

57  
К597

В.Н. Кокряков

# **О**ЧЕРКИ **О** ВРОЖДЕННОМ ИММУНИТЕТЕ

**V.N. Kokryakov**

**E**SSAYS  
on INNATE  
IMMUNITY



**Saint Petersburg**  
**«NAUKA»**  
**2006**

**В.Н. Кокряков**

**О**ЧЕРКИ  
**О ВРОЖДЕННОМ**  
**ИММУНИТЕТЕ**



**Санкт-Петербург**  
**«НАУКА»**  
**2006**

УДК 577.1 : 547.96 + 612.017.11

ББК 28.07

К59

**Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете.** — СПб.: Наука, 2006. — 261 с.

ISBN 5-02-026225-0

Монография посвящена изложению современной концепции врожденного иммунитета. Врожденный иммунитет определяет резистентность животных от губок до человека к инфекционным агентам различной этиологии (бактерии, низшие грибы, вирусы). Система врожденного иммунитета включает в себя молекулярные механизмы распознавания «несвоего» (чужеродного, патогенного) и эффекторные факторы его нейтрализации и элиминации. Рассматривается концепция о патогенассоциированных молекулярных паттернах (липополисахариды, тейховые кислоты, пептидогликаны, маннаны, формилметиониловые пептиды, неметилированные по цитозину CpG пары ДНК бактерий, одно- и двуспиральные РНК вирусов) и распознающих их рецепторах (лектины, липополисахаридсвязывающий белок, рецепторы комплемента, Толл-подобные рецепторы), которая является краеугольным камнем современных представлений о врожденном иммунитете. Представлены данные о клеточно-молекулярных компонентах врожденного иммунитета, ответственных за нейтрализацию и элиминацию микроорганизмов и вирусов.

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

**Kokryakov V. N. Essays on innate immunity.** — St. Petersburg: Nauka, 2006. — 261 p.

ISBN 5-02-026225-0

The book is devoted to modern concept of innate immunity. Innate immunity of animals is responsible for their resistance to microbes and viruses. The system of innate immunity consists of mechanisms for recognition of «non-self» (foreign, pathogenic) and effector mechanisms for its elimination. Concept of pathogen-associated patterns (lipopolysaccharide, teichoic acids, peptidoglycan, mannan, formylmethionyl peptides, unmethylated CpG tandems of DNA, single and double-stranded viral RNA) and their receptors (lectins, Toll and Toll-like receptors, lipopolysaccharide binding protein etc) is discussed. Molecular and cellular factors of neutralization and elimination of infection is observed.

Рецензент академик РАН, проф. А. Д. НОЗДРАЧЕВ

*Издание осуществлено при поддержке  
Российского фонда фундаментальных исследований  
по проектам № 04-04-62046 и 03-04-49349*

ISBN 5-02-026225-0

© В. Н. Кокряков, 2006  
© Издательство «Наука», 2006

## **1. ВВЕДЕНИЕ**

Последнее десятилетие XX в. характеризовалось возрождением интереса к механизмам врожденного иммунитета. Именно эти механизмы определяют неотложное реагирование организма животных и человека на инфекцию, заключающееся в распознавании ее природы, дискриминации от «своего» и последующей элиминации патогенного начала. У позвоночных эта система иммунной защиты является также базовой, определяющей как резистентность к большинству инфекционных агентов, так и осуществляющей инструктирующую роль в реализации иммунных реакций приобретенного типа, которые протекают с участием иммуноглобулинов, В- и Т-лимфоцитов (Janeway, 1989, 1992; Fearon, Locksley, 1996).

И. И. Мечников (1903) был одним из первых, кто определил иммунитет как общую систему явлений, благодаря которым организм может выдерживать нападение болезнетворных микробов. Он осуществил сравнительно-эволюционное исследование одного из ключевых механизмов иммунитета — фагоцитоза (Мечников, 1892), что послужило основанием фагоцитарной теории иммунитета. И. И. Мечников подчеркивал, что иммунная система возникла и развивалась как совокупность механизмов организма, обеспечивающая его защиту от инфекции. В 60-е гг. XX в., благодаря исследованиям Ф. Бернета, к функциям иммунной системы стали вполне обоснованно причислять и способность организма противостоять опухолевым заболеваниям.

Зильбер (1958) определял иммунитет как совокупность всех наследственно полученных и индивидуально приобретенных организмом свойств, которые препятствуют проникновению и размножению микробов, вирусов и других патогенных агентов (патогенов), а также действию выделяемых ими продуктов. Блок наследуемых организмом механизмов, обеспечивающих резистентность к инфекции и опухолевым заболеваниям, уже в середине прошлого века определялся как «врожденный иммунитет» (Зильбер, 1958; Бойд, 1969). Менее точным является мечниковское определение этого круга ме-

ханизмов и явлений как «естественный иммунитет». В 70—80-е гг. XX в. доминировало более узкое представление об иммунитете как совокупности механизмов, морфофизиологическим носителем которых является лимфоидная система позвоночных (Петров, 1982). Механизмы «естественного иммунитета» в рамках этой парадигмы относились к доиммунным (неспецифическим) механизмам противoinфекционной резистентности (Хаитов и др., 2000). Однако в 90-е гг. были получены новые экспериментальные данные и клинические наблюдения, которые привели к возрождению концепции врожденного иммунитета (конституционального, примордиального, естественного) уже на качественно новом уровне обобщений и построений. Именно таковой она представлена в рассматриваемой монографии.

## 2. РЕКОГНОСЦИРОВОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

### 2. 1. Концепция о патогенассоциированных молекулярных паттернах и распознающих их рецепторах

Состояние резистентности животных к инфекции формируется многочисленными механизмами организма, в том числе и иммунными. Основная функция иммунной системы заключается в распознавании и ликвидации инфекционных агентов, выделяемых ими продуктов, а также уменьшении причиняемого ими вреда (Ройт и др., 2000). Иммунный ответ состоит из распознавания возбудителя или иного чужеродного материала и в развертывании цепи реакций, направленных на их устранение. В широком смысле все разнообразные формы иммунного ответа можно разделить на два типа — врожденные и приобретенные реакции. Основное различие между этими типами иммунореактивности состоит в механизмах распознавания «несвоего» (чужеродного, патогенного). Приобретенный (адаптивный) иммунитет специализируется на детекции индивидуальных структурных особенностей каждого конкретного инфекционного агента или вещества (антигенных детерминант, или эпитопов), несущих признаки генетической чужеродности (Петров, 1982), в то время как рекогносцировочные механизмы врожденного иммунитета определяют стереотипные и консервативные в эволюции молекулы микроорганизмов, присутствующие одновременно большим систематическим группам микробов. Эти молекулы получили в современной иммунологической литературе название «патогенассоциированных молекулярных паттернов», а распознающие их структуры животных клеток и жидкостей — «паттернрасознающих рецепторов (молекул)» (Janeway, 1989, 1992, 2002). Именно в свете этой концепции будут рассматриваться далее вопросы, связанные с распознаванием «несвоего» механизмами врожденного иммунитета.

В ходе эволюции у животных возникли и прошли отбор многочисленные механизмы защиты от инфекций. Ведущими среди них следует считать иммунные, для которых характерно распознавание молекулярных структур вирусов и микробных клеток, обозначенных как патогенассоциированные молекуляр-

ные паттерны (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs), специализированными рецепторами (pattern recognition receptors — PRRs) (Janeway, 1989, 1992).

Патогенассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП) представляют собой типовые макромолекулы, свойственные одновременно целым группам микроорганизмов (липид А липополисахаридов грамотрицательных бактерий, пептидогликаны клеточной стенки бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, формилметиониловые пептиды как N-концевые фрагменты синтезируемых бактериями белков, белок бактериальных жгутиков флагеллин, неметилованные по цитозину CpG пары ДНК микроорганизмов, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов). Это, как правило, консервативные в эволюции в структурном отношении молекулы, выполняющие стереотипные жизненноважные функции микроорганизмов и вирусов. В силу этого возможные изменения в этих структурах резко снижают жизнеспособность микробов, а поэтому не закрепляются в эволюции естественным отбором. Необходимо также подчеркнуть, что большинство рассматриваемых ПАМП свойственны миру микроорганизмов (бактерии, низшие грибы, простейшие) и вирусов. По их избирательному узнаванию паттерн-распознающими рецепторами (ПРР) осуществляется одноактная точная дискриминация инфекционного «несвоего» (nonself) от неинфекционного «своего» (self) (Janeway, 1992, 2002). Как это ни кажется, на первый взгляд, парадоксальным рассматриваемая система различения «несвоего» (чужеродного) от «своего» механизмами врожденного иммунитета является часто не менее эффективной, чем основанная на детекции антигенов рецепторами В- и Т-лимфоцитов позвоночных животных. Взаимодействие ПАМП с ПРР однозначно детектирует инфекционную (патогенную) природу первых, что далеко не всегда имеет место при более аффинных взаимодействиях рецепторов В- и Т-лимфоцитов (BCR, TCR) с антигенами.

ПАМП (табл. 1) являются инвариантными (консервативными) макромолекулами различной химической природы, как то: липид А липополисахаридов, липотейхоевые кислоты, пептидогликаны, терминально локализованные в гликолипидах, полисахаридах и гликопротеинах остатки D-маннозы и L-фукозы, формилметиониловые пептиды, флагеллин, неметилованные по цитозину CpG пары ДНК бактерий, двуспиральные и односпиральные РНК вирусов. Они детектируются ПРР (молекулами) клеток иммунной системы животных, что обеспечивает запуск эффекторных (нейтрализующих и элиминирующих патогены) механизмов врожденного иммунитета. ПРР (молекулы) могут быть представлены как гуморальными (маннозосвязывающий лектин, липополисахаридсвязывающий белок, пептидогликанраспознающие белки,

Таблица 1

**Патогенассоциированные молекулярные паттерны и распознающие их рецепторы**

Наименование паттерна	Носитель паттерна	Лиганд, распознаваемый рецептором	Паттернраспознающий рецептор	Форма иммунного реагирования на паттерн
Пептидогликан	Бактерии	Неидентифицирован, возможно мурамилпептиды	ТПР2 в кооперации с ТПР6 у млекопитающих	Продукция иммунными клетками (макрофагами) провоспалительных цитокинов
Липопротеины	Эубактерии	NH <sub>2</sub> -концевой трипальмитилированный цистеин	ТПР2	Инициация воспаления
Липотейхоевые кислоты	Грамположительные бактерии	Неидентифицирован	ТПР2	То же
Липополисахариды	Грамотрицательные бактерии	Липид А	ТПР4, ЛСБ, CD14, сквенджер рецептор	Продукция иммунными клетками провоспалительных цитокинов, эндоцитоз липополисахаридов, несопровождаемый воспалительными проявлениями
Неметилированные по цитозину CpG повторы ДНК	Бактерии	Неметилированные по цитозину олигонуклеотиды в CpG повторах	ТПР9	Инициация воспаления

Наименование паттерна	Носитель паттерна	Лиганд, распознаваемый рецептором
Липоарабоманнан	Микобактерии	Неидентифицирован
N-формилметгониловые пептиды	Бактерии	NH <sub>2</sub> -концевой формилметгонин в синтезирующихся белках
Флагеллин	Жгутики бактерий	Неидентифицирован
Маннаны и маннанопротеиды	Низшие грибы	D-манноза
Двуспиральные РНК	Вирусы	Неидентифицирован

Таблица 1 (продолжение)

Паттернраспознающий рецептор	Форма иммунного реагирования на паттерн
ТПР2, CD1	Инициация воспаления. Представление гликолипида $\alpha\beta$ T-лимфоцитам
fMet R1 fMet R2	Хемотаксис и усиление секреторной активности нейтрофилов, моноцитов
ТПР5	Инициация воспаления
ТПР2, маннозный рецептор, МСЛ	Опсонизация, усиление фагоцитоза и воспалительного ответа, активация системы комплемента
ТПР3	Продукция иммунными клетками интерферонов $\alpha$ и $\beta$

компоненты системы комплемента, антибиотические пептиды и белки), так и клеточносвязанными молекулами (рецепторы комплемента, макрофагальный маннозный рецептор, Толл-подобные рецепторы, NOD белки, скавенджер рецепторы). Рассматривая эволюционное происхождение этих молекул, необходимо отметить, что многие из них или их предковые формы имеют отношение к морфогенетическим процессам (резорбция, метаморфоз, апоптоз), а их участие в иммунных реакциях формируется в результате межмолекулярных взаимодействий в каждой конкретной ситуации, связанной с необходимостью обеспечения стерильности внутренней среды животного организма. Наряду с этим ряд эффекторных механизмов иммунной системы осуществляет поддержание оптимального развития микробиоты (нормальной микрофлоры) на уровне слизистых оболочек и покровов животных (Voman, 1995, 1998, 2000). Все эти моменты важно учитывать при анализе функциональных проявлений системы врожденного иммунитета в онтогенезе и эволюции животного мира. Эта древняя, но далеко не примитивная система детектирования патогенного («несвоего» и измененного «своего», например, при апоптозе) является базовой и в противои инфекционном иммунитете позвоночных. Она обеспечивает как эффективность элиминационных механизмов врожденного иммунитета, так и адекватную (протективную) направленность реакций приобретенного (адаптивного) иммунитета (Janeway, 2002).

Параллельно системе ПРР в организме животных развивалась система межклеточных взаимодействий, базирующаяся на адгезионных молекулах. Последние играют не только важную роль в морфогенетических процессах многоклеточных животных, но и в становлении у них ряда реакций иммунной защиты.

## **2. 2. Молекулы клеточной адгезии в иммунитете животных**

Межклеточная и клеточно-субстратная формы адгезии лежат в основе формирования тканей (морфогенеза) и обеспечивают отдельные стороны иммунных реакций животного организма. Адгезия, или прилипание, определяет организацию эпителиев и их взаимодействие с базальной мембраной. Это примеры стабильных клеточно-клеточных и клеточно-субстратных форм адгезии соответственно. В иммунной системе подобные взаимодействия часто носят преходящий характер. Межклеточная адгезия клеток крови, а также клеток крови к другим клеткам, инфекционным организмам и межклеточному матриксу имеет место при фагоцитозе и воспалении в заметных масштабах. У беспозвоночных клетки крови благодаря адгезии формируют капсулы вокруг

крупных паразитов и узелки (nodules) в областях скопления микроорганизмов. Рецепторы и лиганды, участвующие в адгезии, интенсивно изучаются. Основные классы веществ, обеспечивающие рассматриваемый процесс у животных представлены в табл. 2 (Johansson, 1999).

Есть основания рассматривать интегрины в качестве наиболее древней в эволюции группы адгезионных молекул, некоторые из которых обеспечивают отдельные стороны клеточно-клеточных и клеточно-эндотелиальных взаимодействий, важных в реализации иммунных реакций организма (Kishimoto et al., 1999). Интегрины являются двусубъединичными белками, ассоциированными с цитоплазматической мембраной эукариотических клеток. Интегрины  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  участвуют в фагоцитозе патогенов и клеточного дебриса, опсонизированных фибронектином и (или) витронектином (Blystone, Brown, 1999). Как правило, поглощение этих объектов важно при поступлении второго сигнала, формируемого в экспериментальных условиях при активации протенинказы фибриновыми эфирами (Blystone et al., 1994). Лигирование интегрин  $\alpha_v\beta_3$  в нейтрофилах активирует FcR-опосредованный фагоцитоз и продукцию активных форм кислорода клеткой (Senior et al., 1992). Необходимо отметить, что лиганды интегринов, несмотря на свое структурное разнообразие, часто содержат последовательность из 3 аминокислот — аргинин, глицин, аспарагиновая кислота (RGD), или мотив адгезии, который распознается интегринными. В связи с этим в экспериментальных условиях очень часто синтетические RGD-содержащие пептиды проявляют в зависимости от постановки опытов либо свойства агонистов, либо ингибиторов лигандов интегринов (Johansson, 1999).

У беспозвоночных роль адгезионных молекул наиболее обстоятельно изучена при исследовании развития нервной системы *Drosophila melanogaster* (Hortsch, Goodman, 1991) и морфогенеза нематоды *Caenorhabditis elegans* (Kramer, 1994). У них выявлено большинство представленных у позвоночных адгезионных рецепторов и их лигандов, за исключением селектинов. Все эти молекулы в той или иной степени участвуют в процессах адгезии, которые обеспечивают и иммунные реакции беспозвоночных. Наряду с ними у некоторых беспозвоночных выявлены такие молекулы как пероксинектин и пептид распластывания (spreading) плазмоцитов, которые также участвуют в адгезионных процессах.

У разных раков достаточно хорошо изучена система адгезионных молекул и их роль в иммунитете (Johansson, 1999). Речь, в частности, идет о белках клеток крови рака *Pacifastacus leniusculus*. У них открыт белок пероксинектин, являющийся одним из лигандов адгезионных взаимодействий. Его молекулярная масса составляет около 76 кДа, и он ответственен за адгезию и распластывание клеток крови рака (Johansson, Soderhäll, 1988). В со-

## Основные семейства молекул клеточной адгезии

Семейство рецепторов клеточной адгезии	Лиганды	Функциональная роль
Кадхерины	Кадхерины	Осуществляют стабильную тканеспецифическую межклеточную адгезию
Суперсемейство иммуноглобулинов NCAM IL-1R	Интегрины, представители IgG семейства, ИЛ-1	Обеспечивают клеточно-эндотелиальную адгезию, клеточно-клеточную адгезию, активацию синтеза острофазовых белков
Интегрины	Молекулы внеклеточного матрикса, плазменные белки, представители IgG семейства	Лежат в основе клеточно-матриксной адгезии, лейкоцитарно-эндотелиальной адгезии, агрегации тромбоцитов, хоминга лимфоцитов
Селектины	Сахара	Движение (перемещение, роллинг) лейкоцитов по эндотелиальной поверхности

стве этого белка есть существенный по размерам домен, гомологичный по структуре и функции миелопероксидазе позвоночных. Таким образом, молекула пероксинектина сочетает в себе свойства адгезионных и пероксидазных белков (Johansson et al., 1995). В С-концевой области пероксинектина, в составе его пероксидазного домена, имеется KGD (лизин, глицин, аспарагиновая кислота) последовательность, которая предположительно участвует в адгезии и в связывании с интегринами. Пероксинектин стимулирует процессы инкапсуляции и фагоцитоза. Как адгезионная, так и пероксидазная активности пропероксинектина после его секреции из клеток активируются в присутствии липополисахаридов или  $\beta$ -1,3-гликанов, что связывают с действием сериновых протеиназ на пропероксинектин. Интегрин является, по-видимому, рецептором пероксинектина. Кроме интегрина, пероксинектин может связываться еще и с другими белками клеточной поверхности (Johansson et al., 1999). К последним принадлежит, в частности (Cu, Zn)-супероксиддисмутаза, являющаяся поверхностным, нетрансмембранным белком цитоплазматической мембраны. Взаимодействие двух белков может быть особенно важным в случае продукции антимикробных производных.

Пероксинектин-подобные белки выявлены и у других членистоногих. Из клеток крови креветки *Penaeus monodon* выделена кДНК на 78 % идентичная ДНК пероксинектина рака. В ее составе есть последовательность нуклеотидов, кодирующая RLKKGDR последовательность, полностью гомологичную в сравниваемых белках. 80 кДа белок из клеток берегового краба *Carcinus maenas* и 90 кДа белок таракана *Blaberus craniifer* также сходны с пероксинектином структурно и функционально, стимулируя адгезию и фагоцитоз. Из клеток дрожифилы также выделена кДНК, ответственная за синтез предполагаемой пероксидазы. Кроме того, у нее известен 170 кДа белок внеклеточного матрикса, имеющий пероксидазный, Ig-подобный, лейцин-богатый и проколлаген-богатый домены (Nelson et al., 1994). У круглого червя *C. elegans* также обнаружены гомологичные пероксидазные последовательности.

Для миелопероксидазы (МПО) человека также продемонстрирована способность поддерживать клеточно-молекулярную адгезию (Johansson et al., 1997) моноцитов и нейтрофилов, но не недифференцированных клеток линии HL-60. Адгезивным рецептором для МПО предположительно является  $\alpha\text{M}\beta_2$  интегрин (CD11b/CD18, или Mac-1, или рецептор комплемента третьего типа CR3).

Предполагается, что за рассматриваемые свойства МПО ответственна последовательность KLRDGDRFWWE, гомологичная соответствующему фрагменту молекулы пероксинектина. Есть основания предполагать, что секретируемая нейтрофилами МПО является эндогенным лигандом его  $\alpha\text{M}\beta_2$  интегрина. Это предположение поддерживается наблюдением, в котором установлена способность антител к МПО человека подавлять адгезию цитокин-примированных нейтрофилов на пластике и коллагене (Ehrenstein et al., 1992). Не исключено, что взаимодействие пероксидаз с интегринами имеет место уже у первых многоклеточных животных — губок, так как у них обнаружены и интегрины (Brower et al., 1997) и пероксидазы.

Интегрины беспозвоночных вовлечены в такие иммунные реакции как инкапсуляция и формирование узелков (nodules). Это положение поддерживается опытами с RGD-пептидами на членистоногих, моллюсках и иглокожих. RGD-пептиды подавляют клеточное распластывание, инкапсуляцию, агрегацию и формирование узелков.

У беспозвоночных известно еще несколько типов белковых молекул, которые способствуют клеточно-клеточной и клеточно-субстратной адгезии. Это, например, 18 кДа гемагглютинин клеток крови мечехвоста *Limulus polyphemus* (Fujii et al., 1992). Этот агглютинирующий агрегационный фактор имеет структурную гомологию с 22 кДа белком внеклеточного матрикса человека — дерматопонтином. Гемоцитин из клеток крови шелкопряда

*Bombus mori* также запускает агрегацию клеток крови, т. е. является геммагглютинином. Этот белок содержит домен, сходный с таковым фактора Ван Виллибрандта, который участвует в гемостазе у млекопитающих, а также область подобную лектину С-типа.

Другой тип адгезионных молекул, известных как селектины, выявлен у позвоночных животных. Селектины в своей структуре содержат лектиновый EGF-подобный (epithelial growth factor) и CRP-подобный (complement regulatory protein) домены. Они связывают клеточноассоциированные сахара — лиганды — и инициируют преходящие начальные взаимодействия клеток крови, мигрирующих в очаги воспаления, с эндотелием. Активация клеточной адгезии может иметь место только при синтезе определенных адгезионных молекул и (или) их переносе на поверхность взаимодействующих клеток. Адгезионные рецепторы могут быть активированы по так называемому «inside-out signaling» пути, по которому цитоплазматические факторы, взаимодействуя с цитоплазматическими доменами рецепторов, активируют внеклеточные лигандсвязывающие сайты последних. Так, например, осуществляется увеличение аффинитета интегринов тромбоцитов к фибриногену, достигаемое специфическими агонистами, которые инициируют рассматриваемый процесс на уровне цитоплазмы тромбоцитов (Hughes, Plaff, 1998).

Необходимо подчеркнуть, что многие адгезионные молекулы (кадхерины, интегрины, селектины и Ig-подобные белки) участвуют в морфогенетических процессах, а их вовлечение в иммунные реакции является частным проявлением этой важной функции. И хотя, как правило, эти молекулы не участвуют непосредственно в распознавании ПАМП, тем не менее они обеспечивают возможность мобилизации клеток иммунной системы в области проникновения микроорганизмов. В этом заключается их важная функциональная роль в обеспечении иммунных реакций у животных (Johansson, 1999). Именно экспрессия адгезионных молекул на клетках иммунной системы, эндотелии и эпителиях в значительной степени способствует неотложному характеру мобилизации противoinфекционных механизмов врожденного иммунитета животных.

### 2. 3. Суперсемейство скавенджер рецепторов

Скавенджер рецепторы (СР) представляют собой группу мембранассоциированных рецепторов, которые участвуют не только в обеспечении удаления (клиренса) структурно модифицированных и функционально неполноценных молекул внутренней среды животного организма, но и в детекции некоторых патогенассоци-

ированных молекулярных паттернов. СР широко распространены в природе, их структурно-функциональные свойства изучены у многих представителей животного мира. Они подразделяются на А, В и С классы. Первый класс был известен уже в 1979 г. (Goldstein et al., 1979), он включает в себя следующих основных представителей: SR-AI, SR-AII (Kriger et al., 1993) и MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) (Eloma et al., 1995). Первоначально была описана способность этих рецепторов распознавать химически модифицированные липопропротеиды низкой плотности (ЛПНП), в дальнейшем набор изученных лигандов для этих рецепторов расширился. Эти лиганды являются, как правило, полианионными соединениями (ацетилированные или окисленные ЛПНП, полиинозиновая и полигуаниловая кислоты, малеилированный бычий сывороточный альбумин, фукоидан, декстран сульфат, каррагенан, фосфатидилсерин и поливинилсульфат) (Emi et al., 1993). Из микробных компонентов лигандами СР являются липид А липополисахаридов (Hampton et al., 1991) и липотейхоевые кислоты (Danne et al., 1994). Связывание липополисахаридов (ЛПС) с СР является одним из механизмов удаления из внутренней среды животных эндотоксинов, не сопровождаемого освобождением провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12). Рецептор MARCO способен связывать напрямую неопсонизированные грамположительные (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательные (*Escherichia coli*) бактерии, опосредуя, таким образом, их фагоцитоз.

