipase A2 in concert with polymorphonuclear leukocytes // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 26 331—26 337.

Weiss S. J., Young J., LoBuglio A. et al. Role of hydrogen peroxide in neutrophil mediated destruction of cultured endothelial cells // *J. Clin. Invest.* 1981. Vol. 68. P. 714—721.

Weiss S. J., Peppin G., Ortiz X. et al. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils // *Science.* 1985. Vol. 227. P. 747—749.

Westbrook E. M., Lehrer R. I., Selsted M. E. Characterization of two crystal forms of neutrophil cationic protein NP-2, a naturally broad-spectrum antimicrobial agent from leukocytes // *J. Mol. Biol.* 1984. Vol. 178. P. 783—785.

Westerhoff H. V., Hendler R. W., Zasloff M., Juretic D. Interactions between a new class of eucaryotic antimicrobial agents and isolated rat liver mitochondria // *Biochim. et biophys. acta.* 1989a. Vol. 975. P. 361—369.

Westerhoff H. V., Juretic D., Hendler R. W., Zasloff M. Magainin and the disruption of membrane-linked free-energy transduction // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1989b. Vol. 86. P. 6597—6601.

Wieprecht T., Dathe M., Beyermann M. et al. Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36, N20. P. 6124—6132.

Wilde C. G., Seilhamer J. J., McGrogan M. et al. Bactericidal/permeability-increasing protein and lipopolysaccharide (LPS) binding protein: LPS binding properties and effects on LPS-mediated cell activation // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 17 411—17 416.

Wilson C. B. Immunological basis for increased susceptibility of the neonate to infection // *J. Pediatr.* 1986. Vol. 108, N1. P. 1—12.

Wilson L., Spitznagel J. K. Molecular and structural damage to *Escherichia coli* produced by antibody, complement and lysozyme systems // *J. Bacteriol.* 1968. Vol. 96. P. 1339—1348.

Winterbourn C. C. Myeloperoxidase as an effective inhibitor of hydroxyl radical production implications for the oxidative reactions of neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1986. Vol. 78, N2. P. 545—550.

Winterbourn C. C., Garcia R. C., Segal A. W. Production of the superoxide adduct of myeloperoxidase (compound III) by stimulated human neutrophils and its reactivity with hydrogen peroxide and chloride // *Biochem. J.* 1985. Vol. 228. P. 583—592.

Wright C. D., Nelson R. D. Candidacidal activity of myeloperoxidase: therapeutic influence of the enzyme in vivo // *Infect. and Immun.* 1985. Vol. 47, N2. P. 363—365.

Wright C. D., Nelson R. D. Candidacidal activity of myeloperoxidase: Characterization of myeloperoxidase-yeast complex formation // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1988. Vol. 154. P. 809—817.

Wright C. D., Bowie J. U., Gray G. R., Nelson R. D. Candidacidal activity of myeloperoxidase: Mechanisms of inhibitory influence of soluble cell wall mannan // *Infect. and Immun.* 1983. Vol. 42. P. 76—80.

Wright C. D., Bowie J. U., Nelson R. D. Influence of yeast mannan on release of myeloperoxidase by human neutrophils: Determination of structural features required for formation of myeloperoxidase-mannan-neutrophil complex // *Infect. and Immun.* 1984a. Vol. 43. P. 467—471.

Wright C. D., Herron M. J., Gray G. R. et al. Influence of yeast mannan on human neutrophil function: inhibition of release of myeloperoxidase related to carbohydrate-binding property of the enzyme // *Infect. and Immun.* 1984b. Vol. 43. P. 472—476.

Wright G. C., Ooi C. E., Weiss J., Elsbach P. Purification of a cellular (granulocyte) and an extracellular (serum) phospholipase A2 that participate in the destruction of *Escherichia coli* in a rabbit inflammatory exudate // *J. Biol. Chem.* 1990a. Vol. 265. P. 6675—6681.

Wright G. C., Weiss J., Kim S. K. et al. Bacterial phospholipid hydrolysis enhances the destruction of *Escherichia coli* ingested by rabbit neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1990b. Vol. 85. P. 1925—1935.

Wright J., Yoshimoto S., Offner G. D. et al. Structural characterization of the isoenzymatic forms of human myeloperoxidase // *Biochim. et biophys. acta.* 1987. Vol. 915. P. 68—76.

Wright S. D., Tobias P. S., Ulevitch R. J., Ramos R. A. Lipopolysaccharide (LPS) Binding Protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages // *J. Exp. Med. (USA).* 1989. Vol. 170. P. 1231—1241.

Wu N. C., Schultz J. The prosthetic group of myeloperoxidase // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 60, N 1. P. 141—144.

Xanthopoulos K. G., Lee J. Y., Gan R. et al. The structure of the gene for cecropin B, an antibacterial immune protein from *Hyalophora cecropia* // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 172. P. 371—376.