Недавно японскими исследователями была открыта новая группа СР, подобная классу А, но отличающаяся от последнего присутствием домена, который охарактеризован как лектин С-типа — SR-CL1 (Nakamura et al., 2001). SR-CL1 в опытах *in vitro* также избирательно связывает такие бактерии, как *E. coli* и *S. aureus*.

Группу В СР представляет белок CD36. Он распознает модифицированные белки (тромбоспондин, коллаген), длинноцепочечные жирные кислоты, окислительно-модифицированные ЛПНП. CD36 молекула встречается уже на гемоцитах плодовой мушки и известна под названием *scavenger*, что в переводе с французского означает «ловец смерти». Ее роль у дрозофилы доказана пока в эмбриогенезе и апоптозе, но не в иммунитете (Franc et al., 1996). Эндцитоз микробов, опосредованный CD36, как правило, не сопряжен с продукцией провоспалительных цитокинов макрофагами.

У человека СР экспрессированы преимущественно на макрофагах и дендритных клетках и в меньшей степени на некоторых эндотелиальных клетках. Основная их функция заключается в улавливании и эндоцитировании во внутренней среде организма модифицированных молекул и апоптотических клеток (Peiser et

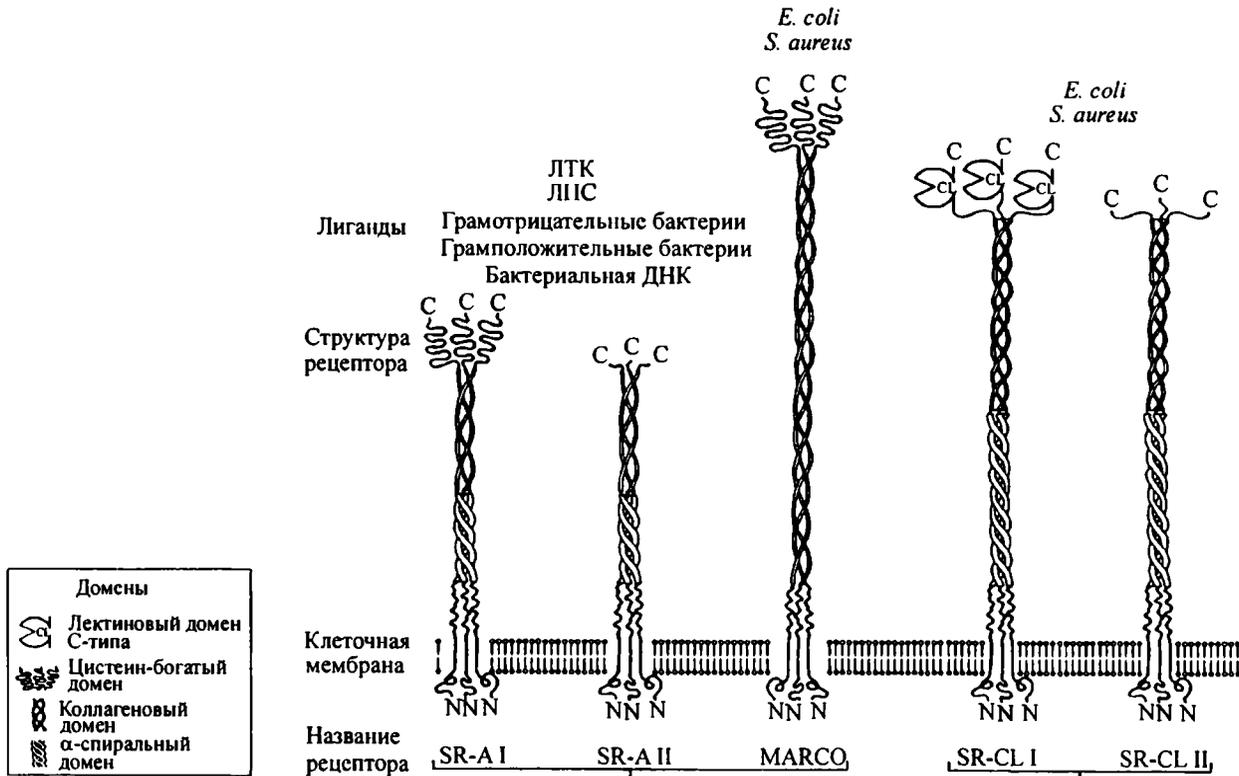


Рис. 1. Сканвджер рецепторы класса А как представители рекогносцировочного звена врожденного иммунитета.

al., 2002). В последнее время накапливаются данные об их участии и в иммунных реакциях врожденного типа. Они опосредуют связывание и фагоцитоз микроорганизмов и их компонентов (липотейхоевые кислоты — ЛТК, липополисахариды, ДНК микробов). Это дает основание некоторым исследователям считать СР одной из наиболее древних групп паттернраспознающих рецепторов, участвующих в детекции патогенассоциированных молекулярных паттернов (ЛПС, ЛТК) (Peiser et al., 2002) (рис. 1).

#### 2. 4. Структура и функциональная роль пентраксинов в реализации защитных реакций животных

Пентраксины являются семейством белков, встречающихся у беспозвоночных и позвоночных животных (Назаров, 2001; Gewurz et al., 1995). Наиболее изученными представителями этой группы соединений являются С-реактивный белок (СРБ) и сывороточный амилоид Р (САП). Характерной структурной особенностью этих белков является их олигомерное строение. Олигомеры функционально полноценных белков формируются из 5 или 10 идентичных субъединиц, образующих молекулу с пентамерной радиальной симметрией. Благодаря такой организации функционально активных молекул белков СРБ и САП они получили наименование пентраксины. Особенностью пентраксинов как белков является их высокая устойчивость к протеолитическому действию (Kinoshita et al., 1992).

Все пентраксины способны к кальцийопосредованному связыванию разнообразных по химической природе лигандов. С-реактивный белок был открыт как протеин плазмы крови человека, способный высокоаффинно связывать С-полисахарид пневмококка *Streptococcus pneumoniae* (Vasta et al., 1996), в связи с чем он и получил свое название. Связывание полисахарида осуществляется через остатки фосфохолина, а не сахаров клеточной стенки бактерий. Слабее СРБ может лигировать и углеводы, такие как агар и другие галактаны. В силу этого СРБ можно рассматривать и в качестве специализированного С-лектина (Vasta et al., 1996). САП распознает в молекулах-мишенях фосфотаноламин (Hawkin et al., 1991), а не фосфохолин, а также избирательно взаимодействует с агарозой, галактозил-галактозидами, зимозаном, фосфоманнаном и сульфатированными гликозаминогликанами. В дополнение к этому, САП, очевидно, связывает ДНК и фрагменты хроматина (Pepys, Butler, 1987). Возможно, что связывание и удаление внеклеточного хроматина является одной из его физиологических функций (Breathnach et al., 1989).

СРБ также может связываться при определенных условиях с липопротеидами низкой и очень низкой плотности, а САП с рас-

творимым фибронектином, С4-связывающим белком и фиксированным iC3b.

СРБ и САП способны активировать классический путь комплемента без участия антител благодаря взаимодействию с компонентом комплемента C1q (Kaplan, Volanakis, 1974; Ying et al., 1993), что делает их реальными участниками системы механизмов врожденного иммунитета.

Из возможных углеводных лигандов, связываемых САП, наиболее изученным является метил 4,6-О(1-карбоксииэтилиден)- $\beta$ D-галактопиранозид (МО $\beta$ ДГ) — компонент агарозы. Связывание САП с МО $\beta$ ДГ опосредовано двумя ионами кальция ( $Ca^{2+}$ ). Олигомерная структура САП, включающая 10 субъединиц, обеспечивает мультивалентное, а, следовательно, высокоаффинное связывание с углеводными соединениями. Подобным же образом он связывает фосфозаноламин. Физиологическое значение этой реакции до настоящего времени неясно.

Олигомерная структура СРБ человека представляет собой пять нековалентно связанных идентичных субъединиц с молекулярной массой около 23 кДа, которые расположены радиально, образуя по периферии диск. САП человека состоит из 10 гликозилированных субъединиц с молекулярной массой в пределах 19—30 кДа каждая, формирующих два идентичных диска, которые взаимодействуют друг с другом лицевой поверхностью, обеспечивая при этом максимальные стерические условия для кальцийопосредованного связывания лигандов (Perus, Baltz, 1983). Субъединицы САП гликозилированы по аспарагину-32.

Одним из древнейших гомологов СРБ человека является белок из гемолимфы подковообразного краба *Limulus polyphemus*, известный как лимулин (Liu et al., 1994). И хотя он имеет определенную гомологию с пентраксинами позвоночных, он является, скорее всего, по своей функциональной активности С-лектином, избирательно связывающим сиаловые кислоты, которые представляют собой нормальные углеводные компоненты гликокаликса высших эукариот. Лимулин присутствует в гемолимфе мечехвостов в концентрации 6 мг/мл. Кроме того, он состоит из 6 или 12 субъединиц и формирует «диски» из 6 субъединиц, т. е. является, строго говоря, гексаксином.

Есть основания считать, что наряду с очевидным участием рассматриваемых белков в связывании и удалении (клиренсе) из животных организмов компонентов стареющих и некротических клеток (санационная функция), СРБ и САП причастны к реализации некоторых реакций врожденного иммунитета, функционируя как опсоины и активаторы классического пути комплемента (Tenpeut, Perus, 1994). Нельзя недооценивать того факта, что при инфицировании человека и животных содержание СРБ в плазме может возрастать более чем в сотни раз. При этом многофункци-

ональность одного из ведущих реактантов острой фазы (Назаров, 2001) может обеспечивать различные защитные реакции организма: связывание полисахаридов, активацию комплемента и функциональной активности нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и естественных киллеров (NK-клеток). В связи с этим представляет интерес вопрос не только о природе лигандов, но и в ряде случаев о возможных рецепторах пентраксинов в организме, который пока остается открытым, хотя предполагают участие в избирательном связывании СРБ клетками иммунной системы FcγR1 и рецептора, специфичного для СРБ (CRP-R).

## 2. 5. Лектины как молекулярные факторы рекогносцировочного звена системы врожденного иммунитета животных

### 2. 5. 1. История вопроса

За распознавание углеводовных компонентов микробных клеток и вирионов ответственна обширная группа белков, известная как лектины. Термин введен в научную литературу в 50-х гг. XX в. известным иммунологом У. Бойдом (Boyd, Shapleigh, 1954). Лектины (от лат. *legere* — различать, выбирать) — группа широ-

Таблица 3

Классификация лектинов животных

Основные группы	Зависимость активности от Ca <sup>2+</sup>	Специфичность	Особенности структуры
С-тип	Да	Разные сахара	УРД С-типа
S-тип или галектины	Нет	β-галактозиды	УРД S-типа
P-тип	»	Маннозо-6-фосфат	УРД P-типа
I-тип	»	Разные сахара	Ig-подобные домены
Пентраксины	Зависит в ряде случаев	Фосфорилхолин/ галактозиды	Мультимерная организация
Гепарин-связывающий белок	Нет	Гепарин/гепаран SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Кластеры основных аминокислот
Фиколины	Да	N-ацетил-сахара	УРД фибриногенного типа

## Классификация лектинов С-типа (С-лектинов)

Группа	Представитель	Локализация	Особенности структурной организации
I	Коровые белки протеогликана: агрекан версикан нейрокан	Внеклеточный матрикс	Большие протяженные молекулы
II	Рецепторы асиалогликопротеинов: АСГП-рецептор печени млекопитающих лектины печени курицы CD23 IgE-Fc-рецептор	Клеточная мембрана	Трансмембранные белки II типа
III	Коллектины: формирующие структуру «букета тюльпанов»: маннозосвязывающий белок А, МСЛ белок сурфактанта А формирующие структуру креста: конглютинин белок сурфактанта D	Внеклеточные белки	Олигомерная организация
IV	Селектины: Е-селектин Р-селектин L-селектин	Клеточная мембрана	Трансмембранные белки I типа
V	Рецепторы NK клеток: CD69 Ly-49 NKG2	Та же	Трансмембранные белки II типа
VI	Маннозный рецептор макрофагов	» »	Трансмембранный белок I типа
VII	Свободные УРД: панкреатический стоун белок гератома Р	Внеклеточная	Растворимые

ко распространенных в эволюции живого мира белков, участвующих в большом круге биологических процессов, были открыты Х. Штильмарком в 1888 г. в Дерптском университете. Он разработал метод выделения и описал свойства белка из клещевины *Ricinus communis*, который назвал рицином. Лектинам присуща углеводраспознающая активность, обеспечивающая избирательные межмолекулярные взаимодействия в морфогенетических процессах, частным проявлением которых можно считать и иммунные. Участие лектинов в защитных реакциях животных является основным предметом нашего рассмотрения. Анализируя обширный материал по этой группе белков, присутствующих у всех представителей животного мира, необходимо отметить, что их участие в иммунных реакциях является одним из частных проявлений их обширного функционального потенциала (Vasta et al., 1996; Weis, Drickamer, 1996). Избирательное (селективное) узнавание сахаров в составе клеточных оболочек микробов обеспечивает дискриминацию «своего» от «несвоего», определяющую точность (прицельность, локальность) инициальных стадий иммунного реагирования животных на патогены и их производные. При всем структурном разнообразии для большинства лектинов характерно присутствие глобулярного углеводраспознающего домена (carbohydrate-recognition domain — CRD), состоящего почти из 200 аминокислот. Существует несколько групп (классов) лектинов, среди которых наиболее важными являются лектины С-типа, S-типа, Р-типа, I-типа, а также пентраксины (С-реактивный белок) и гепаринсвязывающие белки (Vasta et al., 1996) (табл. 3). Для каждой из групп лектинов установлена заметная структурная гомология углеводраспознающих доменов (УРД).

Из лектинов животного генеза, участвующих в иммунных реакциях, наиболее известными являются С-лектины (табл. 4), функционирование которых предполагает обязательное участие ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ). К их числу относится в первую очередь маннозо(маннан)связывающий лектин (МСЛ, или mannose-binding lectin — MBL в англоязычной аббревиатуре) (Turner, 1996).

## 2. 5. 2. Маннозо(маннан)связывающий лектин

Маннозо(маннан)связывающий лектин (МСЛ) имеет сложную олигомерную структурную организацию, первичным компонентом которой является субъединица с молекулярной массой около 32 кДа, состоящая из четырех основных функциональных доменов (Turner, 1998; Gadjeva et al., 2001). Первый обогащен цистеиновыми остатками, участвующими в формировании четвертич-

ной структуры белка посредством образования межцепочечных дисульфидных связей. Коллагеноподобный домен играет важную роль в активации комплемента по так называемому лектиновому пути, связывая сериновые протеиназы MASP-1 и MASP-2 (MBL associated serine proteinase), которые функционально и структурно гомологичны C1r и C1s компонентам комплемента (Fujita et al., 2004). Следующий так называемый шеичный домен ответственен за стабилизацию первичного олигомера, состоящего из 3 исходных субъединиц, и связывает углеводраспознающий домен с остальной молекулой. В состав функционально полноценной молекулы МСЛ входят по разным оценкам от 3 до 6 первичных олигомеров, несущих от 9 до 18 углеводраспознающих доменов соответственно. Вследствие того, что в составе базовой субъединицы МСЛ сочетаются домены с лектиновой и коллагеновой структурами, было предложено обозначать его, а также подобные по структуре белки как коллектины (Malhotra et al., 1992; Holmskov et al., 1994). Селективное взаимодействие УРД с некоторыми поверхностно локализованными сахарами микроорганизмов обеспечивает высокоаффинный характер ( $K_d$  в пределах  $10^{-9}$ — $10^{-10}$  М) процесса распознавания патогенов (Lee et al., 1992). Основным функциональным доменом МСЛ является углеводраспознающий домен (Turner, 1998), который определяет лектиновую специфичность белка (рис. 2). Белок синтезируется клетками печени, его ген (*mbl gene*) локализован в длинном плече 10-й хромосомы человека, вблизи центромера. В его состав входят 4 экзона и 3 интрона (Madsen et al., 1995). Выявлено 2 варианта транскриптов этого гена (Naito et al., 1999).

МСЛ высокоаффинно связывает соединения, несущие в терминальном положении олигосахаров клеточной стенки микробов и вирионов остатки D-маннозы, D-N-ацетилглюкозамина, L-фукозы и D-N-ацетилманнозоамина в присутствии ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) (Epstein et al., 1996). Существенно слабее белок может также взаимодействовать с краевыми остатками D-глюкозы. Специфическое связывание рассматриваемых углеводных остатков определяется наличием у последних 2 экваториально расположенных гидроксильных групп в положениях 3 и 4, формирующих водородные связи с парами аминокислот ( $E_{185}N_{187}$  и  $E_{193}N_{205}$ ) соответственно. Каждая из гидроксильных групп связана с  $Ca^{2+}$ , играющим ключевую роль в стабилизации лиганд-белкового комплекса. Галактоза, содержащая гидроксильную ОН группу 4 в аксиальном положении, не способна образовывать подобные комплексы. Именно это обстоятельство препятствует связыванию МСЛ с гликопротеинами эукариотических клеток, терминальное положение у которых в углеводной цепочке обычно занимают галактоза, сиаловые кислоты и их производные. Необходимо подчеркнуть, что благодаря олигомерной организа-

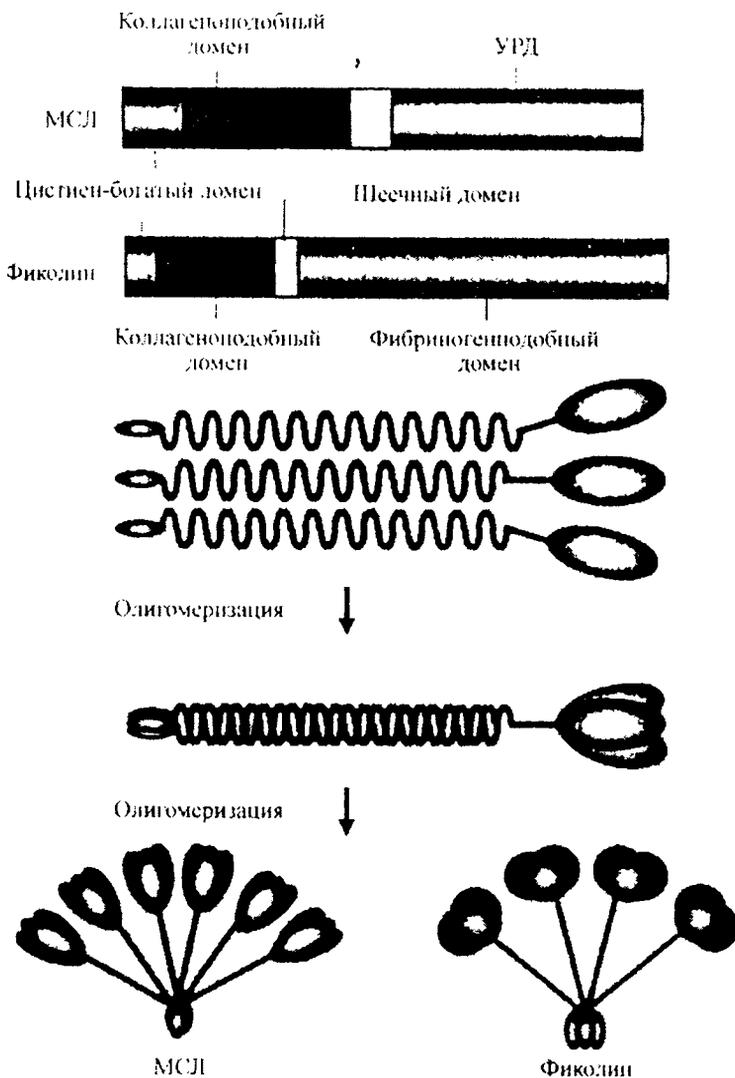


Рис. 2. Структура маннозсвязывающего лектина и фиколина (но: Fujita et al., 2004).

ции МСЛ в его состав входят как минимум 9 маннозораспознающих доменов, определяющих многоточечные (многовалентные) связи с лигандами, что и определяет высокоаффинный характер рассматриваемого лиганд-белкового взаимодействия.

МСЛ, связываясь с поверхностными структурами бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neis-*

*seria meningitidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, *C. trachomatis*), низших грибов (*Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*), простейших (*Trypanosoma cruzi*) и вирусов (human immunodeficiency virus, influenza A virus, herpes simplex virus), опсонизирует патогены, маркируя их для последующего фагоцитоза.

Комплекс патоген-МСЛ эффективно фагоцитируется лейкоцитами (моноцитами/макрофагами, нейтрофилами) благодаря наличию у них рецепторов к коллагено-подобному домену лектина. Наиболее вероятными рецепторами этого процесса являются сC1qR и C1qRp, которые также могут лигировать компонент комплемента C1q и сурфактантный белок SP-A (Kuhlman et al., 1989; Neromusceno et al., 1997). Есть свидетельства об участии в расматриваемом взаимодействии и рецептора комплемента первого типа (CR1) (Ghiran et al., 2000).

Наряду с опсонизирующей активностью, МСЛ активирует систему комплемента независимо от C1q и антител по так называемому лектиновому пути. Этот феномен был установлен в начале 90-х гг. (Matsushita, Fujita, 1992). В настоящее время расшифрованы многие звенья активации комплемента по лектиновому пути (Gadjeva et al., 2001; Fujita et al., 2004). Установлено, что в естественном комплексе с МСЛ находятся две сериновые протеиназы MASP-1 (MBL-associated serine protease-1) (Matsushita, Fujita, 1992) и MASP-2 (Thiel et al., 1997). Структурный анализ выявил высокую степень гомологии между MASP-1 и MASP-2, с одной стороны, и инициальными протеиназами классического пути активации комплемента C1r и C1s — с другой (Thiel et al., 2000). Кроме человека, подобные протеиназы выявлены в крови мышей, крыс, лягушки *Xenopus laevis*, костной рыбы — карпа, хрящевой рыбы — акулы, у круглоротых — миноги и даже у японской асцидии *Halocynthia roretzi* (Ji et al., 1997). Участие MASP в активации комплемента по лектиновому пути отражено на рис. 3 (Fujita et al., 2004).

Иммобилизация комплекса МСЛ с MASP-2 на микробной поверхности запускает превращение зимогена в активную сериновую протеиназу, которая активирует C4 и C2 компоненты комплемента (Vorup-Jensen et al., 2000), а производные последних C4b-C2a (C3-конвертаза) активируют C3 компонент комплемента. Возможен второй вариант активации C3 напрямую комплексом МСЛ с MASP-1 и белком с неизвестным назначением Map19 (Matsushita, Fujita, 1995) (рис. 3). Ковалентное присоединение образовавшегося C3b дополнительно маркирует и опсонизирует микробные клетки для фагоцитоза, и/или обеспечивает формирование на поверхности микроорганизмов мембраноатакующего

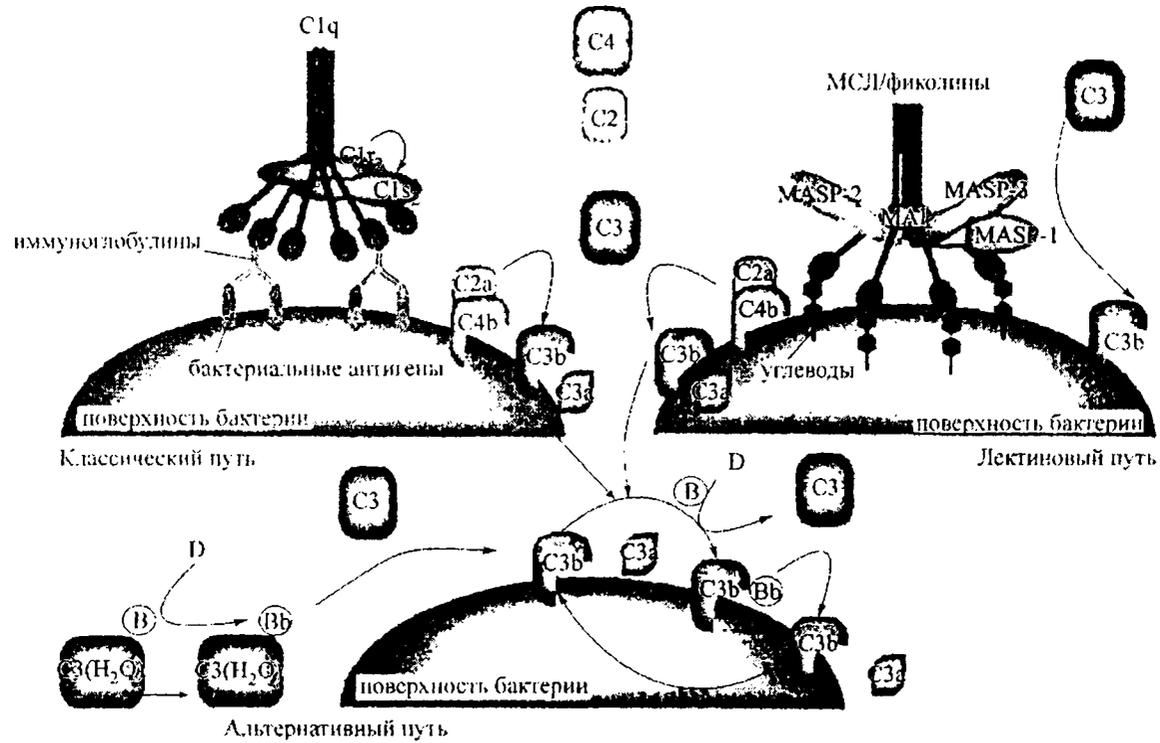


Рис. 3. Пути активации каскада комплемента.