Yamada K., Natori S. Purification, sequence and antibacterial activity of two novel sapecin homologues from *Sarcophaga* embryonic cells: similarity of sapecin B to charybdotoxin // *Biochem. J.* 1993. Vol. 291. P. 275—279.

Yamamoto K., Miyoshikoshio T., Utsuki Y. et al. Virucidal activity and viral protein modification by myeloperoxidase: a candidat for defense factor of human polymorphonuclear leukocytes against *Influenza* virus infection // *J. Infect. Diseases.* 1991. Vol. 164, N 1. P. 8—14.

Yamashita T., Saito K. Purification, primary structure and biological activity of guinea pig neutrophil cationic peptides // *Infect. and Immun.* 1989. Vol. 57, N 8. P. 2405—2409.

Yamauchi K., Tomita M., Giehl T. J., Ellison R. T. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment // *Infect. and Immun.* 1993. Vol. 61. P. 719—728.

Yasin B., Harwig S.S., Lehrer R.I., Wagar E.A. Susceptibility of *Chlamydia trachomatis* to protegrin and defensins // *Infect. and Immun.* 1996. Vol. 64, N 3. P. 709—713.

Yomigida S., Nagaoka I., Saito K., Yamashita T. Evaluation of the effects of defensins on neutrophil functions // *Inflamm. Res.* 1996. Vol. 45, N 1. P. 62—67.

Yoo Y.-Ch., Watanabe S., Watanabe R. et al. Bovine lactoferrin and lactoferricin, a peptide derived from bovine lactoferrin inhibit tumor metastasis in mice // *Jap. J. Cancer Res.* 1997. Vol. 88. P. 184—190.

Young J. D.-E., Peterson C. G. B., Venge P., Cohn Z. A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein // *Nature.* 1986. Vol. 321. P. 613—616.

Zagulski T., Lipinski P., Zagulska A. et al. Lactoferrin can protect mice against a lethal dose of *Escherichia coli* in experimental infection in vivo // *Brit. J. Exp. Pathol.* 1989. Vol. 70. P. 697—704.

Zanetti M., Litteri L., Gennaro R. et al. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules // *J. Cell Biol.* 1990. Vol. 111. P. 1363—1371.

Zanetti M., Litteri L., Griffiths G. et al. Stimulus-induced maturation of probactenecins, precursors of neutrophil antimicrobial polypeptides // *J. Immunol.* 1991. Vol. 146. P. 4295—4300.

Zanetti M., Del Sal G., Storici P. et al. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a prosequence homologous to a cystein proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 522—526.

Zanetti M., Storici P., Tossi A. et al. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269. P. 7855—7858.

Zanetti M., Gennaro R., Romeo D. Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 374. P. 1—5.

Zang G., Wu H., Shi J. et al. Molecular cloning and tissue expression of porcine β -defensin-1 // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 424, N 1. P. 37—40.

Zaslhoff M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1987. Vol. 84. P. 5449—5453.

Zaslhoff M. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* 1992. Vol. 4. P. 3—7.

Zaslhoff M., Martin B., Chen H. C. Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 910—913.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Antibacterial and enzymatic basic protein from leukocyte lysosomes: separation and identification // *Science.* 1963. Vol. 142. P. 1085—1087.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins // *Science.* 1966a. Vol. 154. P. 1049—1051.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cation proteins // *Science.* 1966b. Vol. 154. P. 1059—1061.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities // *J. Bacteriol.* 1966c. Vol. 91. P. 750—754.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocytes lysosomes. II. Composition, properties and mechanism of antibacterial action // *J. Bacteriol.* 1966d. Vol. 91. P. 755—762.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity // *J. Exp. Med. (USA).* 1968. Vol. 127, N 5. P. 927—941.

Zeya H. I., Spitznagel J. K. Characterization of cationic protein-bearing granules of polymorphonuclear leukocytes // *Lab. Invest.* 1971. Vol. 24, N 3. P. 229—236.

Zeya H. I., Spitznagel J. K., Schwab J. H. Antibacterial action of PMN lysosomal cationic proteins resolved by density gradient electrophoresis // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1966. Vol. 121, N 1. P. 250—253.

Zgliczynski J. M. Characteristics of myeloperoxidase from neutrophils and other peroxidases from different cell types // *The Reticuloendothelial System.* New York, 1980. P. 255—278.

Zgliczynski J. M., Stelmazyszka T., Ostrowski W. et al. Myeloperoxidase of human leukemic leukocytes. Oxidation of amino acids in the presence of hydrogen peroxide // *Eur. J. Biochem.* 1968. Vol. 4, N 3. P. 540—547.

Zgliczynski J. M., Stelmazyszka T., Domanski J., Ostrowski W. Chloramines as intermediates of oxidative reaction of amino acids by myeloperoxidase // *Biochim. et biophys. acta.* 1971. Vol. 235, N 3. P. 419—424.

Zgliczynski J. M., Selvaraj R., Paul B. B. et al. Chlorination by myeloperoxidase- H_2O_2 -Cl-antimicrobial system at acid and neutral pH // *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1977. Vol. 154. P. 418—422.