комплекса C5-9. Неясно, какие факторы определяют направленность элиминационного процесса, связанного с активацией системы комплемента по лектиновому пути, в ту или иную сторону иммунного реагирования. Относительно недавно установлено, что другие лектины плазмы крови человека, сочетающие в своей структуре фибриноген-подобный лектиновый домен и коллаген-подобный домен — фиколины (Matsushita, Fujita, 2001), также, кооперируясь с MASP-1, MASP-2 и Map19, могут активировать систему комплемента по лектиновому пути (Matsushita et al., 2000). Фиколин распознает на поверхности микроорганизмов терминальные остатки D-N-ацетилглюкозы, что расширяет возможности иммунной системы человека распознавать и элиминировать патогены. Компоненты, гомологичные белкам подобной системы млекопитающих (фиколин, C3-подобный фактор, В-подобный и MASP-подобные факторы), обнаружены у асцидии *Halocynthia roretzi*, т. е. беспозвоночного животного подтипа Urochordates, эволюционно наиболее близкого позвоночным животным (Nonaka, Arumi, 1999).

Участие МСЛ в активации комплемента сравнимо с ролью антител в составе иммунных комплексов при активации комплемента по классическому пути, поэтому этот лектин часто рассматривается иммунологами в качестве функционального предшественника антител (преантитело) (Ezekowitz, 1991).

Иммунобиологическая роль МСЛ четко прослеживается при ряде форм инфекционной патологии, которые развиваются на фоне дефицита продукции белка в организме. Повышение чувствительности к менингококковой и вирусной (HIV, HBV, HSV) инфекциям и таким заболеваниям, как рецидивирующие кожные абсцессы и атопические дерматиты, часто наблюдают при недостаточности МСЛ в организме. В то же время повышенный уровень МСЛ также может приводить к нежелательным последствиям. В частности, высокий уровень сывороточного МСЛ способствует быстротечному фагоцитозу и дальнейшему переживанию в организме человека и животных микобактерий. Активация системы комплемента по лектиновому пути МСЛ часто сопровождает проявления аутоиммунных синдромов при ревматоидном артрите и постстрептококковом гломерулонефрите. Все это свидетельствует о необходимости коррекции уровня МСЛ при различных формах микробной патологии и аутоиммунных заболеваниях.

Таким образом, МСЛ детектирует сахара на поверхности микроорганизмов (бактерий, низших грибов, паразитических простейших) и некоторых вирусов. При этом происходит опсонизация микробов, благодаря которой облегчается их фагоцитоз моноцитами/макрофагами и нейтрофилами по рецепторопосредованному (сC1qR, C1qRp, CR1) механизму. Некоторые патогены

могут подвергаться внеклеточному киллингу, осуществляемому мембраноатакующим комплексом комплемента, который формируется на поверхности клетки-мишени в ходе активации комплемента по лектиновому пути. Как было подчеркнуто ранее, МСЛ в качестве лигандов (от лат. *ligo* — связываю) предпочитает терминально локализованные D-маннозу, D-N-ацетилглюкозамин, L-фукозу, D-N-ацетилманнозоамин и D-глюкозу в составе гликанов, липофосфогликанов, гликоинозитол-фосфолипидов и гликопротеинов. Именно поверхностная экспозиция рассматриваемых сахаров формирует патогенассоциированный молекулярный паттерн микробных клеток и некоторых вирионов. Собственные гликопротеины и гликолипиды животных клеток, как правило, не содержат в терминальном положении рассматриваемые сахара, что и является основой дискриминации «свое—чужое» маннозосвязывающим лектином и последующей направленности на патогены элиминирующих реакций фагоцитоза и активации системы комплемента.

Таким образом, иммунное распознавание, опосредованное МСЛ или фиколинами, запускает каскад активации комплемента, известный в настоящее время как лектиновый путь. Все это свидетельствует о том, что в рамках блока врожденного иммунитета уже у *Protochordates* возникли эффективные рекогносцировочные и элиминационные механизмы кооперации лектинов и отдельных компонентов системы комплемента, которые следует рассматривать как эволюционные предшественники классического пути активации комплемента.

### 2. 5. 3. Сурфактантные белки SP-A и SP-D

К компонентам рекогносцировочной системы врожденного иммунитета относятся также хорошо изученные апобелки легочного сурфактанта SP-A и SP-D, которые в отличие от МСЛ функционируют на границе внутренняя—наружная среда (полость альвеолы) (Crouch, Wright, 2001). Первоначально эти белки были описаны как участники системы, обеспечивающей поддержание структурированности и обмен сурфактанта альвеол. Как выяснилось позднее, их функции в организме оказались значительно шире. В настоящее время доказана их роль в формировании на уровне альвеол легкого защитного противoinфекционного барьера. Рассматриваемые белки синтезируются и секретируются в полость альвеол клетками альвеолярного эпителия второго типа и клетками Клара (Clara cells). Они, как и МСЛ, относятся к лектинам С-типа, лигируя сахара в присутствии ионов кальция. Сурфактантный белок А (SP-A) связывает олигосахара, которые

в терминальном положении содержат D-N-ацетилманнозоамин и L-фукозу, в то время как SP-D предпочитает взаимодействовать с инозитолом, мальтозой и глюкозой. Функционально активный SP-A является олигомером, состоящим из 6 тримеров, формирующих структуру «букета тюльпанов», характерную также для МСЛ, а SP-D представлен либо в форме крестообразной структуры додекамера, подобной конглютинину быка, либо олигомером более высокого порядка.

Пространственное расположение углеводсвязывающих доменов сурфактантных белков позволяет осуществлять им многоточечное связывание с гликоконъюгатами и может приводить к агрегации их носителей, облегчая последующий фагоцитоз клеточных и молекулярных агрегатов. Мишенями SP-A и SP-D являются грамотрицательные бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*). Спектр микробных мишеней SP-A распространяется и на грамположительные бактерии (*Streptococci B group*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*). Оба легочных сурфактантных белка могут агрегировать респираторные вирусы (Influenza A virus, Respiratory Syncytial virus). Причем SP-A связывается преимущественно с диманнозными повторами капсульных полисахаридов грамотрицательных бактерий, в то время как SP-D лигирует глюкозосодержащие коровые олигосахара липополисахаридов (Crouch, 1998). Кроме того, SP-A может связываться с липидом А (Kalina et al., 1995), т. е. проявляет распознающую активность нелектинового типа. Все эти взаимодействия в той или иной степени приводят к агрегации (агрегации) микробов, облегчающей их фагоцитоз альвеолярными макрофагами и нейтрофилами. В какой степени последний процесс опосредован рецепторами фагоцитов? Описано несколько клеточноассоциированных структур, способных избирательно связывать SP-A. Так, альвеолярные макрофаги и альвеолоциты II типа экспрессируют на поверхности клеток белок SPR-210 (Surfactant protein receptor 210 kDa) (Chronos et al., 1996), с которым связываются как свободные SP-A, так и те, которые находятся в комплексе с микроорганизмами. В силу структурной гомологии коллагеноподобных доменов SP-A, МСЛ и компонента комплемента C1q все они являются естественными лигандами C1q рецепторов (сC1qR, C1qRp). Связывание SP-A с липидом А липополисахаридов предопределяет, по-видимому, и возможность его взаимодействия с рецептором CD14 (Sano et al., 1999). Следует подчеркнуть, что в отличие от большинства известных лектинов (МСЛ, конглютинин, CP43) и C1q, которые в свободном состоянии не лигируются C1q рецепторами, SP-A белок способен связываться с ними и CD14 рецептором как сам по себе, так и в комплексе с носителями патогенассоциированных молекулярных паттернов углеводной природы.

Предполагаемым рецептором SP-D является белок Gp340 на поверхности альвеолярных макрофагов, известный как представитель суперсемейства CP (Wright, Youmans, 1995).

Наряду с основной агрегирующей микробы активностью, SP-A и SP-D обладают еще рядом функциональных свойств, значимых в формировании резистентности к инфекционным патогенам. В частности, SP-A и SP-D стимулируют полимеризацию актина в альвеолярных макрофагах и способствуют таким образом хемотаксису этих клеток (Tino, Wright, 1996). Их влияние как опсонизирующих факторов пока строго не доказано. Интересно, что SP-A и SP-D усиливают дыхательный взрыв в макрофагах и продукцию ими окиси азота (NO), но подавляют в фагоцитарных клетках ЛПС- или кандидами индуцированную продукцию провоспалительных цитокинов. При прямом контакте SP-A с альвеолярными макрофагами и моноцитами крови наблюдается увеличение продукции ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН $\gamma$  этими клетками (Kremlev et al., 1994, 1997).

SP-A и SP-D усиливают фагоцитоз *E. coli*, *Str. pneumoniae*, *St. aureus* нейтрофилами (Hartshorn et al., 1998). Интересно, что в большинстве исследовательских моделей SP-A и SP-D подавляют различные стороны функциональной активности лимфоцитов. Предполагается, что это связано со способностью сурфактантных лектинов подавлять продукцию клетками ИЛ-2 как одного из основных Т-ростовых факторов (Boggon, Wright, 2000). Можно говорить в целом, что SP-A и SP-D, хотя и в разной степени, усиливают фагоцитарные защитные реакции организма, ослабляя при этом сопутствующие воспалительные проявления, которые связаны с гиперпродукцией микробами индуцированного синтеза провоспалительных цитокинов моноцитами/макрофагами и Т-лимфоцитами (Crouch, Wright, 2001). По-видимому, подобный характер регулирования иммунных реакций на уровне нижних дыхательных путей является наиболее адекватным, соответствующим структурно-функциональной организации легких.

#### 2. 5. 4. Конглютинин

Бычий конглютинин был первым описанным лектином С-типа позвоночных, который вызывал агглютинацию комплементопсонизированных эритроцитов (Lachman, 1967). Структурный анализ белка выявил в его базовой субъединице короткий 25 аминокислотный N-концевой участок, содержащий 2 цистеина, которые участвуют в формировании олигомера, и следующий за ним коллагено-подобный домен, включающий 55 повторов GXY. С-терминальная часть молекулы включает 155 аминокислот,

которые формируют углеводраспознающий домен (УРД), стабилизированный двумя дисульфидными связями (Lee et al., 1991). Молекулярная масса субъединицы около 43 кДа. Три такие субъединицы за счет взаимодействия коллагеноподобных доменов формируют олигомер первого порядка, свойственный также МСЛ, SP-A и SP-D. Вследствие стереотипного характера образования таких олигомеров четырьмя рассмотренными лектинами, эта группа белков получила общее название коллектинов, т. е. молекул, сочетающих в своей структуре лектиновые и коллагеноподобные домены (Malhotra et al., 1992; Holmskov et al., 1994). Функционально активная молекула конглютинина состоит из 4 олигомеров первого порядка, объединенных в крестообразную надмолекулярную структуру (рис. 2). По характеру олигомерной организации конглютинин отличается от МСЛ и SP-A, но сходен с додекамером SP-D. Как представитель лектинов, конглютинин лигирует с большой аффинностью невосстановленные терминальные остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилманнозамина. Он способен связывать также терминальные остатки D-маннозы и L-фукозы (Loveless et al., 1989). Подобный спектр лигандов позволяет конглютинину активно участвовать в ряде иммунных реакций. В частности, он агглютинирует грамотрицательные бактерии, опсонизированные C3b, и способствует их поглощению фагоцитами и последующей элиминации (Friis et al., 1991). Конглютинин является, по-видимому, рекогносцировочным белком при некоторых вирусных инфекциях. Есть основание рассматривать его в качестве основного компонента  $\beta$ -ингибиторов сыворотки крупного рогатого скота, ответственных за нейтрализацию гемагглютинирующей активности вируса гриппа (Malhotra, 1989).

Конглютинин рассматривается в настоящее время в качестве одного из основных гуморальных факторов крови крупного рогатого скота, обеспечивающих распознавание «несвоего» (чужеродного). Есть основания считать, что при этом он вступает в кооперацию с системой комплемента, хотя в отличие от МСЛ и не активирует этот каскад.

Примером древней рекогносцировочной системы врожденного иммунитета у беспозвоночных, базирующейся на гуморальных факторах функционально гомологичных лектинам млекопитающих, является каскад коагуляции гемолимфы подковообразного краба (мечехвоста) *Limulus polyphemus*, запускаемый компонентами микробных оболочек (полисахаридами, липополисахаридами). Последовательность включения и пролонгирования процесса коагуляции гемолимфы под действием эндотоксина грамотрицательных бактерий и 1,3- $\beta$ -гликана клеточной стенки низших грибов детально рассмотрена в разделе 3. 5.

## 2. 5. 5. Клеточноассоциированные лектины

Фагоциты человека и ряда экспериментальных животных (мышь, морская свинка, крыса, кролик) экспрессируют на своей поверхности разнообразные по специфичности лектины, с которыми связана способность этих клеток распознавать свои и чужеродные углеводы и которые в связи с этим участвуют в детекции микроорганизмов, имеющих характерный только для них набор терминально локализованных сахаров, т. е. ПАМП. Например, в состав зимозана клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* входят маннаны, маннопротеины и  $\beta$ -гликаны с последовательностью моносахаров типичных для этой группы микроорганизмов. Фагоциты млекопитающих с помощью маннозного рецептора, избирательно связывающего  $\alpha$ -маннан, и Дектина I, связывающего  $\beta$ -гликаны, детектируют и фагоцитируют дрожжевые клетки и зимозан (Ezekowitz et al., 1990; Brown, Gordon, 2001).

Маннозный рецептор макрофагов является трансмембранным белком I-го типа, N-концевая часть которого локализована внеклеточно, с коротким (45 аминокислотных остатков) цитоплазматическим фрагментом. Внеклеточная, участвующая в детекции остатков терминально локализованных манноз, часть рецептора состоит из восьми доменов, характерных для лектинов C-типа, короткого N-концевого фрагмента, обогащенного цистеином, и фибронектинового повтора II типа (Stahl, Ezekowitz, 1998). Этот рецептор характерен для дендритных клеток и некоторых субпопуляций макрофагов. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что лиганды, активирующие маннозный рецептор, обеспечивают последовательность внутриклеточных структурно-функциональных изменений, достаточных для осуществления процесса эндоцитоза.

Дектин I как лектин, связывающий  $\beta$ -гликаны, характерные для низших грибов, был первоначально открыт на дендритных клетках (Brown, Gordon, 2001). В его состав входит один внеклеточный углеводраспознающий домен и короткая цитоплазматическая часть, включающая предположительно ITAM (immunoreceptor tyrosine activation motif) последовательность. Кроме  $\beta$ -гликанов рецептор связывает с помощью области, отличной от УРД, T-лимфоциты. Это взаимодействие рассматривается как одно из условий активации T-клеток (Willment et al., 2001). Рассматриваемый рецептор экспонируется на поверхности клеток миелоидной линии и является, по-видимому, одним из доминирующих рецепторов, которые лигируют  $\beta$ -гликаны при фагоцитозе (Brown, Gordon, 2001).

Кроме Дектина I, высокоаффинное связывание  $\beta$ -гликанов с  $Kd 5 \times 10^{-8}$  M осуществляет  $\alpha$ M-цепь рецептора CR3 (Ross et al., 2000). Есть основание предполагать, что оба рецептора  $\beta$ -гли-

канов участвуют совместно с маннозным рецептором (MR, или CD206) в фагоцитозе зимозана и низших грибов, осуществляемом макрофагами.

Функция рекогносцировочного аппарата иммунной системы заключается в избирательном распознавании структур и молекул микробных патогенов (ПАМП), которое обеспечивает их направленную нейтрализацию и конечную элиминацию.

В ряде случаев у отдельных молекул системы врожденного иммунитета имеет место сочетание как узнающей микробы, так и элиминирующей их активности (лектин L6, система комплемента, некоторые антимикробные пептиды и белки).

Наиболее древней группой рецепторов макрофагов являются СР и маннозный рецептор. Необходимо подчеркнуть, что уже их взаимодействию с ПАМП свойственна высокая избирательность.

## **2. 6. Система комплемента и $\alpha_2$ -макроглобулин в иммунитете животных**

### **2. 6. 1. Система комплемента**

Система комплемента была открыта американским бактериологом Дж. Натталом, (Nuttall, 1888) и независимо немецким исследователем Г. Бюхнером (Buchner, 1889), который использовал термин «алексин» (от греч.  $\alpha\lambda\epsilon\xi\omega$  — я защищаю) для обозначения бактерицидной фракции крови человека и лабораторных животных. Термин комплемент (komplement, нем. дополняющий) ввел П. Эрлих для обозначения фракции свежей, не подвергнутой температурной обработке (56 °С в течение 30 мин или 60 °С в течение 20 мин) сыворотки крови, которая в исследованиях Ж. Борде была способна вызывать лизис эритроцитов в присутствии антигенспецифических антител (иммунный гемолиз). Этот феномен впервые обстоятельно изучил Ж. Борде в 1898 г., получивший впоследствии (1919) за исследование системы комплемента Нобелевскую премию в номинации «Физиология или медицина». Только во второй половине XX в. были не только функционально, но и химически охарактеризованы основные составляющие этой сложной многокомпонентной белковой системы (Muller-Eberhard, 1992; Cooper, 1999), активация которой обеспечивает распознавание «несвоего» (чужеродного), т. е. инородных антигенов и патогенассоциированных молекулярных паттернов (Janeway, 1992) и их последующую нейтрализацию и элиминацию. Именно сочетание функций распознавания патогенов и их последующей инактивации в системе комплемента определяет ее ключевую биологическую роль в защите позвоночных и некоторых беспозвоночных животных от инфекции, а в ряде случаев и

от трансформированных опухолевых клеток (Вавилова, Голосова, 1990; Козлов, 1997; Ройт и др., 2000).

В настоящее время установлено, что система комплемента состоит из более чем 30 индивидуальных плазменных и мембранасоциированных белков, формирующих и регулирующих каскад белковых превращений, которые базируются на ограниченном протеолизе эндогенными сериновыми протеиназами и генерируют физиологически активные вещества (C4a, C3a, C3b, C5a, C5b), определяющие эффективность рассматриваемой системы в иммунной защите животных (табл. 5).

Активация каскада комплемента осуществляется одним из 3 известных путей (рис. 3). В работах Борде был впервые описан путь, получивший в литературе название классического, главным активатором которого (хотя и не единственным) является комплекс антиген/антитело (иммунный комплекс). Взаимодействие C1q-компонента комплемента с CН3 и CН2 доменами антител в составе иммунных комплексов инициирует каскад последовательных реакций, превращая проэнзим C1г в сериновую протеиназу, которая далее путем ограниченного протеолиза активирует C1s-компонент, также проявляющий активность сериновой протеиназы.

C1q связывает CН3 домен IgM или CН2 домен IgG, находящихся в составе иммунных комплексов. В случае неиммунных активаторов природа связываемых структур точно не известна. Но в этом взаимодействии, по-видимому, важную роль играют высокозаряженные кластеры молекул-активаторов. Молекулярная масса C1q-компонента составляет около 450 кДа. Он состоит из 6 олигомеров, в составе каждого из которых находятся в разных сочетаниях 3 полипептидные цепи (А, В, С). N-концевые коллагеновые части субъединиц формируют «стебель» (stem) «тюльпана», а С-концевые — глобулярные головки «тюльпанов», которые в конечной олигомерной молекуле C1q имеют форму «букета тюльпанов», внешне напоминающую, но не гомологичную по структуре, таковую маннозосвязывающего лектина. C1q с помощью своих глобулярных головок на основе белок-белковых взаимодействий распознает определенные домены константной области иммуноглобулинов в составе иммунных комплексов. В случае же других активаторов системы комплемента по классическому пути (сывороточный амилоид Р, С-реактивный белок и ДНК) в качестве связывающего домена выступает коллагеноподобная область А цепи C1q.

Присутствие в олигомерной макромолекуле шести идентичных связывающих сайтов обеспечивает мультивалентное присоединение C1q к активатору, что является одним из условий активации комплемента по классическому пути.

Для того чтобы произошла активация C1 необходимо, как минимум, взаимодействие 2 макромолекул C1q с двумя сайтами

Некоторые структурные и функциональные свойства основных белков системы комплемента

Белок	Молекулярная масса, кДа	Количество цепей	Изоэлектрическая точка	Содержание в сыворотке, мг/л	Основные функции
C1q	459	18	10–10,6	80	Распознавание иммунных комплексов
C1r <sub>2</sub>	170	2		34	Сериновая протеиназа
C1s	85	1		30	» »
C2	110	1	5,5	15	Инициальные компоненты классического пути активации
C4	198	3	6,4	350	
C3	190	2	5,7	1200	Ключевой компонент системы комплемента, с которым связана продукция опсонина C3b
C5	190	2	4,1	75	Источник C5a и C5b производных комплемента
C6	128	1	6	70	Компоненты комплемента, участвующие совместно с C5b производным в формировании мембран-атакующего комплекса на поверхности бактерий
C7	121	1	5,6	60	
C8	163	3	6,5	80	
C9	79	1	4,7	60	
Фактор D	24	1	7,0, 7,4	2	Факторы, участвующие в активации комплемента по альтернативному пути
Фактор В	93	1	5,7, 6,6	210	
Пропердин Р	220	4	> 9,5	26	
Фактор Н	150	1		480	
Фактор I	93	2		53	
S-белок (витронектин)	89	1(2)	3,9	500	
C3a	9	1		70*	Умеренные анафилатоксины воспаления
C4a	9			22*	
C5a	11	1		4,9*	Основной анафилатоксин воспаления
Карбоксипептидаза N	310			35	Инактиватор анафилатоксина C5a
C1q-1	175				
M-C1q-1	1–2				
Протектин (CD59)	18–20				

\* В условиях полной активации.

активатора. После связывания активируются обе ассоциированные с ней молекулы C1g путем аутокаталитического процесса. Меньшая субъединица расщепленного C1g является сериновой протеиназой, атакующей в свою очередь одну пептидную связь в C1s. Меньшая субъединица расщепленного C1s также является сериновой протеиназой. Так, осуществляется активирование C1 в результате связывания с активатором, которым в классическом пути активации комплемента является иммунный комплекс. Далее C1s гидролизует C4, формируя C4a (small, малый) и C4b (big, большой) фрагменты.

C4a обладает цитокин-подобной активностью, являясь умеренным хемокином и анафилатоксином. C4 содержит тиоэфирную связь, которая активируется после его расщепления с помощью C1s. Метастабильная карбонильная группа глутаминовой кислоты расщепленной тиоэфирной связи обладает способностью образовывать эфирную или амидную связи с гидроксильными или амино-группами на поверхности активаторов комплемента.

C1s, являясь сериновой протеазой, расщепляет C4- и C2-компоненты комплемента, из фрагментов которых C4b и C2a формируется энзиматический комплекс с серин-протеазной активностью, известный как C3-конвертаза, субстратом которой является ключевой компонент всего каскада — компонент C3. Именно его расщепление на поверхности иммунного комплекса или патогена во всех трех известных каскадах активации (классическом, альтернативном и лектиновом) является определяющим в реализации рекогносцировочной функции системы комплемента. Ограниченный протеолиз субъединицы C3-компонента формирует C3a-компонент, являющийся наряду с C4a умеренным хемотаксином для фагоцитов, и C3b-компонент, содержащий, подобно C4, метастабильную тиоэфирную связь, которая быстро в присутствии воды «раскрывается» и свободная ацильная группа в результате мгновенно ковалентно связывается с патогеном иммунного комплекса или комплексом маннозосвязывающего лектина с патогеном. Необратимое ковалентное связывание C3b с патогенами или иммунными комплексами (в варианте активации по классическому пути) маркирует их как «несвое» (чужеродное, патогенное) и, таким образом, определяет нацеленность последующих нейтрализующих и элиминирующих патогены реакций иммунной системы. При этом возможны два взаимодополняющих механизма элиминации «несвоего». Первый связан с фагоцитозом иммунных комплексов или носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов по рецепторопосредованному механизму. C3b-молекула является оптимальным опсоином, способствующим через CR1- и CR3-рецепторы поглощению моноцитами/макрофагами и нейтрофилами объектов фагоцитоза, поскольку она увеличивает их гидрофобность и снижает отрицательный заряд их поверхно-

сти (Адо, 1961). Другой путь инактивации патогенов связан, как правило, с клеточными объектами (микробами) и сводится к ряду последующих реакций каскада активации комплемента, заключающихся в формировании на поверхности микроорганизма C5-конвертазы (комплекс C4bC2aC3b, являющийся сериновой протеазой), расщепляющей C5-компонент на C5a и C5b производные. C5b производное комплемента инициирует сборку так называемого мембраноатакующего комплекса (C5b-9) (membrane attack complex) на поверхности клетки-мишени или вируса. C9-компонент комплемента формирует за счет олигомеризации в цитоплазматической мембране клетки-мишени пору диаметром 100 Å, образование которой ведет к осмотическому лизису микроорганизмов. В результате перфорации мембран происходит внеклеточная гибель микробов, структурные компоненты которых далее эндцитируются и перевариваются фагоцитами. При всей очевидной биологической значимости рассматриваемого процесса элиминации патогенов следует подчеркнуть, что иммунодефицит по компоненту C9 комплемента у людей, как правило, не приводит к заметному снижению их резистентности к большинству известных инфекционных бактериальных и грибковых заболеваний. У таких пациентов имеет место, как правило, повышение чувствительности преимущественно к микробам рода *Neisseria*. Возможно, что мы переоценивали значимость мембраноатакующего комплекса в иммунных реакциях организма человека и некоторых позвоночных животных. Нельзя исключить и того, что у людей, дефицитных по C9-компоненту комплемента, его функцию берет на себя гомологичный белок перфорин, который образует поры в эукариотических клетках-мишенях при клеточно-опосредуемом цитолизе, осуществляемом НК-клетками и цитолитическими лимфоцитами (CD8+-клетки).

C5a производное комплемента является сильным хемокином и анафилатоксином, физиологическая роль которого заключается в привлечении нейтрофилов и моноцитов в очаги проникновения инфекции.

Второй путь активации комплемента известен как альтернативный. Он в настоящее время рассматривается как основной в системе механизмов врожденного иммунитета, поскольку его активация не связана с антителами и иммунными комплексами (Cooper, 1999). Альтернативный путь активации комплемента запускается в ходе ковалентного связывания C3b (по рассмотренному ранее механизму) с поверхностью клеток или активационных частиц. Таким образом, не C1q-компонент, а C3b-компонент комплемента является в рассматриваемом пути активации комплемента основной распознающей «несвое» молекулой. Поскольку микробные патогены не содержат на своей поверхности белки, подавляющие активность каскада комплемента (CRI, DAF, MCP),

это создает предпосылки для инициации альтернативного пути активации. Иницирующие весь процесс микроколичества С3b продуцируются систематически в плазме крови под действием неассоциированной с клетками С3-конвертазы, которая формируется в ходе взаимодействия активированной в водной среде формы С3 — С3(Н<sub>2</sub>О), фактора В и фактора D. Фактор D, являющийся сериновой протениназой, расщепляет фактор В в составе комплекса С3(Н<sub>2</sub>О) / В, фрагмент которого Вb остается связанным с С3(Н<sub>2</sub>О). Комплекс С3(Н<sub>2</sub>О)Вb и является С3-конвертазой в альтернативном пути активации комплемента, основным субстратом которого являются нативные молекулы С3. Образовавшиеся вблизи активаторов молекулы С3b ковалентно связываются с патогенами, обеспечивая тем самым дальнейшее протекание активации каскада по альтернативному пути уже на их поверхности (рис. 3).

Следующие этапы активации комплемента, приводящие к образованию С5a- и С5bС6С7С8(С9)n-комплекса, отражены на рис. 3. Они протекают очень сходно в обоих путях активации комплемента.

Третий путь активации комплемента, получивший название лектинового, был открыт относительно недавно (Matsushita, Fujita, 1992). Запуск этого пути осуществляется маннозо(маннан)связывающим лектином (белком) (МСЛ), который представляет из себя олигомерный комплекс, состоящий из 9—18 идентичных 32 кДа субъединиц (рис. 2). В состав каждой субъединицы входят 4 домена, ключевыми из которых являются углеводраспознающий домен (УРД) в С-концевой области молекулы и коллагеноподобный N-концевой домен. Структурные особенности последнего, заключающиеся в наличии 55—56 повторов GXU, позволяют трем субъединицам формировать олигомер первого порядка. Далее 3—6 таких первичных олигомеров объединяются в олигомерную структуру более высокого порядка, напоминающую «букет тюльпанов», как и в случае с С1q-компонентом комплемента. Принципиальное отличие двух сравниваемых «букетов» заключается в том, что в составе С1q объединены три типа неидентичных, хотя и гомологичных, полипептидных цепей, в то время как «букет» МСЛ состоит из идентичных субъединиц. Кроме того, глобулярные головки С1q, узнающие СН<sub>2</sub>- и СН<sub>3</sub>-домены в составе IqG и IqM соответственно, функционируют по комплементарному принципу белок-белковых взаимодействий, в то время как углеводраспознающие домены МСЛ работают по принципу углевод-белковых взаимодействий, т. е. являются лектиновыми доменами. Последние распознают в составе патогенов некоторые сахара, локализованные на поверхности клеток и вирионов, и связываются с ними с высокой аффинностью (Kd ~ 10<sup>-9</sup>—10<sup>-10</sup> М), образуя комплекс патоген/МСЛ. Формирование этого комплекса активирует ассоциированные нековалент-

но с МСЛ два проэнзима MASP1 и MASP2, которые являются сериновыми протеиназами, инициирующими протекание процесса активации комплемента на поверхности комплекса патоген/МСЛ либо по классическому пути (расщепляя последовательно C4 и C2), либо по альтернативному (мишенью в этом случае является компонент C3) (рис. 3).

Есть много оснований рассматривать лектиновый путь активации комплемента как эволюционно предшествующий классическому, составляющий ключевое звено механизмов врожденного иммунитета. Во-первых, маннозо(маннан)связывающий лектин и ассоциированная с ним протеиназа обнаружены уже у беспозвоночных, в частности у асцидий (Nair et al., 2000). Во-вторых, ключевой компонент всей системы комплемента C3 и В-фактор, на котором сходятся все три пути активации комплемента, выявлены у иглокожих — морского ежа (Al-Sharifet et al., 1998; Smith et al., 1998) и асцидий (Nonaka et al., 1999; Yi et al., 2000). В третьих, активация комплемента по лектиновому пути является наиболее «физиологичной», поскольку основана на однозначной детерминации патогенов — носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов и не зависит от C1q, антител и следовых количеств C3-активированного компонента комплемента. В связи с точностью дискриминации «свое»/«несвое» в лектиновом пути, детерминированной высокоаффинным взаимодействием МСЛ с патогенами, часть исследователей расценивает функциональную роль лектина МСЛ как эволюционного предшественника антител (преантитела) (Ezekowitz, 1991).

Наконец, активация комплемента, инициируемая связыванием МСЛ с носителем патогенассоциированных молекулярных паттернов, может протекать как по классическому, так и альтернативному путям с генерацией физиологически активных производных комплемента, обеспечивающих вовлечение в иммунную защиту организма дополнительных факторов гуморальной и клеточной природы.

Активация системы комплемента приводит к эффективной детекции «несвоего» (патогенного), его унифицированной маркировке путем ковалентного связывания с мишенями C4b и C3b производных комплемента, которые при этом играют опсонизирующую роль в рецепторопосредованном фагоцитозе носителей патогенассоциированных молекулярных паттернов нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Кроме того, в ряде случаев доказано формирование на поверхности микроорганизмов (бактерий, низших грибов и простейших) и вирионов (оболочечных вирусов) мембраноатакующего комплекса C5b-9, осуществляющего цитоллиз клеток-мишеней во внеклеточной среде.

Факторами и производными системы комплемента, опсонизирующими микробы, являются C1q, C3b, iC3b, C4b и iC4b. Наряду

с этим при расщеплении ряда компонентов каскада комплемента образуются цитокино-подобные производные комплемента, обладающие хемотаксической для фагоцитов активностью (C5a, C3a, C4a). Кроме того, эти производные способны вызывать в тканях симптомы воспаления (краснота, набухание, локальное повышение температуры, боль), поэтому их еще называют анафилатоксинами. Они увеличивают проницаемость сосудов микроциркуляторного русла, являются дегрануляторами тучных клеток, вызывают сокращение гладкой мускулатуры. Карбоксипептидаза В-типа плазмы крови является главным инактиватором анафилактической активности C5a, C3a и C4a производных, удаляя функционально значимый C-концевой аргинин у этих молекул.

Наиболее активным из рассматриваемых производных является C5a. Он является хемотаксином для нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. На поверхности этих клеток имеются рецепторы, лигирующие C5a. Рецептор относится к группе провоспалительных рецепторов, одинарная белковая цепочка которых семь раз пересекает мембрану. Эта группа включает в себя рецепторы для C5a, интерлейкина 8, формилметиониловых пептидов, тромбоцитактивирующего фактора (Gerard, Gerard, 1994). Связывание лигандов с рецепторами рассматриваемой группы инициирует в клетках путь трансдукции сигнала, начальными участниками которого являются G-белки, ответственные за ГТФ/ГДФ обмен. Это приводит к активации фосфолипазы C и фосфатидилинозитол-3-киназы, обмену арахидоновой кислоты с последующим включением ряда сигнальных путей. Конечным результатом подобных изменений в моноцитах/макрофагах является синтез и секреция клетками провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-8. C5a производное усиливает секрецию лизосомальных ферментов из нейтрофилов и моноцитов/макрофагов, дыхательный взрыв в фагоцитах, их адгезию к эндотелию, экспрессию на поверхности клеток рецепторов к производным комплемента, интегринов и ряда других белков. Совокупность функциональных проявлений фагоцитов после воздействия на них C5a, C3a и C4a можно оценивать как способствующую усилению и реализации антимикробного потенциала этих клеток.

Нельзя не отметить, что гиперактивация фагоцитов и интенсивное воспаление, наряду с защитной функцией, несут в себе, в ряде случаев, и реальную угрозу для структурной целостности клеток и тканей собственного организма. Поэтому в процессе эволюции возникли и прошли отбор ряд механизмов, ограничивающих воспалительный процесс. К реализации этих механизмов прямое отношение имеют несколько белков, регулирующих процесс активации комплемента (Lindaht et al., 2000). В частности, активность C3-конвертаз (C4b, C3a, C3b, Bb) человека находится под контролем растворимых (C4bp, HL-1) и мембранных белков

(CR1, CD55, CD46), объединенных в семейство регуляторов активации комплемента. Белок, связывающий C4b производное C4-компонента комплемента, ингибирует дальнейшую активацию комплемента посредством связывания с этим компонентом на поверхности микробов. Известен ингибитор компонента C1-C1inh, блокирующий активацию каскада классического пути на его начальной стадии. Собственные клетки животного организма имеют на своей поверхности белок, разрушающий формирующийся каскад активации комплемента на уровне C3-конвертаз (DAF — decay activation factor, или CD55). Рецепторы комплемента также являются ингибиторами каскада его активации (CR1, CR2).

Баланс активаторов и ингибиторов системы комплемента во многом определяет характер и интенсивность как защитных, так и повреждающих реакций, сопряженных с этой системой. Поэтому дальнейшее изучение взаимодействия рассматриваемых белков представляет несомненное медицинское значение.

Мы рассмотрели в настоящей главе преимущественно те стороны функциональной активности системы комплемента, которые имеют прямое отношение к формированию врожденного иммунитета у позвоночных и некоторых групп беспозвоночных (иглокожие, асцидии) животных. Однако необходимо помнить, что у позвоночных животных с развитой системой механизмов приобретенного иммунитета комплемент участвует в формировании адаптивных реакций антителообразования на антигены, регулирует размеры иммунных комплексов и степень их растворимости, т. е. осуществляет связь двух блоков иммунной системы — врожденного и приобретенного. Эти аспекты функциональной активности системы комплемента будут представлены в гл. 4.

## **2. 6. 2. $\alpha_2$ -Макроглобулин как структурный гомолог C3-компонента комплемента**

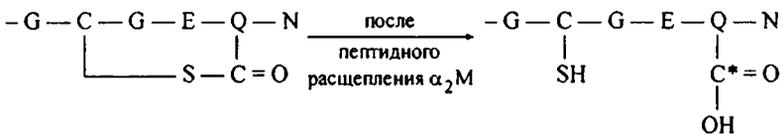
Протеазы играют важную роль в различных иммунных и сопряженных с ними процессах, включая каскады образования сигнального пептида «Spätzle» у дрозофилы и активации комплемента у позвоночных, системы свертывания крови (гемолимфы) и фибринолиза. В связи с этим представляет интерес понимание механизмов, которые определяют уровень активности ряда ключевых протеаз, вовлеченных в иммунные и гемостатические процессы (Krem, Di Cera, 2002). Одним из ведущих молекулярных факторов, задействованных в регуляции активности протеаз различных классов, являются разнообразные эндогенные ингибиторы белковой природы, среди которых ингибиторы группы  $\alpha_2$ -макроглобулинов ( $\alpha_2M$ ) занимают одну из ключевых позиций (Armstrong, Quigley, 1999). К настоящему времени  $\alpha_2$ -макрогло-

булины описаны у млекопитающих и других позвоночных, оболочников, иглокожих, членистоногих, моллюсков и нематод (Armstrong, Quigley, 1999).

Первоначально  $\alpha_2M$  был обстоятельно изучен у млекопитающих, а в настоящее время он выявлен и у низших позвоночных (Starkey, Barrett, 1982), и у беспозвоночных (Armstrong, Quigley, 1991, 1999; Armstrong, 2001). Этот ингибитор подавляет активность широкого круга протеиназ, причем осуществляет это путем захватывания белковых молекул в свой гидрофильный карман. Как правило, он не взаимодействует с активным центром ингибируемых протеаз, а вступает с ними в образование молекулярного комплекса, в котором блокируется взаимодействие протеаз со своими субстратами (Starkey, Barrett, 1977). Протеазы, связавшиеся с  $\alpha_2M$ , часто сохраняют способность гидролизовать малые амидные и эфирные субстраты, но не способны расщеплять белки.

Размер полипептидной цепи  $\alpha_2M$  различен у млекопитающих, мечехвостов и осьминогов и колеблется в пределах 180—185 кДа. Выявлены формы  $\alpha_2M$  с одной, двумя и четырьмя полипептидными цепями, но наиболее распространена двусубъединичная форма, в которой белковые молекулы соединены дисульфидными связями, а также тетрамер, в котором нековалентно объединены две двусубъединичные формы (Sprucher et al., 1987).

В мономере  $\alpha_2M$  различают несколько функциональных доменов. Наиболее охарактеризованы домен, связывающий белки-лиганды (мишени, протеазы), внутренний тиоэфирный и рецепторузнающий домены. Домен, связывающий белки-мишени (the bait region), состоит из 25 аминокислотных остатков, которые формируют такие сочетания последовательностей и делают его субстратом для протеаз разной специфичности (Enghild et al., 1989; Sottrup-Jensen et al., 1989). Этот участок молекулы позволяет  $\alpha_2M$  связывать эндопептидазы со всеми известными каталитическими механизмами (сериновые, цистеиновые, аспартильные и металлопротеиназы). Внутренняя тиоэфирная связь активируется в белке после расщепления в домене-приманке (the bait region) той или иной пептидной связи. Она формируется в результате взаимодействия карбоксила глутамильного остатка со свободной сульфгидрильной группой:



После взаимодействия с эндопептидазами и расщеплением того или иного участка в домене-приманке тиоэфирная связь рас-

падает, высвобождается химически реактивный  $\gamma$ -карбонил, который далее реагирует с нуклеофильными группами разнообразных молекул. Образование химической связи между карбониллом и  $\epsilon$ -амино- или гидроксильными группами протеаз-мишени приводит к ковалентному присоединению последних к  $\alpha_2M$  в области тиоэфирного домена (Sottrup-Jensen et al., 1990; Chen et al., 1992). Инактивация этого домена небольшими первичными аминами (например, метиламином) нарушает способность  $\alpha_2M$  связывать протеазы. Обработанный метиламином  $\alpha_2M$  подвергается протеолиту в домене-приманке, но неспособен связывать далее протеазы (Steinbuch et al., 1968; Swenson, Howard, 1979), т. е. лишается своей основной функциональной активности как универсального ингибитора протеаз. Тиоэфирная связь  $\alpha_2M$  является уникальной для всех представителей этого семейства (Tack, 1983).

Структурные перестройки  $\alpha_2M$  происходят после его активации протеазами и в домене, распознающем рецептор, который локализован в С-концевой части молекулы (Enghild et al., 1989; Thomsen, Sottrup-Jensen, 1993). Комплекс  $\alpha_2M$  с протеазами быстро удаляется из циркуляции посредством рецепторопосредованного эндоцитоза, инициируемого распознающим рецептор доменом, который реагирует с поверхностью многих типов клеток. Поглощенный комплекс подвергается перевариванию в лизосомальном аппарате клеток. Обработанный метиламином  $\alpha_2M$  также подвергается эндоцитозу, как и активированный в ходе взаимодействия с протеазами (van Leuven, 1984).

К семейству  $\alpha_2M$  относятся собственно  $\alpha_2$ -макроглобулин, а также белок беременности (pregnancy-zone protein),  $\alpha_1$ -ингибитор-3 грызунов (rodent  $\alpha_1$  inhibitor-3), овомакроглобулины яиц птиц и рептилий, белки системы комплемента C3, C4 и C5. В плазме крови и гемолимфы беспозвоночных также обнаружены представители данного семейства.

Для большинства представителей рассматриваемого семейства характерно наличие в их структуре внутренней тиоэфирной связи. Но из этого правила есть и исключения, например овомакроглобулины и компонент комплемента C5. Тиоэфирная связь C3- и C4-компонентов комплемента определяет возможность этих белков и их производных ковалентно связываться с поверхностью инородных частиц и клеток (Law, Levine, 1977), обеспечивая маркировку последних для последующего цитолиза C5b-C9-комплексом или фагоцитоза.

Представитель семейства  $\alpha_2M$  описан у *Limulus polyphemus* (американский подковообразный краб) (Quigley et al., 1982). Белок подавляет протеолитическую активность трипсина, химо-трипсина, плазмина, эластазы, субтилизина, термоллизина в отношении казеина и фибрина. В дальнейшем представители семей-

ства были выделены из плазмы ракообразных (Armstrong et al., 1985), разных классов моллюсков (Armstrong, Quigley, 1992). Все известные  $\alpha_2\text{M}$  беспозвоночных представляют собой димеры, что подтверждено трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопией (Spycher et al., 1987; Thogergen et al., 1992). Инактивация связывающей протеазы активности метиламином свидетельствует о значимости тиоэфирной связи в реализации ингибирующей способности  $\alpha_2\text{M}$  хелицерных (Armstrong, Quigley, 1987). Этот домен у беспозвоночных очень сходен по структуре с таковым  $\alpha_2\text{M}$  позвоночных. Ковалентное связывание протеиназмишеней через образование  $\gamma$ -карбонил- $\epsilon$ -амино-изопептида, опосредованное глутамилтиоэфирной связью, существенно важно для функционирования многих, но не всех  $\alpha_2\text{M}$ . В случае С3 и С4 значимость этой связи очевидна (Law, Reid, 1988).

Клиренс комплексов  $\alpha_2\text{M}$ /протеазы из циркуляции носит рецепторопосредованный характер. Нативный непрореагировавший с протеазами  $\alpha_2\text{M}$  довольно стабилен в плазме и не реагирует с рецепторами поверхности клеток. После реакции с протеазами, образовавшийся комплекс  $\alpha_2\text{M}$ /протеаза быстро связывается с рецепторами, интернализуется клетками и подвергается протеолизу в их лизосомальном аппарате. Наиболее активно рассматриваемый комплекс расщепляют гепатоциты и макрофаги (Davidsen et al., 1985; Ogata et al., 1993). В связи с этим предполагают, что одна из первичных и главных функций  $\alpha_2\text{M}$  заключается в связывании эндогенных и экзогенных протеаз и удалении, таким образом, их из циркуляторного русла, где они могли бы вызвать нерегулируемый протеолиз. В этом смысле  $\alpha_2\text{M}$  может рассматриваться как рекогносцировочная система широкого спектра действия, направленная на идентификацию и маркировку протеаз для их последующего эндоцитоза и переваривания. Конформационные изменения в структуре  $\alpha_2\text{M}$  после его связывания с протеазами приводят к экспозиции С-терминального домена белковой цепи, который и является лигандом рецептора, опосредующего путем эндоцитоза клиренс образовавшихся комплексов. Рецептор комплекса  $\alpha_2\text{M}$ /протеаза у млекопитающих известен как белок родственной рецептору липопротеидов низкой плотности (Strickland et al., 1990; Kristensen et al., 1999). Этот рецептор (LRP — low density lipoprotein receptor-related protein) синтезируется в форме 600 кДа белка с одним трансмембранным доменом. Рецептор, наряду со связыванием комплекса  $\alpha_2\text{M}$ /протеаза, может взаимодействовать и с другими лигандами, такими как комплекс активатора плазминогена с его ингибитором 1-го типа (PAI-1), липазы липопротеинов, лактоферрин, экзотоксин А бактерий рода *Pseudomonas*, аполипопротеином Е-обогащенные хиломикроны жвачных (Hussain et al., 1991; Nykjaer et al., 1993; Mostrup et al., 1993). LRP относится, как и  $\alpha_2\text{M}$ , к древним

белкам, по-видимому, возникшим еще до эволюционной дихотомии первично- и вторичноротых. Он описан уже у нематоды *Caenorhabditis elegans* (Yochem, Greenwald, 1993). Обнаружение  $\alpha_2\text{M}$  у мечехвостов дает основание предположить наличие в их клетках и LRP подобных структур. Функциональная особенность  $\alpha_2\text{M}$  мечехвоста заключается в том, что он не подавляет активность ферментов каскада свертывания гемолимфы животного.

Известно, что кроме протеаз,  $\alpha_2\text{M}$  связывает и другие белки: пептидные митогены (James, 1990; Borth, 1992), катионные белки (Boide, Pryme, 1968; McPherson et al., 1970; Barrett, Starkey, 1973; Stollar, Rezuze, 1978; Peterson, Venge, 1987), ферритин (Santambrogio, Massover, 1989) и некоторые цитокины (ИЛ-1, ФНО $\alpha$ ). Для некоторых из этих белков связывание с  $\alpha_2\text{M}$  идет при условии активации тиозэфирной связи и формирования через его тиольную группу дисульфидной связи (Borth, Luger, 1989). Инактивация перечисленных белков может рассматриваться в фокусе оценки их роли в тех или иных иммунных реакциях животных организмов, многие стороны которой остаются предметом дальнейших исследований.