Zhang Y., Lewis K. Fabatins: new antimicrobial plant peptides // *Fems Microbiol. Lett.* 1997. Vol. 149. N 1. P. 59—64.

Zhao C., Liu L., Lehrer R. I. Identification of a new member of the protegrin family by cDNA cloning // *FEBS Lett.* 1994. Vol. 346. P. 285—288.

Zhao C., Ganz T., Lehrer R. I. Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39 // *FEBS Lett.* 1995a. Vol. 376. P. 130—134.

Zhao C., Ganz T., Lehrer R. I. The structure of porcine protegrin genes // *FEBS Lett.* 1995b. Vol. 368. P. 197—202.

Zhao M. H., Jones S. J., Lockwood C. M. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) is an important antigen for antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) in vasculitis // *Clin. Exp. Immunol.* 1995c. Vol. 99. P. 49—56.

Zhao C., Wang I., Lehrer R. I. Widespread expression of beta-defensin hBD-I in human secretory glands and epithelial cells // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 396. P. 319—322.

Zhao C., Liaw L., Lee I. H., Lehrer R. I. cDNA cloning of three cecropin-like antimicrobial peptides (Styelins) from the tunicate, *Styela clava* // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 412. P. 144—148.

Zhu Q., Solomon S. Isolation and mode of action of rabbit corticostatic (antiadrenocorticotropin) peptides // *Endocrinology.* 1992. Vol. 130, N3. P. 1413—1423.

Zhu Q., Singh A., Bateman A. et al. The corticostatin anti-ACTH and cytotoxic activity of peptides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung // *J. Steroid Biochem.* 1987. N27. P. 1017—1423.

Zhu Q., Hu J., Mulay S. et al. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1988. N85. P. 592—596.

Zhu Q., Bateman A., Singh A., Solomon S. Isolation and biological activity of corticostatic peptides (anti-ACTH) // *Endocr. Res.* 1989. Vol. 15. P. 129—149.

Zimmerman G. R., Legault P., Selsted M. E., Pardi A. Solution structure of bovine β -defensin-12: the peptide fold of the β -defensins is identical to that of the classical defensins // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. P. 13 663—13 671.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. Антибиотические пептиды как молекулярные факторы врожденного иммунитета животных	9
1.1. Структура и антимикробные свойства дефенсинов	10
1.2. β -Дефенсины	17
1.3. Дефенсины беспозвоночных животных	21
1.3.1. Дефенсины насекомых	21
1.3.2. Дефенсины скорпионов	27
1.3.3. Дефенсины мечехвостов	27
1.3.4. Дефенсины моллюсков	28
1.4. Амебопоры — антибиотические пептиды простейших	29
1.5. Протегрины и родственные им пептиды	29
1.6. Антимикробные пептиды с одной дисульфидной связью	32
1.7. Цистеинсодержащие пептиды с большим числом S—S-связей	33
1.8. Цекропины	34
1.9. Магейнины	39
1.10. Антимикробные пептиды с высоким содержанием пролина и глицина	42
1.11. Пептидные антибиотики животных как биохимические факторы противоифекционной защиты	46
ГЛАВА 2. Бактерицидная проникаемость увеличивающий белок	55
ГЛАВА 3. Лактоферрин	62
ГЛАВА 4. Структура и функции пероксидаз фагоцитов	68
ГЛАВА 5. Серпроцидины	78
5.1. Катепсин G	78
5.2. Эластаза	80
5.3. Азуроцидин	81
ГЛАВА 6. Лизоцим	84
ГЛАВА 7. Функциональные свойства антибиотических пептидов и белков, отличные от антимикробной активности	86
7.1. Проопсоническая и хемотаксическая активности антимикробных пептидов и белков	86

7.2. Антибиотические белки и пептиды и воспалительный процесс	87
7.3. Влияние антибиотических пептидов и белков на некоторые показатели гемостаза	97
7.4. Дефенсины как медиаторы эндокринно-иммунных взаимодействий	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	107
ЛИТЕРАТУРА	113

Научное издание

Владимир Николаевич Кокряков

БИОЛОГИЯ АНТИБИОТИКОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Утверждено к печати
Научно-исследовательским институтом
экспериментальной медицины РАМН*

Редактор издательства *Л. А. Бабушкина*
Художник *А. И. Слепушкин*
Технический редактор *Е. Г. Коленова*
Корректоры *Н. И. Журавлева* и *Е. В. Шестакова*
Компьютерная верстка *Е. М. Сальниковой*

Лицензия № 020297 от 23 июня 1997 г. Сдано в набор 11.03.99.
Подписано к печати 12.07.99. Формат 60×90 1/16. Бумага офсетная.
Гарнитура таймс. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10.5. Уч.-изд. л. 13.3.
Тираж 500 экз. Тип. зак. № 3132. С 146

Санкт-Петербургская издательская фирма «Наука» РАН
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская лин., 1

Санкт-Петербургская типография «Наука» РАН
199034, Санкт-Петербург, 9 лин., 12