## **2. 7. Липополисахаридсвязывающий белок как звено рекогносцировочной системы врожденного иммунитета**

Липополисахарид, или эндотоксин, является ведущим структурным и маркерным компонентом внешнего слоя наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Шлегель, 1987). Схематически клеточные структуры грамотрицательных и грамположительных бактерий отражены на рис. 4. Для иммунной системы животных липополисахарид имеет двоякое значение. Во-первых, как молекула-носитель двух патогенассоциированных молекулярных паттернов (терминально локализованных остатков маннозы в составе О-антигена и липида А) (рис. 5) он распознается специализированными паттерн-рекогносцировочными рецепторами (молекулами), среди которых наиболее значимыми являются маннозо(маннан)связывающий лектин (МСЛ) (Kawasaki et al., 1978; Wild et al., 1983; Lee et al., 1992; Turner, 1996) и липополисахаридсвязывающий белок (ЛСБ) (Tobias et al., 1986, 1992) плазмы крови млекопитающих. Это связывание мобилизует иммунные механизмы защиты животных от инфекции (система комплемента, нейтрофилы, моноциты/макрофаги, тучные клетки, дендритные клетки), направленные на элиминацию эндотоксинов и их носителей. Во-вторых, избыточное «наводнение» липополисахаридами внутренней среды некоторых животных (мышь) и человека приводит к гиперактивации иммунной системы, продукции большого количества провоспалительных

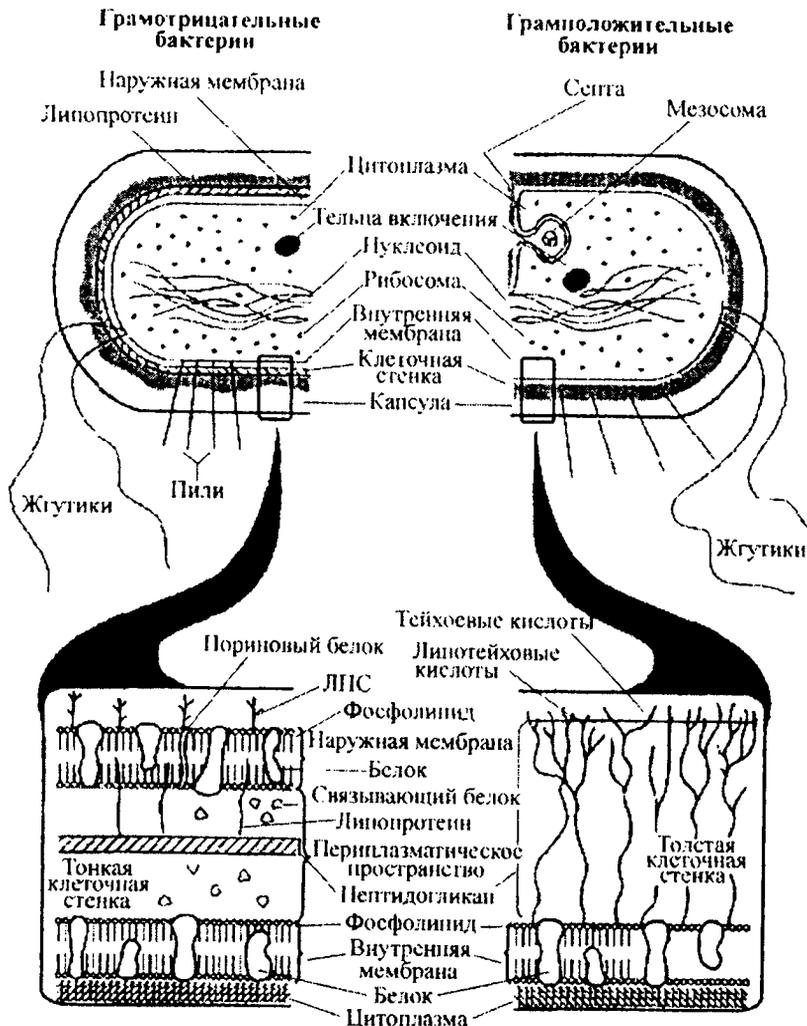


Рис. 4. Схема клеточной структуры грамотрицательных и грамположительных бактерий.

цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6), которые инициируют, наряду с защитными, и патологические реакции (гипотензия, мультиорганные нарушения, связанные с диссеминированной внутрисосудистой коагуляцией, оксидативный стресс). Комплекс последних составляет синдром эндотоксического (септического) шока (Beutler, 1999). Даже в развитых странах септический шок может являться непосредственной причиной смерти 40—70 % инфицированных грамотрицательными бактериями пациентов, поэтому

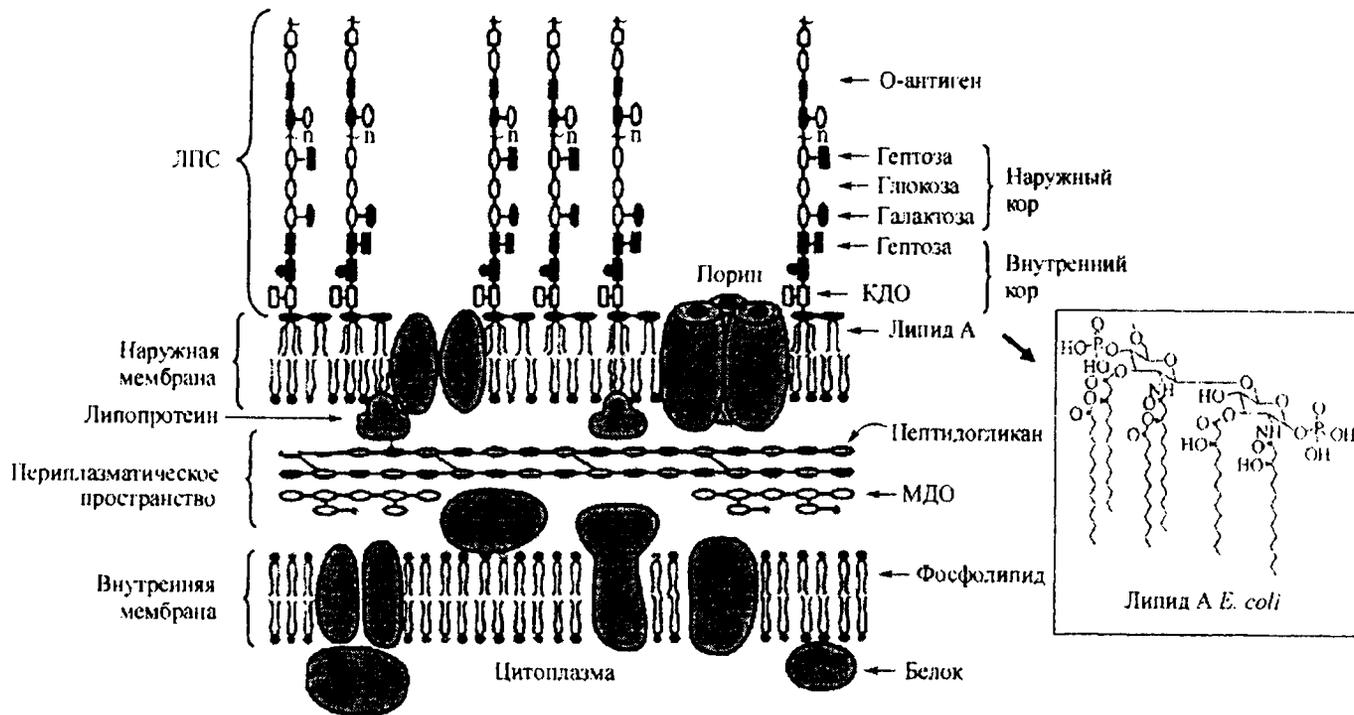


Рис. 5. Строение клеточной оболочки грамотрицательных бактерий (по: Ractz, 1990).

разработка соответствующей патогенетической терапии остается весьма актуальной проблемой в медицинской практике. Ее обоснование и рациональное применение возможны при условии четкого понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе детекции и последующей элиминации эндотоксинов.

В связи с особой значимостью присутствия липополисахарида (ЛПС) в оболочке грамотрицательных бактерий и реакций иммунной системы на эту группу микроорганизмов следует кратко рассмотреть современное представление о структуре эндотоксинов (Raetz, 1990; Rietschel, Brade, 1992; Morrison et al., 1994). Липополисахарид (эндотоксин) наружной мембраны является «визитной карточкой» грамотрицательных бактерий, он 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 абеквобы, маннозы, рамнозы, галактозы и глюкозы, которая, как правило, выступает над поверхностью клеточной оболочки (рис. 5) и сердцевинной (коровой) части, которая в качестве основных структурных компонентов содержит несколько молекул 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО), гексозы, этаноламин и фосфорную кислоту. Три остатка КДО образуют структурный блок, связывающий двухвалентные катионы магния и кальция. Комплекс КДО с катионами определяет в значительной степени некоторые структурно-функциональные свойства внешнего слоя наружной 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 непроницаемая для гидрофобных соединений наружная мембрана в этих условиях начинает пропускать их внутрь клеточной стенки. Серцевинный полисахарид ковалентно связан с липидом А, формирующим внешний слой наружной мембраны бактерий. Таким образом, структура наружной мембраны асимметрична, поскольку липополисахарид локализован исключительно в ее внешнем слое.

Липид А является частью молекулы липополисахарида, ответственной за большинство проявлений эндотоксического шока (Gmeiner et al., 1969). Поэтому не случайно, что в животном организме существует многокомпонентная система выявления и нейтрализации как этого соединения, так и всей молекулы эндотоксина в целом. Наиболее чувствительными эндогенными детекторами липида А у позвоночных животных являются ЛСБ (Tobias et al., 1988), бактерицидный проницаемость-увеличивающий белок

нейтрофилов (Elsbach, Weiss, 1980) и лактоферрин (Appelmelk et al., 1994; Elass-Rochard, 1998).

ЛСБ конститутивно синтезируется гепатоцитами и секретируется в кровь в форме гликозилированного 58 кДа белка (Tobias et al., 1989), содержание которого в плазме кролика возрастает при инфицировании макроорганизма до 50 мкг/мл в течение первых суток. Подъем уровня белка у человека в период «острой фазы» не так заметен, поскольку его количество в крови достаточно и в норме. ЛСБ имеет тенденцию связываться с низкой аффинностью с сывороточными липопротеидами высокой плотности. Специфическое же связывание ЛСБ в плазме наблюдается с липополисахаридами грамотрицательных бактерий (Tobias et al., 1989; Schumann, 1992). Именно комплекс ЛПС/ЛСБ обладает многими иммуномодулирующими свойствами. В настоящее время расшифрованы основные механизмы ЛСБ-опосредованного действия липополисахаридов на иммунную систему животных и человека. Они связаны в основном со способностью рассматриваемого комплекса взаимодействовать с рецептором эндотоксина на моноцитах/макрофагах, дендритных клетках и нейтрофилах, которым является мембраноассоциированный белок клеток CD14. Этот белок был открыт в 1990 г. в мононуклеарных фагоцитах как лейцин-богатый гликопротеин с молекулярной массой около 55 кДа, заякоренный в цитоплазматической мембране клеток гликозилфосфоинозитольной ножкой (Wright et al., 1990). CD14 рецептирует либо свободные ЛПС-молекулы, либо предварительно избирательно связанные с ЛСБ (Tobias et al., 1988, 1989). ЛСБ является своеобразным катализатором переноса ЛПС на CD14 (Tobias et al., 1995; Yu, Wright, 1996; Yu et al., 1997). Связывание эндотоксина с CD14 способно вызывать продукцию провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ) макрофагами и обеспечивать последующий эндоцитоз липополисахарида с его перевариванием (Wright et al., 1990; Ulevitch et al., 1990). Длительное время оставалось непонятым, каким образом лигирование ЛПС рецептором CD14, который лишен внутриклеточного домена, приводит к запуску пути сигнальной трансдукции, завершающемуся синтезом клеткой провоспалительных цитокинов. К настоящему времени получены экспериментальные и генетические доказательства необходимости участия в рассматриваемом процессе наряду с CD14-молекулой так называемого Толл-подобного рецептора-4 (Beutler, 2000).

ЛСБ и бактерицидный проникаемостьувеличивающий белок (БПУБ) из нейтрофилов связывают эндотоксин путем взаимодействия с его ацильными цепями фосфатидилхолина (Beamer et al., 1997). Благодаря передаче ЛПС от ЛСБ к CD14 происходит концентрирование эндотоксина на поверхности клеток хозяина и их реагирование на это взаимодействие. Представляют интерес

данные о том, что в зависимости от микроокружения в организме хозяина *Salmonella typhimurium* могут регулировать уровень ацилирования липида А и, таким образом, противодействовать иммунным механизмам распознавания и элиминации патогена (Guo et al., 1998; Darveau, 1998). Необходимо подчеркнуть, что в силу своего кислого характера липополисахариды являются мишенью антимикробных катионных пептидов и белков (дефенсины, протегрины, цекропины, БПУБ, лактоферрин и т. д.). Эти исследования важны в плане понимания механизмов элиминации грамотрицательных бактерий (Hancock et al., 2000). Таким образом, через ЛСБ и CD14 липополисахариды мобилизуют механизмы врожденного иммунитета животных, внешним проявлением активации которых является синтез провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ). Гиперпродукция провоспалительных цитокинов часто приводит к синдрому, известному как септический шок.

Шоковая реакция некоторых млекопитающих (мышь, человек) на повышенный уровень липополисахаридов является относительно «молодой» в эволюции животного мира (Beutler, 2000). Рыбы, амфибии, рептилии, птицы и некоторые млекопитающие (крысы, бабуины) не реагируют по типу септического шока на парентеральное введение липополисахаридов грамотрицательных бактерий (Berczi et al., 1966). Гиперчувствительность к эндотоксину, скорее всего, является исключением в мире позвоночных животных (в эмбриогенезе у птиц, копытные, кролик, мышь и человек). Первоначально полагали, что она была связана с прямым разрушающим воздействием ЛПС на цитоплазматические мембраны клеток. Сейчас же мы знаем, что эта реакция опосредована клетками лимфоидной и моноцитарно/макрофагальной природы. Токсическое же действие ЛПС на клетки животного организма опосредовано интенсивной продукцией ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  (Beutler et al., 1985), продуцируемых макрофагами вследствие взаимодействия с эндотоксином (Freudenberg et al., 1986).

Предварительные данные, свидетельствующие об участии в рецептировании ЛПС ряда белковых факторов, помимо CD14, были получены в ходе молекулярно-генетических экспериментов на мышах. Еще в 1968 г. Шульццер показал, что мыши линии СЗН/HeJ являются резистентными к липополисахаридам (Sultzzer, 1968), что, как выяснилось спустя десять лет, было детерминировано одним из аллельных генов так называемого Lps-локуса (Watson et al., 1977, 1978). Мутация лишь в одном гене приводила к блокированию пути трансдукции сигнала, вызываемого ЛПС. При рефрактерности к ЛПС мышей линии СЗН/HeJ они оказались тем не менее высокочувствительными к инфекции грамотрицательной этиологии (O'Brien et al., 1980). Эти данные свидетельствовали о том, что рецепция ЛПС с последующей трансдукцией сигнала внутрь клеток необходима для адекватного реагирования

клеток иммунной системы на инфекцию. Выяснилось, что трансдукционный путь передачи информации о детекции ЛПС связан с Толл-подобными рецепторами (ТПР), с которыми взаимодействует CD14 после связывания с ним эндотоксина. Рецепторы этой группы первоначально были открыты у *Drosophila melanogaster* в связи с их ролью в эмбриональном морфогенезе (Anderson, 2000), а в последующих периодах онтогенеза насекомого они отвечают за формирование у них иммунитета к грибковой инфекции (Lemaitre et al., 1996). Генетическими исследованиями было выявлено, что в *Lps*-локусе мышей находится один ген высоко гомологичный гену Толл-рецептора дрозофилы (Poltorak et al., 1998). Ген отвечает за синтез белка, принадлежащего к группе рецепторов-сирот (orphan receptor), который в настоящее время получил наименование Толл-подобного рецептора-4 (Toll-like receptor-4) и, как выяснилось, именно он имеет прямое отношение к характеру реагирования мышей на липополисахариды (Poltorak et al., 1998). Делеция в анализируемом локусе мышей приводит к потере реактивности животных на введенные липополисахариды (Hoshino et al., 1999). Подобные генетические локусы и соответствующие им рецепторы выявлены и у человека (Medzhitov et al., 1997).

Таким образом, ТПР4 является сигнальным рецептором для моноцитов/макрофагов, обеспечивающим детекцию патогенов, которые содержат липополисахариды. Рассматриваемый рецептор детектирует тетраацильную часть липида А липополисахаридов, запуская каскад сигнальной трансдукции, который приводит к активации транскрипционного фактора NF $\kappa$ B, ответственного за регуляцию генов ряда провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ). Внеклеточный домен (С-карбоксильная часть молекулы) ТПР4 чрезвычайно вариабелен у разных видов, в то время как внутриклеточный (N-концевой) достаточно консервативен. Структурные особенности внеклеточного домена могут определять видовую чувствительность животных к тем или иным эндотоксинам. Структурная стабильность в эволюции внутриклеточного домена отражает стереотипность путей трансдукции сигнала внутри клеток. Необходимо обратить внимание на то, что внутриклеточные домены Толл-подобных рецепторов и рецептора ИЛ-1 1-го типа гомологичны друг другу, в связи с чем они получили название TIR (Toll and IL-1R homologous region)-доменов (рис. 6). Это частично может объяснить известный факт поразительного сходства иммуномодулирующего действия липополисахаридов и ИЛ-1 на функциональную активность моноцитов/макрофагов.

После связывания ЛПС с CD14/ТПР4 рецепторным комплексом моноцитов/макрофагов наблюдается продукция клетками иммунной системы ряда физиологически активных веществ (провоспалительных цитокинов, адгезионных молекул), обеспечива-

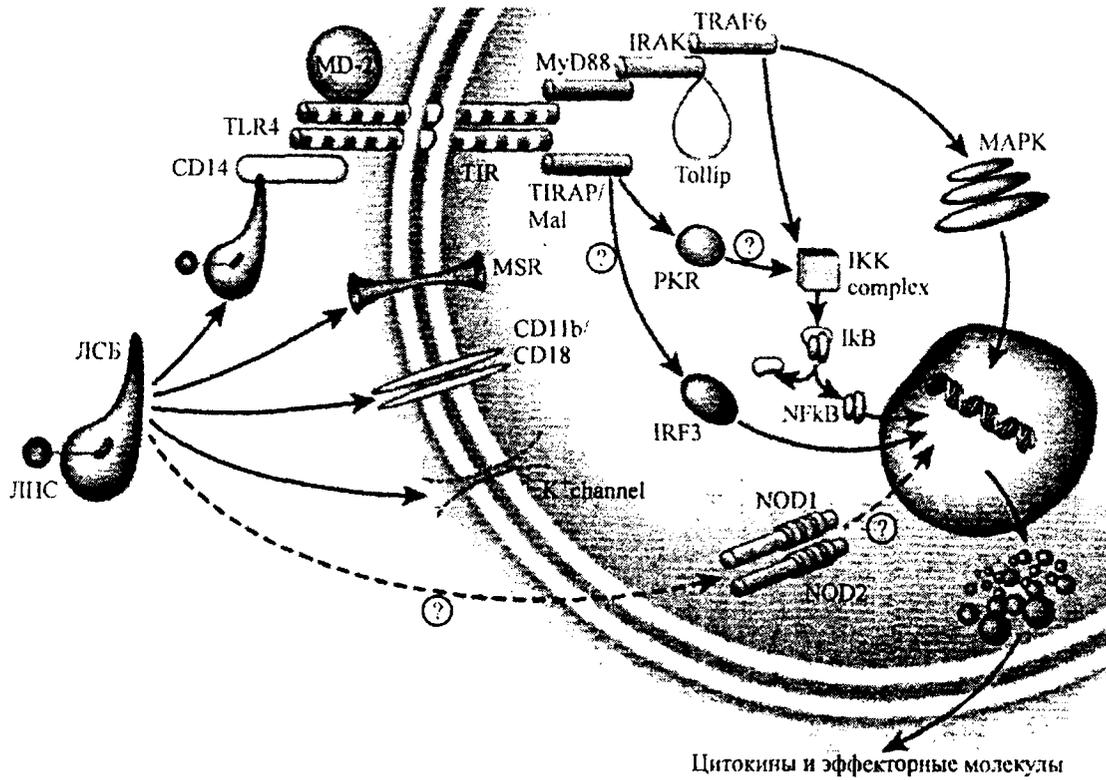


Рис. 6. Пути сигнальной трансдукции, инициируемой липополисахаридом грамотрицательных бактерий через Толл-подобный рецептор 4 (по: Cohen, 2002).

ющих мобилизацию дополнительных факторов резистентности к инфекции. В этом смысле ЛСБ/CD14/ТПР4-опосредованная детекция ЛПС во внутренней среде животного организма выполняет роль «сторожевой системы», реагирующей на микроколичества эндотоксина и мобилизующей механизмы нейтрализации и элиминации патогена.

Таким образом, ЛСБ может выполнять функции как опсонина, облегчающего макрофагальный фагоцитоз комплекса эндотоксин/ЛСБ, так и молекулы, осуществляющей докирование связанного ЛПС к рецепторному комплексу CD14/ТПР4, что позволяет рассматривать ЛСБ, CD14 и ТПР4 как структуры, относящиеся к паттернраспознающим рецепторам (молекулам).

## **2. 8. Толл- и Толл-подобные рецепторы как компоненты рекогносцировочного аппарата иммунной системы**

Выживание животных в среде, изобилующей потенциально патогенными для них микроорганизмами, возможно при условии наличия у них совокупности механизмов немедленного распознавания и элиминации микробов, формирующих эволюционно древнюю форму иммунитета, именуемого врожденным (примордиальным, конституциональным, естественным). Важную роль в становлении врожденного иммунитета играет система детекции (рекогниции, распознавания) чужеродных молекул и их носителей. Значимым достижением последнего десятилетия в этой области исследований являются данные о природе и характере взаимодействия с патогенассоциированными молекулярными паттернами группы рецепторов, известных как Толл-рецепторы (Toll receptors) у *Drosophila melanogaster* и Толл-подобные рецепторы (Toll-like receptors) у человека и мыши. Подобное экзотическое название рассматриваемой группе рецепторов дала известная немецкая исследовательница, лауреат Нобелевской премии по физиологии или медицине за 1996 г. Нюслен-Волхард. «Toll» переводится с немецкого как «невероятно» или «умопомрачительно». Именно так отреагировала Нюслен-Волхард на картину аномального эмбрионального развития *Drosophila melanogaster*, которую ей продемонстрировали сотрудники лаборатории. Этой группой исследователей анализировалась экспрессия набора генов в эмбриогенезе и их значимость в закладке органов и тканей насекомого (Anderson, 2000). Они широко использовали в своей работе методы молекулярной биологии по включению и выключению генов, имеющих отношение к морфогенезу. Ими было, в частности, выявлено критическое значение в закладке дорсовентральной оси тела дрозофилы рецепторов, которые и получили наименование «Толл-рецепторов». Уже другой группой ученых было установле-

но, что столь значимые для морфогенеза в эмбриональный период рецепторы у взрослых насекомых (имаго) имеют прямое отношение к формированию рекогносцировочных механизмов врожденного иммунитета (Lemaitre et al., 1996). Как выяснилось далее, взаимодействие компонентов микробных оболочек (липополисахариды, пептидогликаны, липотейхоевые кислоты, глипротеиды микобактерий, маннаны низших грибов) с клетками-носителями Толл-рецепторов инициирует в них процессы синтеза антимикробных пептидов и белков, которые участвуют в киллинге бактерий и низших грибов (Hoffmann et al., 1999). При этом одни рецепторы реагируют на липополисахариды, другие — на компоненты клеточной стенки низших грибов, третьи — на пептидогликаны и т. д. Подобная избирательность реагирования на лиганды патогенов (патогенассоциированных молекулярных паттернов — по: Janeway, 1992) рецепторов иммунных клеток организма определяет прицельность и эффективность иммунного реагирования животных на инфекцию. В последние годы выявлены Толл-подобные рецепторы, участвующие в дискриминации ДНК бактериального и животного происхождения, основанной на детекции степени метилирования цитозина в CpG-парах, которая почти на порядок выше в ДНК эукариот (Aderem, Hume, 2000). Рассматриваемое семейство рецепторов дополняет группу рецепторов, связанных с лектинами и формилметиониловыми пептидами, которые в совокупности обеспечивают эффективное распознавание «не-своего» как у беспозвоночных, так и позвоночных животных системой врожденного иммунитета (табл. 1).

Группа Толл-подобных рецепторов у млекопитающих (человек, мышь) представлена как на поверхности (ТПР2, ТПР4, ТПР5, ТПР6), так и в вакуолярном аппарате (ТПР2, ТПР7, ТПР8, ТПР9) клеток, имеющих отношение к защитным реакциям организма. Толл-подобные рецепторы у позвоночных экспрессируются на клетках мононуклеарной фагоцитирующей системы, дендритных клетках, нейтрофилах, базофилах и тучных клетках, эозинофилах, НК-клетках и эпителиоцитах (Janeway, Medzhitov, 2002), а у насекомых — на клетках жирового тела (функциональный аналог печени позвоночных) и амебоцитах (Hoffmann et al., 2003).

Гены и соответствующие им белки, принадлежащие к семейству Толл-подобных рецепторов, были выявлены и в клетках человека (Medzhitov et al., 1997). В настоящее время известно десять изоформ ТПР у человека и 12 у мыши (Rock et al., 1998; Beutler, 2004). Для многих из них установлены лиганды, а также молекулярные компоненты путей сигнальной трансдукции, приводящих к активации транскрипционных факторов, которые ответственны за регуляцию того или иного набора генов иммунного ответа у животных. У человека и мыши описано четыре адапторных бел-

ка, взаимодействующих с TIR-доменами TTP: MyD88 — myeloid differentiation factor 88; MAL/TIRAP — MyD88-adaptor-like/TIR-associated protein; TRIF — Toll-receptor-associated activator of interferon и TRAM-Toll-receptor-associated molecule. Эти адапторные белки обеспечивают проведение сигналов с TTP, IL1R, IL18R, благодаря гомофильному взаимодействию с TIR-доменами рецепторов, с одной стороны, и доменами смерти серин-треониновых протеинкиназ (IRAK, TBK1) — с другой (рис. 6, 7). Благодаря этим белкам формируются межбелковые контакты в проксимальных частях путей сигнальной трансдукции, которые завершаются активацией соответствующих транскрипционных факторов (NF $\kappa$ B, IRF3), транслоцирующихся из цитоплазмы в ядро и взаимодействующих со специфическими сайтами в области промоторов и энхансеров генов иммунного ответа.

Клетки иммунной системы человека экспрессируют в различных сочетаниях до десяти разнообразных Толл-подобных рецепторов, каждый из которых участвует в распознавании одного или группы патогенассоциированных молекулярных паттернов. Наибольшее внимание исследователей до настоящего времени было привлечено к TTP2 и TTP4. Последний рецептор имеет прямое отношение к распознаванию липополисахарида (эндотоксина) грамотрицательных бактерий, поскольку генетический нокаут его гена (*Ips*) приводит к потере «чувствительности» организма к этому соединению (Poltorak et al., 1998). Мыши с выключенным геном *Ips* резистентны к септическому шоку, вызываемому липополисахаридами, но чувствительны к инфекции грамотрицательной этиологии.

TTP2 ответственен за распознавание липопротеидов микобактериального происхождения (Brightbill et al., 1999; Aliprantis et al., 1999). Этот же рецептор в кооперации с TTP6 распознает пептидогликаны бактериальных стенок (Ozinsky et al., 2000). Другая система детекции чужеродных молекул опосредована TTP9 (Hemmi et al., 2000). С этим рецептором связана способность распознавать метилированные остатки цитозина в CpG-парах ДНК микробного и вирусного происхождения (Aderem, Hume, 2000; Aderem, Ulevith, 2000).

Первые рецепторы рассматриваемого семейства были выявлены у дрозофил в ходе анализа путей сигнальной трансдукции, контролирующей формирование дорсовентральной оси эмбриона плодовой мушки (Anderson et al., 1985; Hashimoto et al., 1988). Толл-гены ответственны за синтез трансмембранных белков с большим внеклеточным доменом, включающим множественные повторы, обогащенные аминокислотой лейцином (рис. 7). В эмбриогенезе рассматриваемые белки участвуют в межклеточных взаимодействиях, ответственных за морфогенетические процессы, а у взрослой мухи-имаго они опосредуют индуцибельные

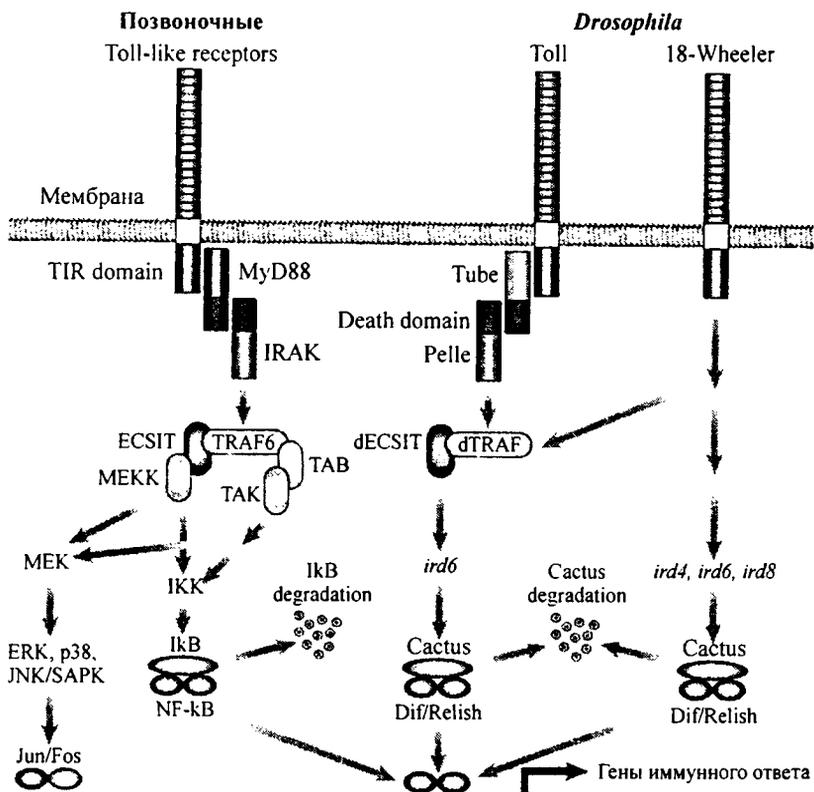


Рис. 7. Сравнение путей сигнальной трансдукции, активируемых Толл-подобными рецепторами позвоночных и Толл-рецепторами беспозвоночных.

реакции иммунной системы насекомого (Lemaitre et al., 1996). Белки, гомологичные Толл-рецепторам плодовой мушки, были вскоре обнаружены у человека (Medzhitov et al., 1997) и мыши (Poltorak et al., 1998). В силу структурной гомологии между белками млекопитающих и белками Толл-рецепторов плодовой мушки первые назвали Толл-подобными рецепторами. Функционально эти белки оказались связанными с рецепцией патогенассоциированных молекулярных паттернов клетками иммунной системы млекопитающих. В настоящее время у человека выявлено десять изоформ Толл-подобных рецепторов, каждый из которых самостоятельно или в сочетании с другими осуществляет избирательную детекцию какого-то одного или группы молекулярных паттернов. Как рассматривалось в предыдущем разделе, Толл-подобный рецептор 4 оказался ответственным за связывание с липидом А липополисахаридов грамотрицательных бактерий. Причем это ли-

гирование осуществляется внеклеточным лейцинобогатым доменом рецептора совместно с надмолекулярным комплексом липополисахаридсвязывающий белок/CD14/MD-2 белок (рис. 6, 7). Формирование многокомпонентного комплекса обеспечивает оптимальное связывание эндотоксина с TLR4 и запуск пути сигнальной трансдукции, приводящего к активации транскрипционного фактора NF $\kappa$ B (Belvin, Anderson, 1996). Последний связывается со специфическими сайтами промоторов и энхансеров более чем 150 генов, ответственных за синтез белков и пептидов, вовлеченных в той или иной степени в иммунный ответ организма на инфекцию (Ghosh et al., 1998; Zhang, Ghosh, 2001). Путь сигнальной трансдукции, инициируемый связыванием лиганда с TLR4, отображен на рис. 6 и 7. На этой же схеме отражен один из путей активации гомологичных по структуре NF $\kappa$ B фактору транскрипционных факторов дрозофилы (Dif/Relish), участвующих в иммунном реагировании насекомого на патогены грибковой и бактериальной этиологии. Поражает удивительное сходство ряда ключевых компонентов сравниваемых путей сигнальной трансдукции у животных, разделенных в эволюции несколькими сотнями миллионов лет (Hoffmann et al., 1999).

Среди соединений, синтез которых на генетическом уровне активируется транскрипционным белком NF $\kappa$ B, представлены цитокины: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО $\alpha$ , ЛТ $\alpha$ , ЛТ $\beta$ , GM-CSF, ИЛ-8; адгезионные факторы ICAM, VCAM, ELAM; костимуляторные молекулы CD40, CD80 и CD86; дефенсины, продуцируемые эпителиями (TAP, h $\beta$ D2, m $\beta$ D2). Многие из этих белков и пептидов в той или иной степени участвуют не только в реализации иммунного ответа врожденного типа, но и регулируют ряд реакций приобретенного иммунитета у позвоночных (Janeway, 1992; Fearon, Locksley, 1996). Отдельные стороны взаимодействия механизмов врожденного и приобретенного иммунитета будут рассмотрены в гл. 4.

Отличительной особенностью системы врожденного иммунитета является ее способность распознавать широкий спектр микроорганизмов, используя для этого ограниченный репертуар рецепторов. Структура некоторых из них отличается удивительным постоянством (инвариантностью) на протяжении сотен миллионов лет эволюции животных. Наиболее показательным примером консерватизма структуры некоторых рецепторов врожденного иммунитета являются Толл-рецепторы плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Hoffmann et al., 1999; Lemaitre, 2004) и гомологичные им Толл-подобные рецепторы человека и мыши (Akira, Hemmi, 2003). Объяснение установленному структурному сходству рецепторов лежит, по-видимому, в том, что их лиганды являются также мало изменяющимися в эволюции структурными компонентами микроорганизмов, получивших название патогене-

наассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП) (Janeway, 1989, 1992, 2002). По химической природе ПАМП относятся к липидам (липид А граммотрицательных бактерий), углеводам (маннаны, терминально локализованные остатки D-маннозы, L-фукозы, D-N-ацетилглюкозамина, D-глюкозы), пептидам (формилметиониловые пептиды инициальной последовательности синтезируемых белков бактерий, флагеллин жгутиков бактерий), ДНК (неметилированные по цитозину тандемы CpG ДНК бактерий и вирусов), РНК (двуспиральные и односпиральные РНК вирусов), гетеросоединениям (пептидогликаны, липотейхоевые соединения, липоарабиноманнан, липопротеиды). Для большинства из этих соединений характерно их присутствие преимущественно в мире микробов, а потому на их детекции в эволюции выстроилась комплексная система рецепторов врожденного иммунитета так называемых паттернраспознающих рецепторов (молекул) — ППР(М) (Janeway, 1989). Паттернраспознающие рецепторы самостоятельно либо в кооперации друг с другом и системой комплемента однозначно дискриминируют (различают) патогенное (инфекционное) «несвое» от неинфекционного «своего». Благодаря этому далее разворачиваются эффекторные механизмы иммунитета (фагоцитоз, активация системы комплемента, синтез цитокинов и антибиотических пептидов и др.), сфокусированные на носителе ПАМП и приводящие к элиминации патогенов и их молекул. Между изоформами Толл-рецепторов насекомых и Толл-подобных рецепторов млекопитающих существует специализация по преимущественному связыванию или реагированию на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн. Уже у дрозофилы Толл-рецептор (TR) реагирует на инфицирование грибами (Lemaitre et al., 1996), а гомологичный ему 18 Weeler рецептор — на бактериальную инфекцию (Imler, Hoffmann, 2000).

Представители этого суперсемейства рецепторов у человека были открыты в лаборатории Ч. Джэнуэя в 1997 г. (Medzhitov et al., 1997), а в лаборатории Б. Бьютлера был впервые изучен ТПР4 мыши, ответственный за реагирование клеток иммунной системы на эндотоксины (Poltorak et al., 1998; Quershi et al., 1999). Установлено, что каждая изоформа Толл-подобных рецепторов мыши и человека ответственна за детектирование какого-то одного типа или группы структурно сходных лигандов. За детекцию пептидогликанов оказались ответственны ТПР2 (Takeuchi et al., 1999) в кооперации с ТПР6 (Ozinsky et al., 2000). Флагеллин — белок жгутиков бактерий выявляется ТПР5 (Hayashi et al., 2001), а бактериальная ДНК — ТПР9 (Hemmi et al., 2000), ТПР4 лигирует непосредственно липополисахариды, а ТПР3 детектирует двуспиральную РНК вирусов (Alexopoulou et al., 2001). Спектр ПАМП для ТПР2, по-видимому, более разнообразен: пептидо-

гликаны и липопротеины бактерий, липоарабиноманнаны микробактерий, маннаны дрожжей. Есть сведения в пользу того, что предпочтение к тому или иному из лигандов формируется в ходе ассоциации ТПР2 с другими ТПР. Это доказано в случае детекции пептидогликанов связкой рецепторов ТПР2 и ТПР6 (Schwander et al., 1999; Iyshimura et al., 1999). В настоящее время доказано, что гетерологичная (как в случае ТПР2 и ТПР6) или гомологичная (в случае ТПР3, ТПР4, ТПР9 и др.) димеризация Толл-подобных рецепторов является необходимым условием инициации пути сигнальной трансдукции в результате связывания патогенассоциированных молекулярных паттернов (Beutler, 2004). У человека и мыши липополисахариды взаимодействуют с Толл-подобными рецепторами непосредственно, будучи докированными к ним в форме двойного (ЛПС/CD14) или тройного (ЛПС/ЛСБ/CD14) комплекса (Beutler, 2004). Следует обратить внимание, что в случае ТПР4 возможны как минимум два пути сигнальной трансдукции, приводящие к активации различных факторов инициации транскрипции и, как следствие, к несколько различающимся спектрам синтезируемых цитокинов (рис. 8). Основной путь, рассмотренный нами ранее в связи с активацией транскрипционного фактора NF $\kappa$ B, в своей проксимальной внутриклеточной части сопряжен с гетеродимерным комплексом, состоящим из белков MyD88 и MAL/TIRAP. Параллельный ему путь сигнальной трансдукции, иницируемый также связыванием липополисахаридов с ТПР4, в качестве инициального внутриклеточного звена включает гетеродимерный комплекс TRAM/TRIF, который, мобилизуя киназу TBK1 (TANK-binding kinase 1), создает условия для фосфорилирования и переноса в ядро транскрипционного белка IRF3 (interferon regulatory factor 3). Последний может активироваться также в результате разворачивания пути сигнальной трансдукции, который начинается с ТПР3, ответственного за детектирование двуспиральных РНК вирусов или их молекулярных имитаторов (полиинозин/цитозин). В ядре фосфорилированный IRF3 связывается с регуляторными сайтами ряда генов (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , RANTES, IP-10), иницируя их транскрипцию, завершающуюся синтезом цитокинов, которые необходимы в формировании защитных реакций организма.

Вопрос о том, являются ли флагеллин и ДНК бактерий непосредственными лигандами для Толл-подобных рецепторов млекопитающих или они иницируют пути сигнальной трансдукции опосредованно, как это имеет место в случае Толл-рецептора у дрозофилы, остается открытым до настоящего времени. Как однозначно установлено, молекулы микробного происхождения (ПАМП) не являются непосредственными лигандами Толл-рецепторов у насекомых. Компоненты грамположительных бактерий избирательно связываются циркулирующим в гемолимфе

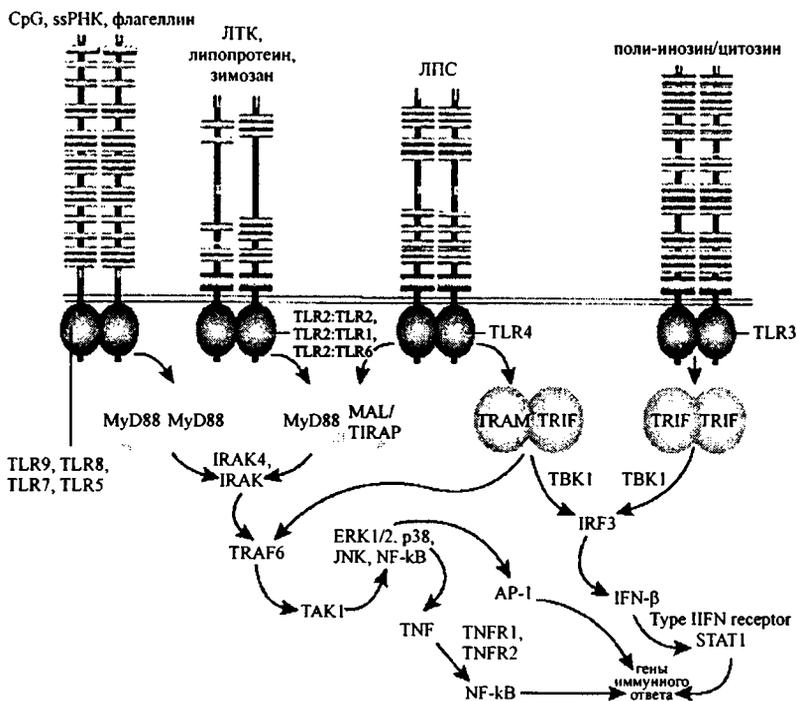


Рис. 8. Лигандная специализация Толл-подобных рецепторов млекопитающих (по: Beutler, 2004).

пептидогликанраспознающим белком (PGRP-SA-peptidoglycan-recognition protein-SA), что приводит к активации еще не до конца изученным путем сериновых протеиназ гемолимфы, осуществляющих путем ограниченного протеолиза выщепление из молекулы-предшественницы цитокиноподобного пептида «Spatzle». Слово «Spatzle» с немецкого переводится, как «калач», именно подобную форму этого хлебного изделия имеет третичную структуру рассматриваемый пептид, который является непосредственным лигандом Толл-рецептора клеток жирового тела дрозофилы (Hoffmann, 2003). В случае грибковой инфекции (Lemaite et al., 1996; Levashina et al., 1999) компоненты их клеточной стенки также активируют протеазный каскад, приводящий к образованию цитокина «Spatzle», который запускает путь сигнальной трансдукции с Толл-рецептора, завершающийся активацией транскрипционного фактора DIF (Dorsal-related immunity factor) у взрослого животного или Dorsal у личинки дрозофилы. Транслокация DIF или Dorsal в ядро инициирует транскрипцию генов иммунного ответа у насекомого и, в частности эффективного противогрибкового пептида дрозомидина.

Моноциты/макрофаги, незрелые дендритные клетки и эпителиальные клетки млекопитающих реагируют на взаимодействие со всеми рассмотренными ПАМП активацией транскрипционных факторов NFκB, AP1 и IRF3 и последующей продукцией цитокинов, хемокинов, адгезионных и костимулирующих молекул, антимикробных пептидов и белков (Underhill, Ozinsky, 2002; Beutler, 2004). Все эти физиологически активные соединения участвуют в реализации эффекторной фазы иммунного ответа врожденного типа на ПАМП, а также в той или иной степени оказывают регулирующее воздействие на реакции приобретенного иммунитета у позвоночных животных.

## **2. 9. Транскрипционный фактор NFκB и родственные ему белки**

NFκB был открыт в лаборатории Д. Балтимора (США) при изучении механизмов регуляции гена, ответственного за синтез легкой κ-цепи иммуноглобулинов в В-лимфоцитах мыши (Sen, Baltimore, 1986; Baldwin, 1996). В синтезирующих иммуноглобулины лимфоцитах он был выявлен в ядре клеток, что и послужило основанием для принятого в литературе названия: Nuclear Factor κB—NFκB.

В дальнейшем выяснилось, что рассматриваемый транскрипционный фактор встречается практически во всех клетках человека, причем его первоначальная после синтеза локализация является цитоплазматической, где он находится в связанном состоянии со своим ингибитором (Inhibitor κB—IκB) (Baeuerle, Baltimore, 1988). Процесс активации NFκB является многостадийным. Он инициируется многочисленными химическими, физическими и биологическими факторами при стрессе и инфицировании животных и человека. Каскады активации NFκB начинаются после связывания лигандов с рецепторами некоторых цитокинов (IL1R, IL18R) и Толл-подобными рецепторами (рис. 6, 7). Многоступенчатый процесс сигнальной трансдукции завершается фосфорилированием IκB с его последующим протеолизом в протеасомах и транслокацией «освобожденного» от ингибитора NFκB в ядро (Beg, Baldwin, 1993). В ядре NFκB выполняет свою функцию транскрипционного фактора, связываясь со специфическим сайтом κB (5'-GGGpuNpυCC-3') в промоторах и энхансерах более чем 150 генов.

По своей структурной организации NFκB и родственные ему белки являются димерами, состоящими из субъединиц p50 (NFκB1), p52 (NFκB2), p65 (RelA), Rel (c-Rel) и RelB. NFκB представляет собой гетеродимер, образованный путем нековалентного связывания субъединиц p50 и p65 (RelA) с молекулярными массами около 50 и

65 кДа соответственно. В структуре всех пяти субъединиц выявлены участки RHD (от англ. Rel Homology Domain), ранее описанные при изучении онкогена *rel*, поэтому все вместе они составляют семейство NFκB/Rel белков. У дрозофилы к этой группе принадлежат транскрипционные факторы Dorsal, Dif, Relish. N-концевой RHD домен белков NFκB/Rel семейства является консервативной в эволюции структурой, и именно он ответственен за связывание с κB-сайтом промоторов и энхансеров многих генов белков иммунитета, воспаления и стресса. В C-концевых доменах белков-предшественников субъединиц p50 и p52 представлены последовательности с анкириновыми повторами. В ходе процессинга они отщепляются от молекул p105/p50 (NFκB1) и p100/p52 (NFκB2) соответственно. Кроме того, анкириновые повторы характерны для ингибиторов NFκB—IkBa, IkBβ, Bcl-3, cactus. Именно эти домены маскируют в комплексе NFκB/IκB сигнальные последовательности NFκB, которые определяют конечную ядерную локализацию транскрипционного фактора (nuclear localization sequence — NLS). Наиболее распространенным вариантом NFκB, участвующим в активации генов иммунного ответа и стресса, является гетеродимер p50/p65 (RelA). Функциональная активность именно этой формы транскрипционного фактора будет рассматриваться нами далее. В большинстве клеток млекопитающих NFκB после синтеза располагается в комплексе с IkBa или IkBβ в цитоплазме. Стрессорные воздействия на организм или его инфицирование инициируют по рецепторопосредованному механизму каскад активации NFκB у млекопитающих и Dif/Relish в клетках дрозофилы.

На рис. 7 представлены каскады активации NFκB/Rel транскрипционных факторов у мыши и плодовой мушки. Лигандом, запускающим путь активации Dorsal и Dif транскрипционных факторов дрозофилы, является эндогенный цистинсодержащий пептид, именуемый в литературе как «Spätzle». В случае активации транскрипционного фактора Dorsal, ответственного за регуляцию транскрипции гена антигрибкового пептида под названием «дрозомицин», образование лиганда Толл-рецептора (TR) происходит при участии каскада сериновых протеиназ (Hoffmann et al., 2002). Нокаут по ингибиторам сериновых протеиназ (серпинам) у *D. melanogaster* приводит к конститутивной генерации «Spatzle» и, как следствие, неиндуцированному непрерывному синтезу дрозомидина (Levashina et al., 1999). Протеолитический каскад, формирующий лиганд Толл-рецептора, запускается компонентами микробной стенки. В данном конкретном случае это, по-видимому, маннаны низших грибов.

Существуют и особенности в лигировании липополисахаридов Толл-подобным рецептором четвертого типа (ТПР4) моноцитов/макрофагов у млекопитающих (Poltorak et al., 1998). Как правило, детекцию свободного липополисахарида во внутрен-

ней среде животного осуществляет специализированный белок, названный липополисахаридсвязывающим белком (ЛСБ) (Schumann et al., 1990). В отличие от маннозсвязывающего лектина (МСЛ) этот белок распознает эндотоксины по их относительно консервативной части — липиду А. Комплекс ЛСБ/липополисахарид переносится и докируется к молекуле CD14, локализованной на поверхности иммунных клеток (моноциты/макрофаги, В-лимфоциты, нейтрофилы) и являющейся рецептором эндотоксина (Wright et al., 1990). Есть данные и о возможности прямого, неопосредованного ЛСБ, связывания липополисахаридов с CD14. Особенностью CD14 как рецептора, лигирующего эндотоксин, является отсутствие у него внутриклеточного домена. В силу этого связывание им липополисахаридов не приводит к инициации какого-либо каскада трансдукции сигнала. Условия для запуска пути сигнальной трансдукции в макрофагах возникают в случае кооперации CD14 с TTP4. CD14-рецептор эстафетно передает липополисахарид рецептору TTP4. Последний благодаря особенностям структуры своего внеклеточного домена, представляющего наличие повторяющихся аминокислотных последовательностей, которые обогащены лейцином (LRR-leucine-rich repeat), эффективно связывает эндотоксин за счет гидрофобных взаимодействий между липополисахаридом и белком. Подобное связывание, осуществляемое одновременно двумя пространственно сближенными молекулами TTP4 в присутствии вспомогательного белка MD-2, инициирует запуск пути сигнальной трансдукции, ведущий к активации NFκB. Сходно этот процесс протекает в клетках жирового тела и гемоцитах дрозофилы после лигирования Толл-рецептором пептида «Spatzle», образование которого было инициировано маннаны низших грибов (Lemaitre et al., 1996). Необходимость сближения двух молекул TTP4 у мышей или TP у дрозофилы связана с созданием условий для взаимодействия внутриклеточных доменов этих рецепторов с белком Myd88 (myeloid differentiation factor 88) у мыши и частично гомологичным ему белком Tube у дрозофилы (рис. 7). Эти домены получили название TIR (Toll/IL-1 Receptor homologous region) вследствие того, что они оказались практически идентичными у внутриклеточных частей TTP и рецептора I типа ИЛ-1. Это открытие позволило понять сходство иммуномодулирующих эффектов эндотоксинов и цитокина ИЛ-1, известное иммунологам еще с 70—80-х г. XX в. Несмотря на различия в лигандах и структуре внеклеточных доменов TTP4 и рецептора ИЛ-1, тождественный характер структуры их внутриклеточных доменов определяет возможность реализации общего пути сигнальной трансдукции (рис. 6, 7), завершающегося активацией NFκB. Ассоциированный с Толл-подобными рецепторами белок Myd88 (или Tube у дрозофилы), обеспечивает уже за счет присутствия в его структуре разновидности домена смерти (death domain) образование внутриклеточного комплекса с IRAK-киназа-

ми (IL-1 receptor-associated kinase). У насекомых структурно-функциональными гомологами IRAK-киназ является белок Pelle. Эти киназы, осуществляющие фосфорилирование белков по остаткам серина и треонина (серин, треониновые киназы), мобилизуют адапторный белок TRAF6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6). Все эти межмолекулярные взаимодействия приводят к активации комплекса IκB киназы (Inhibitory κB kinase — IKK), фосфорилирующего ингибитор IκB. Фосфорилирование последнего приводит к его отсоединению от NFκB, последующему убиквитилированию и протеолизу в протеасомах. Свободный NFκB с экспонированным участком сигнала ядерной локализации транслоцируется в ядро, где и осуществляет после связывания со специфическими для него сайтами ДНК регуляцию генов иммунного ответа. Сходные по структуре рассмотренным белкам млекопитающих факторы участвуют в активации генов иммунного ответа у дрозофилы (dTRAF2), реализуемой через фосфорилирование и последующий протеолиз ингибитора транскрипционных факторов под названием Cactus и транслокации Dorsal в ядро. Компоненты каскада, связывающие TRAF6 (dTRAF1/6) и IKK (dIKK), также описаны в настоящее время и один из них известен как ECSIT (evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathway), который сопряжен с MAP-киназой киназы 1 (MAP-ECSIT kinase kinase-1, или MEKK1) (Kopp et al., 1999). Следует обратить внимание на то обстоятельство, что как у млекопитающих, так и у насекомых в каскадах активации NFκB и Dif/Relish после звена TRAF (dTRAF1/6) наблюдается разветвление цепи, приводящее к возможности активации одного и того же транскрипционного фактора разными путями, а также вовлечению в регуляционную систему других транскрипционных факторов (AP-1, Elk-1, c-Jun) (Zhang, Ghosh, 2001). Все это свидетельствует о сложности путей, определяющих активацию только нескольких транс-факторов, значимых в иммунном реагировании животных на патогены. Но один из важных выводов, базирующийся на рассмотренном материале, заключается в том, что многие молекулярные звенья реализации иммунных реакций врожденного типа у млекопитающих и насекомых паразитально сходны по своей структуре и характеру функционирования (Hoffmann et al., 1999, 2002). Как в связи с этим не вспомнить о концепции академика А. М. Уголева о стереотипных структурно-функциональных блоках, достаточно консервативных по своей химической природе, комбинация которых обеспечивает удивительное многообразие регуляторных механизмов живых систем (Уголев, 1985).

Отмечая структурно-функциональное сходство ряда ключевых белков и путей сигнальной трансдукции, связанных с Толл и Толл-подобными рецепторами, необходимо отметить и существующие между ними различия у насекомых и млекопитающих. Во-первых, непосредственным лигандом Толл-рецептора у дро-

зофилы является эндогенный пептид «Spatzle», индуктивное образование которого из белка-предшественника осуществляется каскадом сериновых протеиназ, активируемых ПАМП (например, маннаны дрожжей). Для большинства же Толл-подобных рецепторов млекопитающих установлено, что их непосредственными лигандами являются ПАМП. Во-вторых, белки Tube (дрозофила) и MyD88 (млекопитающие) каскадов сигнальной трансдукции имеют между собой только частичную структурную гомологию. Наконец, у дрозофилы гомолог ИКК комплекса млекопитающих до настоящего времени достоверно не описан.

Установленное разделение специфичности лигандов для изоформ Толл-подобных рецепторов (табл. 1) свидетельствует о том, что уже в рамках блока механизмов врожденного иммунитета у животных наблюдается избирательное реагирование на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн. Так, каскад, начинающийся с Толл-рецептора у *D. melanogaster*, реагирует на грибковую инфекцию насекомого, в то время как защита от бактерий связана с родственным ему 18-Wheeler рецептором. В результате инициации того или иного пути активируются разные группы генов, белковые продукты которых являются антибиотическими пептидами, наиболее эффективно поражающими биологический источник ПАМП. В случае инфицирования дрозофил грибковой инфекцией через Толл-рецептор запускается каскад активации трансфактора Dif/Relish, регулирующего активность гена дрозомидина — наиболее эффективного в отношении низших грибов антимикробного пептида (Hoffmann et al., 1999). При бактериальном вторжении иммунная система дрозофилы (жировое тело, амебоциты гемолимфы, клетки кутикулы) через 18-Wheeler рецептор запускает каскад активации трансфакторов и регулируемых ими генов, которые ответственны за синтез дефенсинов, цекропинов и других бактерицидных пептидов. В системе Толл-подобных рецепторов у млекопитающих также наблюдается разделение функций между отдельными ее представителями (табл. 1). Так, ТПР4 реагирует преимущественно на липополисахариды, ТПР5 — на белок жгутиков бактерий флагеллин, ТПР3 — на двуспиральную РНК вирусов. Некоторые рецепторы, как например ТПР2, являются менее избирательными в отношении лигандов и могут реагировать на разнообразные ПАМП (пептидогликаны, липопротеиды бактерий, маннаны низших грибов и т. д.). В ряде случаев преимущественное связывание того или иного лиганда Толл-подобным рецептором 2 обусловлено кооперацией ТПР2 с другими изоформами ТПР. Это имеет место, например, при детекции пептидогликана грамположительных бактерий макрофагами, осуществляемое кооперативно ТПР2 и ТПР6 (Ozinsky et al., 2000). Возможно, что это достаточно распространенный механизм функционирования паттернраспознающих рецепторных

молекул. Установлено, что активация NF $\kappa$ B, опосредованная TПP4, приводит к продукции дендритными клетками и моноцитами/макрофагами цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО $\alpha$  и экспрессии ими на своей поверхности костимулирующих молекул CD40, B7.1 (CD80) и B7.2 (CD86), необходимых для межклеточных взаимодействий на уровне региональных лимфатических узлов, которые активируют функционирование Т-лимфоцитов. Таким образом, у позвоночных специализированное реагирование на тот или иной патогенассоциированный молекулярный паттерн рецепторами системы врожденного иммунитета является одним из необходимых условий для формирования протективного иммунного ответа приобретенного типа (Medzhitov, Janeway, 2000) (рис. 9).

Некоторые из рассмотренных каскадов активации генов иммунного ответа находятся под регулирующим воздействием со стороны ряда внутриклеточных факторов, известных как супрессоры цитокиновой сигнализации (suppressors of cytokine signaling — SOCS) (Heeg, Dalpke, 2003; Ilangumaran, Rottapel, 2003). Эти белки были открыты в качестве ингибиторов YAK-киназ (Endo et al., 1997), участвующих в каскадах сигнальной трансдукции, инициируемых рядом цитокинов (интерфероны, ИЛ-6, GM-CSF). Семейство SOCS-белков у млекопитающих состоит из 8 членов, характерной структурной особенностью которых является наличие в их составе SH2-домена (src-homology домен второго типа). Этот домен ответственен за избирательное связывание SOCS-белков с белками фосфорилированными по остаткам тирозина. Их связывание с YAK-киназами приводит к ингибированию активности последних и всех путей сигнальной трансдукции, в которых рассматриваемые киназы являются ведущими звеньями. Синтез этих белков в клетках иммунной системы индуцируется ИЛ-1 и ФНО $\alpha$  (Bode et al., 1999, 2001), что приводит к опосредованному SOCS-белками ингибированию путей сигнальной трансдукции ИФН $\gamma$ , GM-CSF, ИЛ-6. Некоторые лиганды Толл-подобных рецепторов (липополисахариды, неметилованные по цитозину CpG тандемы ДНК) также инициируют активацию SOCS-белков, независимую от синтеза белка *de novo* (Stoiber et al., 1999; Dalpke et al., 2001). Эти данные дают основание думать, что SOCS-белки являются ингибиторами не только сигнальных путей, в которые вовлечены YAK/STAT-белки, но и некоторых TПP (TПP4, TПP9) (Kinjyo et al., 2002). В частности, они могут быть ответственны за толерантность к липополисахаридам (Nakagawa et al., 2002). Таким образом, семейство супрессоров цитокиновой сигнализации обеспечивает сдерживание гиперактивации некоторых путей сигнальной трансдукции цитокинов (ИЛ-1, ФНО $\alpha$ , ИФН $\gamma$ ), а также TПP4 и TПP9, регулируя по принципу отрицательной обратной связи адекватное реагирование клеток иммунной системы на

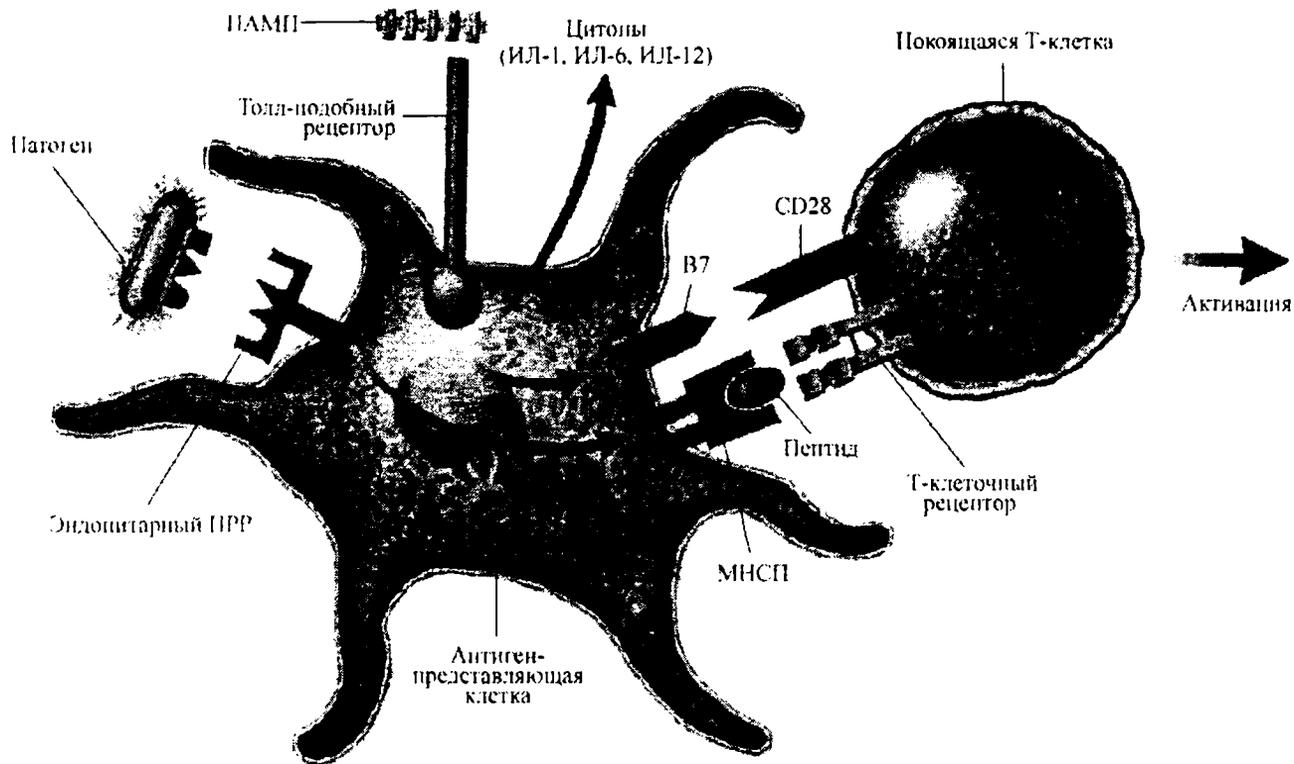


Рис. 9. Взаимодействие зрелой дендритной клетки с наивным Т-лимфоцитом в лимфоидном узле, определяющее инструктирующую роль анти-представляющей клетки в регуляции иммунного ответа приобретенного типа (по: Medzhitov, Janeway, 2000).

патогенассоциированные молекулярные паттерны и эндогенные цитокины, задействованные в мобилизации иммунных механизмов защиты макроорганизма от инфекции.

## **2. 10. NOD- и NALP-белки как представители внутриклеточных рецепторов, распознающих патогенассоциированные молекулярные паттерны**

Наряду с системой Толл-подобных рецепторов, в клетках человека выявлено два цитоплазматических белка NOD1 и NOD2 (рис. 6), в функционировании которых важную роль играет нуклеотидсвязывающий олигомеризационный домен (nucleotide-binding oligomerization domain — NOD) (Inohara et al., 1999; Ulevitch, 2004), или нуклеотидсвязывающий сайт (nucleotide-binding site — NBS) (Girardin et al., 2002). Кроме этого домена в состав рассматриваемых белков входят N-концевой каспазомобилизирующий домен (caspase recruitment domain — CARD) (Bertin et al., 1999; Inohara et al., 1999), которых у NOD2-белка два, и C-концевой домен, состоящий из повторов, обогащенных аминокислотой лейцином (leucine-rich repeat — LRR). Он структурно гомологичен экстрацеллюлярным доменам Толл-подобных рецепторов. Если последние участвуют преимущественно в распознавании патогенассоциированных молекулярных паттернов, представляемых внеклеточно (за исключением, по-видимому, ТПП9, ТПП8, ТПП7 и ТПП3), то NOD1 и NOD2 детектируют цитоплазматически локализованные ПАМП и внутриклеточные инфекционные агенты (Inohara et al., 2001; Girardin et al., 2001). Сходная распознающая патогены система описана у высших растений (Baker et al., 1997; Cohn et al., 2001; Dangel, Jones, 2001). Получены доказательства участия NOD1-белка в качестве внутриклеточного рецептора в детекции липополисахарида грамотрицательной бактерии *Shigella flexneri*, инфицирующей эпителиальные клетки человека (Girardin et al., 2001; Inohara et al., 2001), и некоторых компонентов пептидогликана: мурамилдипептиды, трипептиды с терминальной диаминопимелиновой аминокислотой (Girardin et al., 2001; Chamaillard et al., 2003). Лигандсвязывающим доменом этих белков является, скорее всего, последовательность, обогащенная лейциновыми повторами (LRR), а NOD (NBS) и в большей степени CARD домены участвуют в межбелковых взаимодействиях, формирующих пути сигнальной трансдукции, которые завершают активацией транскрипционного фактора NFκB и генов иммунного ответа (Girardin et al., 2002; Ulevitch, 2004). Многие звенья этих путей сигнальной трансдукции являются предметом пристального внимания со стороны исследователей, занимающихся изучением и разработкой терапевтических

средств, направленных на регуляцию активности иммунной системы человека и животных (Ulevitch, 2004).

Не только ТПП- и NOD-белки содержат в своем составе повторяющиеся домены, обогащенные лейцином (LRRs — leucine-rich repeats). Выявлено новое семейство белков, содержащих подобные структуры и локализованных внутриклеточно. Обычно они не содержат TIR-доменов, но включают домены другой природы (NACHT, CИТА, CARD, PYD и др.). Эти белки составляют семейство «гусеничных» белков (caterpillar protein family).

Среди них представляет интерес субсемейство NALP (Tschopp et al., 2003), включающее 14 белков. Наличие N-концевого домена PYD (pyrin domain), NACHT (domain present in neuronal apoptosis inhibitor protein — NAIP) и LRR (leucine-rich repeats) доменов характерно для всех представителей рассматриваемого субсемейства NALP (NACHT, LRR, Pyrin — NALP), за исключением NALP10. Наиболее изучена функциональная роль NALP1 белка. Функционально этот белок является внутриклеточным гомологом Толл-подобных рецепторов. Его домен, состоящий из обогащенных лейцином последовательностей, ответственен за детектирование цитоплазматически-локализованных патогенассоциированных молекулярных паттернов, взаимодействие с которыми создает конформационные предпосылки для взаимодействия PYD-домена NALP1 с PYD-доменом вспомогательного белка ASC. CARD-домен белка-посредника по принципу гомофильного взаимодействия связывает CARD каспазы-1, или интерлейкин-1 конвертирующего фермента. Дополнительное вовлечение в надмолекулярный комплекс каспазы-5 формирует структуру, получившую в литературе наименование инфламмосомы, которая осуществляет превращение проинтерлейкина 1 $\beta$  (p35 белка) в цитокин ИЛ-1 $\beta$  (p17 белок). Таким образом осуществляется активация одного из ключевых провоспалительных цитокинов иммунной системы человека, опосредуемая NALP1-белком как системообразующим компонентом инфламмосомы.

## **2. 11. Пептидогликанраспознающие белки как молекулярные факторы рекогносцировочной системы животных**

Наряду с Толл-подобным рецептором-2, который участвует в распознавании пептидогликанов микроорганизмов, в процессе эволюции у ряда животных возникла система циркулирующих и клеточно-ассоциированных пептидогликанраспознающих белков (Steiner, 2004). Представители этой группы паттернраспознающих рецепторов (молекул) выявлены у насекомых: *Drosophila melanogaster* (Werner et al., 2003; Royet, 2004), *Bombyx mori* (Ochiai, Ashida, 1999), *Trichoplusia ni* (Kang et al., 1998) и млекопитающих: мыши

(Kang et al., 1998), крупного рогатого скота (Tydell et al., 2002) и человека (Kang et al., 1998). У *D. melanogaster* белки этой группы (например, PGPR-SA) инициируют каскады сигнальной трансдукции, ведущие к активации генов, ответственных за синтез антимикробных пептидов (дрозомицин, цекропин, аттацин) (Steiner, 2004), а у шелкопряда *B. mori* — за активацию профенолоксидазной системы (Ochiai, Ashida, 1999). Пептидогликанраспознающий белок крупного рогатого скота, который локализован в гранулярном аппарате нейтрофилов и эозинофилов, оказывает прямое микробицидное действие на бактерии (Tydell et al., 2002). У человека функции гомологичного белка, выявленного по банку генетических данных, еще не изучены (Kang et al., 1998). Как бы то ни было можно заключить, что пептидогликанраспознающие белки являются составяющим звеном системы паттернраспознающих рецепторов.

## 2. 12. Система паттернраспознающих рецепторов

Система рецепторов и молекул, распознающих ПАМП, включает Толл- и Толл-подобные рецепторы, NOD-белки, CD14-рецептор, липополисахаридсвязывающий белок, маннозо(маннан)-связывающий лектин, маннозный рецептор макрофагов, пептидогликанраспознающие белки, сквенджер рецепторы, рецептор комплемента третьего типа (CR3) (табл. 6).

Система паттернраспознающих рецепторов (PPR) представлена в эволюции животного мира от губок до человека. Что касается Толл-подобных рецепторов, то уже у нематоды *C. elegans* и представителя хелицеровых мечехвоста *T. tridentatus* выявлены гены, родственные генам Толл-рецепторов дрозофилы и Толл-подобных рецепторов млекопитающих. У мечехвостов описана развитая система лектинов, распознающих липополисахариды и пептидогликаны бактерий. Все это однозначно свидетельствует о древнем происхождении рассматриваемой рекогносцировочной «несвое» (патогенное) системы иммунитета. Как и тот факт, что система внутриклеточных NOD-рецепторов животных (Inohara et al., 1999; Girardin et al., 2002; Ulevitch, 2004) гомологична рецепторной системе высших растений, представленной R-белками (Baker et al., 1997).

По-видимому, NOD-белки, наряду с лектинами, являются древними факторами распознающих «несвое» (патогенное) молекул в эволюции всего живого мира. Гомологичные по лейцинобогатым повторам NOD-белков домены представлены в составе Толл-подобных рецепторов млекопитающих. Избирательность взаимодействия этих рецепторов со своими лигандами различна, от узкой, характерной для ТПР4, до широкой, свойственной ТПР2.

Необходимо обратить внимание и еще на одну особенность паттернраспознающих рецепторов. Наряду с «внешними» лигандами,

## Паттернраспознающие рецепторы и их лиганды (Gordon, 2000)

Рецептор	Эндогенные лиганды	Экзогенные лиганды
Толл-подобные рецепторы	HSP-60, пептидогликанрецептирующие белки, фибриноген	Липополисахариды, пептидогликаны, липотейховые кислоты, флагеллин, неметилированные CpG в ДНК, ds РНК
CD14	Липополисахаридсвязывающий белок, апоптотические клетки, ЛПВП, HSP, фибриноген	Липополисахариды, пептидогликаны
CR3	iC3b, ICAM -1/2, фактор X, фибриноген, гепаран сульфат CD16 / CD23	Зимозан (β-гликан)
Скавенджер рецепторы А I/II	Модифицированные липопротеины низкой плотности, «старые» белки, апоптотические клетки	Липид А, липотейховые кислоты
MARCO	Модифицированные ЛПНП	Липополисахариды
Маннозный рецептор: – С-лектиновый домен – Цистеин-обогащенный домен	Маннозные и фукозные гликоконъюгаты, лизосомальные ферменты, миелопероксидаза, амилаза, тироглобулин, тиреоидстимулирующий гормон	Липополисахариды, липоарабоманнан, gp120 ВИЧ

являющимися, как правило, структурами микробных клеток и вирионов, многие ПРР имеют и «эндогенные» лиганды (Gordon, 2002). Часто это модифицированные или «стареющие» макромолекулы собственного организма животных либо молекулы, претерпевшие в силу разных причин изменения в клеточной локализации (hsp 60, лизосомальные гидролазы). Но среди них фигурируют многие соединения с неизменными структурными свойствами или локализацией (фибриноген, ЛПВП, лиотропин и т. д.) (табл. 6).

Обращает на себя внимание и тот факт, что активация генов иммунного ответа через ТРР также может осуществляться эндогенными лигандами (Gordon, 2002). Биологическая значимость активации некоторых генов иммунного ответа эндогенными («своими», непатогенными) компонентами клеток остается не

выясненной. Если исходить из концепции (Matzinger, 1994, 2002) о «сигналах опасности» (danger signals) как факторах, активирующих отдельные механизмы врожденного иммунитета животных, то можно допустить, что делокализованные неизменные молекулы собственного организма (hsps 60, 70, 90) могут выполнять функцию сигналов о нарушении клеточного и тканевого гомеостаза. Можно также предположить, что подобная клеточная реактивность значима в морфологических процессах на тех или иных стадиях эмбриогенеза животных, как это было установлено при изучении Толл-рецепторов у дрозофилы (Anderson et al., 1985; Anderson, 2000). В пользу этого могут говорить известные данные о том, что фагоциты млекопитающих (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, дендритные клетки) играют важную роль не только в защите от инфекции, но и в удалении стареющих клеток. Таким образом, распознавание микробных патогенассоциированных паттернов рекогносцировочной системой врожденного иммунитета может рассматриваться в качестве составной части широкой системы гомеостатического клиренса, направленного на поддержание постоянства внутренней среды многоклеточных организмов (Gordon, 2002). Функциональный дуализм отдельных представителей системы паттернраспознающих рецепторов достаточно очевиден на ряде примеров.

CR3 является  $\beta$ 2-интегрином, известным также как CD18/CD11b, он играет ключевую роль в мобилизации моноцитов и нейтрофилов в очаги воспаления и фагоцитозе опсонизированных микроорганизмов. В дополнение к этому CR3 может прямо рецептировать *Mycobacterium tuberculosis* и зимозан дрожжей (Ross, 2000), ICAM-1, отдельные компоненты свертывающей системы (фибриноген, Factor X), стареющие тромбоциты и денатурированные белки, апоптотические тельца. CR3-опосредованный фагоцитоз, осуществляемый макрофагами, не сопровождается освобождением арахидоновой кислоты и продукцией активных форм кислорода, как это имеет место при Fc-рецепторами опосредованном фагоцитозе. Этот вариант фагоцитоза протекает с минимальными проявлениями симптоматики воспаления.

СР макрофагов и некоторых эндотелиев характеризуются широкой специфичностью связывания полианионных лигандов. Наиболее охарактеризованы скавенджер рецепторы класса А (например, SR-AI/II), с которыми связан эндоцитоз модифицированных липопротеидов низкой плотности (Krieger, Stern, 2001). Они содержат так называемый домен SRCR-типа, встречающийся во многих молекулах адгезии и эндоцитоза. К тому же семейству относится рецептор MARCO, участвующий в связывании ацетилированных ЛПНП. SR-A участвует в фагоцитозе апоптотических тимоцитов и неопсонизированных бактерий *Neisseria meningitidis* (Peiser et al., 2002) макрофагами. Животные с нокаутом по

гену SR-A оказываются по сравнению с конвенциональными более чувствительными к эндотоксининдуцированному шоку. Это свидетельствует об участии SR-A в связывании и нейтрализации липополисахаридов по пути отличном от того, который опосредован TTP-4. SR-A-опосредованный клиренс липополисахаридов не связан с продукцией макрофагами провоспалительных цитокинов, ответственных за патогенез септического шока. Таким образом, SR-A проявляют как свойства адгезионных молекул, так и опосредуют эндоцитоз и фагоцитоз модифицированных компонентов собственного организма и ряда экзогенных лигандов (липополисахариды, липотейхоевые кислоты, *N. meningitidis*). Другие классы СР (например, CD36) участвуют в липопротеиновом транспорте и обмене, а также клиренсе апоптотических клеток, хотя известны отдельные случаи вовлечения их в фагоцитоз некоторых бактерий и простейших (*Plasmodium falciparum*; *Trypanosoma cruzi*).

Макрофаги экспрессируют на своей поверхности набор лектино-подобных рецепторов С-типа, подобных тем, которые встречаются на НК-клетках. Мажорным рецептором этой группы на макрофагах, нейтрофилах и дендритных клетках мыши является Дектин-1, связывающий  $\beta$ -гликаны зимозана и других компонентов дрожжевого происхождения (Brown, Gordon, 2001). В то же самое время Дектин-1 может взаимодействовать с некоторыми Т-клетками по пути независимому от присутствия  $\beta$ -гликанов. Как и в случае со СР, для Дектина-1 характерен функциональный дуализм, проявляющийся при взаимодействии с эндогенными и экзогенными лигандами, что может свидетельствовать о присутствии в молекуле рецептора несовпадающих сайтов для связывания лигандов различного происхождения.

Маннозный рецептор макрофагов, дендритных клеток и некоторых эндотелиев, является типичным представителем лектинов С-типа. Это лектин с широкой лигандной специфичностью, поскольку он связывает гликоконъюгаты, в терминальном положении которых находятся D-манноза, L-фукоза или D-N-ацетилглюкозамин. Лигирование сахаров углеводраспознающим доменом маннозного рецептора является  $Ca^{2+}$ -зависимым, что характерно для всех лектинов С-типа (East, Isacke, 2002).

Лиганды маннозного рецептора локализованы на поверхности бактерий, низших грибов, простейших, вирионов и вирусинфицированных клеток. Рецептор содержит несколько углеводраспознающих доменов. Домены с 4 по 7 связывают липополисахариды *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* (Zamre et al., 2002). Эндогенными лигандами МР являются L-селектин, вовлеченный в клеточную миграцию, и ряд лизосомальных гидролаз (Lee et al., 2002). Наряду с УРД, МР содержит N-концевой цистеин — богатый домен, который способен связывать gp120 белок вируса иммунодефицита человека, а также такие эндо-

генные лиганды, как лютеотропин и тиреоидстимулирующий гормон, сиалоадгезин, CD45, сульфатированные по галактозе олигосахара (McKenzie et al., 2002). Макрофаги конститутивно освобождают в кровь растворимую форму маннозного рецептора. Обе формы рецептора, по-видимому, активно участвуют в клиренсе гликоконъюгированных антигенов, в том числе собственных молекул и поврежденных (измененных) собственных молекул. Известно еще несколько молекул, подобных маннозному рецептору. Это Dec 205 и фосфолипаза A2-рецептороподобная молекула. Лиганды этих лектинов пока не описаны.

Такие коллектины, как маннозо(маннан)связывающий лектин и сурфактантные белки SPA и SPD обладают такой же лигандсвязывающей специфичностью, как и маннозный рецептор. Все это свидетельствует о наличии у человека и животных целого набора С-лектинов, распознающих гликоконъюгаты по терминально-локализованным остаткам маннозы, фукозы и N-ацетилглюкозамина. Для большинства из этих рецепторных молекул известны как экзогенные, относящиеся к группе патогенассоциированных молекулярных паттернов, так и эндогенные лиганды, часть из которых представляет неизменные, но декомпартментализованные молекулы (лизосомальные гидролазы, миелопероксидаза, тироглобулин, амилаза и др.), в то время как другие являются модифицированными соединениями (например, модифицированные липопротеиды низкой плотности), которые должны быть подвергнуты клиренсу для поддержания антигенного гомеостаза организма.

Доказательства участия Toll-белка, который был известен ранее как рецептор, участвующий в морфогенетическом процессе закладки дорсовентральной оси насекомого (Anderson et al., 1985), в обеспечении иммунной резистентности организма плодовой мушки *Drosophila melanogaster* к низшему грибу *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre et al., 1996) явились мощным импульсом к развитию современной концепции врожденного иммунитета. Уже в исследованиях на мышах было показано, что в реагировании на липосахариды ключевую роль играет ген, локализованный в локусе *Lps*, нокаут по которому приводит к резкому снижению чувствительности животных к рассматриваемому патогенассоциированному молекулярному паттерну и их резистентности к грамотрицательным бактериям (Poltorak et al., 1998). Как теперь известно, этот ген ответственен за синтез одной из изоформ Толл-подобных рецепторов мыши, а именно ТПР4, для которого лигандами являются эндотоксины.

Способность большинства рецепторов клеток фагоцитирующей системы детектировать как «несвой», так и «свой» лиганды отражает исходно многофункциональное назначение клеток этого ряда (моноциты/макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, разновидности эндотелиоцитов).

Они обеспечивают отдельные стороны морфологических (контроль за нормально функционирующим клеточным составом тканей посредством фагоцитоза клеток, вступивших на путь апоптоза), трофических (продукция ростовых факторов ангиогенеза) и детоксицирующих (система цитохрома Р-450 в клетках Купфера) процессов в организме и в то же самое время являются ведущими клеточными компонентами системы механизмов врожденного иммунитета. Участие фагоцитов в том или ином процессе определяется, по-видимому, различным характером связывания «своих» и «несвоих» лигандов рецепторами и несопадающими путями сигнальной трансдукции, которые обеспечивают дифференцированный характер реагирования клеток на эндо- и экзогенные вещества.

При распознавании «своих» или модифицированных «своих» молекул фагоцитарные клетки чаще реагируют таким изменением своей функциональной активности, которая, как правило, не приводит к локальным или системным воспалительным процессам. В случае детектирования «несвоих» соединений (патогенассоциированных молекулярных паттернов, ксеноантигенов) фагоцитарный процесс часто сопровождается продукцией и секрецией провоспалительных факторов ( $O_2^-$ , NO, цитокины и др.). В этом заключается основное различие в реагировании клеток на «свои» и «несвои» молекулы, хотя оно далеко не во всех случаях бывает таким полярным.

Различия в профиле экспрессируемых рецепторов и путей сигнальной трансдукции, каждый из которых приводит к связанному с ним реагированию антигенпредставляющих клеток в форме функциональной активности и активации группы генов, в каждом конкретном случае определяют характер клеточного ответа на те или иные лиганды.

В случае лигирования «несвоих» молекул клетками системы врожденного иммунитета мобилизуются механизмы элиминации чужеродного, сопровождаемые, как правило, теми или иными проявлениями воспалительного процесса, распознавание «своих» молекул включает механизмы их удаления (клиренса) без заметной симптоматики воспаления. Подобный механизм детекции модифицированного по структуре «своего» обеспечивает очищение организма от молекулярных «шлаков» и поддерживает постоянство антигенного состава его внутренней среды (антигенный гомеостаз организма).

Таким образом, дискриминация «свое» и «несвое» (чужеродное) в рамках блока механизмов врожденного иммунитета представляется как многоуровневый процесс, в который вовлечены как клетки, так и ряд межклеточных взаимодействий, опосредованных клеточно-ассоциированными и циркулирующими (гуморальными) молекулами.

### 3. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

#### 3. 1. Фагоцитоз в иммунных реакциях организма

##### 3. 1. 1. Общие положения

Фагоцитоз филогенетически является наиболее древним защитным процессом, осуществляемым специализированными клетками иммунной системы (Мечников 1883, 1892; Greenberg, 1999). Именно И. И. Мечниковым впервые в сравнительных морфофизиологических исследованиях была доказана ключевая роль этого механизма иммунной защиты в формировании резистентности животных к инфекции. К профессиональным фагоцитам у позвоночных животных в первую очередь относятся нейтрофилы (полиморфноядерные лейкоциты, микрофаги) и моноциты/макрофаги (моноядерные, мононуклеарные фагоциты). Эти клетки морфофизиологически и биохимически приспособлены к осуществлению поглощения и инактивации микробных тел и частиц, превышающих размеры диаметром 0.5 мкм (размер наименьших бактерий группы *Mycoplasma*). Отличие фагоцитоза от других форм эндоцитарных реакций клеток предполагает обязательное участие в этом процессе актинового цитоскелета, который в форме микрофиламентов пронизывает псевдоподии, осуществляющие захват микроорганизмов и частиц. Фагоцитоз требует для своего протекания определенных температурных условий ( $t > +13$ — $18$  °C) и не происходит при более низких температурах у позвоночных животных. Наряду с нейтрофилами и моноцитами/макрофагами в фагоцитозе принимают участие незрелые дендритные клетки, эозинофилы, тучные клетки, эпителиальные клетки, тромбоциты и даже некоторые лимфоциты.

Контакт фагоцита с микроорганизмом инициирует клеточные реакции, связанные с цитоплазматической мембраной, цитоскелетом, активацией механизмов убивания (киллинга) патогенов, продукцией цитокинов, хемокинов и молекул, играющих ключевую роль в представлении антигенов (Underhill, Ozinsky, 2002).

## Рецепторы фагоцитоза

Клетки	Рецептор	Мишень	Лиганд
Лейкоциты	FcγRs	Иммунные комплексы пентраксин-опсонизированный зимозан (дрожжи)	СН-домены иммуноглобулинов САП, СРБ
Нейтрофилы, моноциты/ макрофаги	CR1 (CD35)	Комплемент-опсонизированные бактерии и грибы	С3b, С4b, МСЛ
То же	CR3 (CD11b-CD18, αMβ2, Mac1)	Комплемент-опсонизированные бактерии и грибы грамотрицательные бактерии <i>Bordetella pertussis</i> дрожжи	С3bi, С3d  ЛПС нити гематоглютинина β-гликан
Макрофаги, дендритные клетки	CR4 (CD11c-CD18)	<i>M. tuberculosis</i>	Неидентифицирован
Макрофаги	CD43 (лейкоциалин/сиалофорин)	<i>M. tuberculosis</i>	То же
Тучные клетки	CD48	Кишечные бактерии	FimH
Макрофаги	Маннозный рецептор	<i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Candida albicans</i>	Остатки маннозы или фукозы
»	Скавенджер рецептор А I/II	Апоптотические лимфоциты грамположительные кокки	? фосфатидилсерин липотейхоевые кислоты
Клетки Сертоли, эпителиальные клетки тимуса	Скавенджер рецептор В I	Апоптотические клетки	Фосфатидилсерин

Таблица 7 (продолжение)

Клетки	Рецептор	Мишень	Лиганд
Макрофаги	MARCO	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Неидентифицирован
»	MER	Апоптические тимоциты	? Gas6/фосфатидилсерин
Многие клетки	PSR	Апоптические клетки	Фосфатидилсерин
Макрофаги	CD36	Апоптические нейтрофилы	Фосфатидилсерин тромбоспондин
»	CD14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> апоптические клетки	? ЛПС неидентифицирован
Многие клетки	$\beta$ 1-интегрины	<i>Yersinia</i> spp.	Инвазин
Макрофаги	$\alpha$ v $\beta$ 3	Апоптические клетки	? тромбоспондин
Дендритные клетки, эпителиальные клетки	$\alpha$ v $\beta$ 3	То же	Неидентифицирован
Эпителиальные клетки	Е-кадгерин	<i>Listeria</i> spp.	InlA
То же	Met	То же	InlB

Основные стадии фагоцитоза: хемотаксис, контакт фагоцита с микробом, поглощение (интернализация) микроорганизмов (фагоцитоз в узком смысле слова), инактивация (киллинг) и последующее переваривание патогенов в вакуолярном аппарате фагоцитов (завершение фагоцитоза). Наряду с этими функциональными проявлениями фагоцитоз, как правило, сопровождается секреторными реакциями фагоцитов, особенно моноцитов/макрофагов и дендритных клеток, в ходе которых выделяются разнообразные физиологически активные вещества, обеспечивающие протективный характер течения и завершения всего процесса в целом.

В распознавании, контакте и поглощении микробов фагоцитами участвуют разнообразные рецепторы (табл. 7) (Greenberg,

Grinstein, 2002). С помощью современных молекулярно-генетических методов установлено, что при фагоцитозе частиц латекса макрофагами мыши в фагоцитах наблюдаются изменения в экспрессии более 200 генов, а при фагоцитозе *Mycobacterium tuberculosis* — около 600 (Ehrt et al., 2001). Все это свидетельствует о сложном и комплексном характере структурно-функциональных изменений в макрофагах, сопряженных с фагоцитарным процессом. Понимание их молекулярной основы обеспечит в перспективе создание фармакологических средств, направленно регулирующих процесс фагоцитоза. Многообразие рецепторов обеспечивает эффективность распознавания патогенов («несвоего») и является необходимым условием для последующей прицельной инактивации инфекционных агентов. В одной из современных концепций врожденного иммунитета совокупность этих рецепторов принято обозначать как систему рецепторов (молекул), распознающих патогенассоциированные молекулярные паттерны (Janeway, 1992, 2002).

Целая группа локализованных на поверхности клеток рецепторов обеспечивает протекание фагоцитарного процесса. Часть из них (например, рецепторы формилметиониловых пептидов и C5a) ответственна за хемотаксическую фазу фагоцитарного процесса.

### 3. 1. 2. Хемотаксис и сопряженные с ним клеточные реакции

Стадия хемотаксиса обеспечивается последовательной деятельностью ряда лиганд-рецепторных взаимодействий как на уровне фагоцита, так и фагоцита с эндотелиальными клетками. Благодаря этим взаимодействиям фагоциты (нейтрофилы, моноциты/макрофаги, незрелые дендритные клетки, базофилы, тучные клетки и эозинофилы) мигрируют в места проникновения микроорганизмов в направлении возрастающей концентрации хемоаттрактантов и входят в непосредственный множественный рецепторопосредованный контакт с ними. При этом наблюдается одновременная активация нескольких сигнальных путей трансдукции, обеспечивающих мобилизацию фагоцитов на поглощение и инактивацию патогенов, а также выработку ряда соединений, которые секретируются в околочлеточное пространство и осуществляют межклеточные кооперативные взаимодействия, направленные на формирование протективного (адекватного) иммунного ответа организма.

Фагоциты мигрируют из циркуляции с целью аккумуляции в очагах воспаления в ответ на некоторые медиаторы и компоненты микробных клеток. В очагах воспаления лейкоциты активируются, они становятся способными к фагоцитозу, продукции активных форм кислорода ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) и азота (NO) и секреции ряда физиоло-

гически активных веществ. Выходу лейкоцитов в очаги воспаления предшествует их связывание с эндотелием посткапиллярных венул. Далее они мигрируют в ткани, проходя через просветы в эндотелии. Разнообразные медиаторы вызывают направленный в места воспаления выход нейтрофилов, моноцитов и других клеток крови. Хемотаксические факторы связываются с поверхностными рецепторами лейкоцитов и стимулируют их функциональную активность, обеспечивающую диапедез (Uhing, Snyderman, 1999). Как правило, после лигирования хемоаттрактантов рецепторами активируются связанные с ними ГТФ-белки (G-белки). Эти белки чувствительны к коклюшному токсину (pertussis toxin), их функциональная активность подавляется этим соединением. Субъединицы гетеротримерных G-белков иницируют множественные сигнальные каскады, из которых  $\beta\gamma$ -зависимый изучен наиболее обстоятельно. Менее чем за 5 с после взаимодействия лиганда с рецептором происходит  $\beta\gamma$ -зависимый гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата с высвобождением инозитолтрифосфата, который обеспечивает дальнейшие изменения в клетке (выход кальция из внутриклеточных депо в цитоплазму, активация низкомолекулярных G-белков, фосфолипаз и многочисленных протеиназ). Наиболее распространенными природными хемоаттрактантами являются: бактериальные продукты (формилметиониловые пептиды, липополисахариды), производные комплемента (C5a, C4a, C3a), секретируемые продукты метаболизма фосфолипидов (PAF, LTB<sub>4</sub>), а также хемокины ИЛ8 и MCP1.

Для большинства рассматриваемых соединений идентифицированы их рецепторы. В зависимости от дозы хемоаттрактанта лейкоциты реагируют на взаимодействие с ним либо в форме направленной двигательной активности, либо в форме экзоцитоза и инициации дыхательного взрыва. Формилметиониловые пептиды как хемоаттрактанты для лейкоцитов были идентифицированы в 1975 г. (Schiffmann et al., 1975). Формилированный метионин является типичной N-концевой аминокислотой при белковом синтезе у бактерий и в митохондриях. Поэтому такие пептиды привлекают лейкоциты, преимущественно нейтрофилы, в места проникновения микробов и клеточной деструкции (некроза). Наличие остатков аминокислот с гидрофобными боковыми группами в N-концевой части пептидов важно в связывании с рецепторами лейкоцитов. Формилметиониллейцилфенилаланин как типичный представитель формилметиониловых пептидов взаимодействует со своим рецептором с Kd около 20 nM (Williams et al., 1977). Рецепторы формилметиониловых пептидов сопряжены с гетеротримерными G-белками, что вообще характерно, по-видимому, для большинства рецепторов хемоаттрактантов.

C5a был одним из первых открытых хемоаттрактантов эндогенного происхождения (Snyderman et al., 1968). Это основной с

3 дисульфидными связями пептид, гликозилированный по аспарагину в 64-й позиции. Дефекция пяти С-концевых аминокислот приводит к потере хемотаксической активности пептида при сохранении его способности связываться с рецептором (Chenoweth, Hugli, 1980).

PAF и LTВ4 являются продуктами метаболизма, возникновение которых инициируется фосфолипазой А2 (PLA2).

Хемокины — белки с молекулярной массой в пределах 8—10 кДа классифицируются на группы в зависимости от расположения первых двух цистеинов, образующих дисульфидную связь. Это белки, доминирующей вторичной структурой которых является β-слой, образованный 3 антипараллельными тяжами. Часто хемокины в жидких средах организма образуют димеры, что свойственно также эндогенным антибиотическим пептидам человека — дефенсинам. Поэтому не случайно, что некоторые хемокины (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11) обладают подобно дефенсинам антимикробной активностью (Cole et al., 2001). N-концевая внеклеточная область рецепторов С5а и хемокинов обогащена отрицательно заряженными аминокислотными остатками, что, по-видимому, имеет значение при связывании преимущественно катионных лигандов.

Как правило, рецепторы хемоаттрактантов образуют отдельную группу большого семейства белков, имеющих 7 трансмембранных доменов и сопряженных с G-белками цитоплазматической мембраны клеток. В пользу этого говорят экспериментальные данные о снижении активности рецепторов и сопряженных с ними путей сигнальной трансдукции, установленные при обработке клеток коклюшным токсином.

Хемоаттрактанты инициируют обширные структурные перестройки мембран лейкоцитов через включение фосфоинозитид-специфической фосфолипазы С, фосфоинозитид киназы, фосфолипаз D и А<sub>2</sub>. Последствием этих изменений является увеличение внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, перенос и активация протеинкиназы С и других сигнальных молекул. Таким образом, интенсификация фосфолипидного метаболизма является ключевым звеном клеточного ответа на хемоаттрактанты (Uhing, Snyderman, 1999).

Немедленным следствием активации фосфолипазы С, приводящим к продукции инозитолтрифосфата, является транзиторное (преходящее) повышение уровня внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> (от 100 нМ/Л до более чем 1 мМ/Л). Под действием инозитолтрифосфата Ca<sup>2+</sup> освобождается из внутриклеточных депо — кальциосом. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> является существенным в поддержании секреторных реакций и активации дыхательного (респираторного) взрыва фагоцитов. В регуляцию ранних реакций фагоцитов на хемоаттрактанты (хемотаксис, дыхательный взрыв, секреция гранул, метабо-

лизм фосфолипидов) вовлечены и низкомолекулярные G-белки. В частности, Rac 1 белок участвует в активации дыхательной НАДФН-оксидазной цепи.

Способность хемоаттрактантов индуцировать секрецию или респираторный взрыв в лейкоцитах может быть потенцирована предварительной экспозицией клеток с некоторыми веществами (примирование клеток). Такими примирующими лейкоциты соединениями являются полисахариды и низкие дозы собственно хемоаттрактантов. Цитокины увеличивают число рецепторов хемоаттрактантов на поверхности фагоцитов. Немаловажное значение в регуляции функциональной активности фагоцитов имеет процесс терминации (подавления) сигнализации, инициируемой хемоаттрактантами. Десенситизация рецепторов хемоаттрактантов осуществляется различными механизмами. Один из них связан с фосфорилированием остатков серина и треонина в цитоплазматической части рецептора, другой — с фосфолипазой C.

### **3. 1. 3. Роль рецепторов фагоцитов, ответственных за поглотительную стадию фагоцитоза**

Направленное движение фагоцитов в места проникновения микроорганизмов является необходимым условием реализации последующих стадий фагоцитоза, в которых участвуют различные клеточные рецепторы (табл. 7). Из последних некоторые распознают нативные компоненты поверхности микробных клеток (например, липотейхоевые кислоты, терминально расположенные остатки маннозы или фукозы, липополисахариды,  $\beta$ -гликаны). Эти рецепторы обеспечивают протекание фагоцитоза непосредственного опсонинами — «неопсонический фагоцитоз». Эта форма фагоцитоза особенно распространена у беспозвоночных и составляет важный механизм формирования у них врожденного иммунитета. Доминирующим типом фагоцитоза у позвоночных является опосредованный опсонинами фагоцитоз. Опсонины представляют собой гуморальные белковые факторы, взаимодействующие с поверхностью микробов и/или клетками макроорганизма и облегчающие процесс поглощения (интернализации) патогенов. Опсонизация клеток сводится к снижению гидрофильности и (или) отрицательного заряда поверхности взаимодействующих при фагоцитозе клеток.

Обычно опсонины являются белками жидких сред и секретов организма, а некоторые из них могут выделяться внеклеточно фагоцитами в ходе фагоцитарного процесса. Однако в ряде случаев граница между опсонинопосредованным и независимым от опсонин фагоцитоза может быть размыта. Это, в частности, наблюдается при CR3-зависимом фагоцитозе, когда рецептор

детектирует как СЗb-опсонизированные микробы, так и липополисахариды грамотрицательных бактерий,  $\beta$ -гликаны дрожжей и тяжи гемагглютинина *Bordetella pertussis*.

Микробные тела и объекты, опсонизированные иммуноглобулинами класса G (IgG), распознаются группой рецепторов (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII), локализованных на поверхности фагоцитов, которые связывают Fc $\gamma$ -области молекул антител (Anderson et al., 1990). Fc $\gamma$ RI связывает мономерные иммуноглобулины с величиной Kd порядка  $10^{-10}$  M (Anderson et al., 1994). Fc $\gamma$ RII и Fc $\gamma$ RIII являются низкоаффинными рецепторами, связывающими только мультимеры IgG. Макрофаги и нейтрофилы экспрессируют различающиеся наборы рецепторов этого типа. Fc $\gamma$ R разделяют на две основные группы: активирующие и ингибирующие. Представители первых (Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIA) содержат в качестве внутриклеточного домена ITAM-мотив (immunoreceptor tyrosine activation motif) домен: YxxLx5-12 Yx2-3 L-I (Reth, 1989), с помощью которого осуществляется рекрутирование внутриклеточных тирозин-киназ SyK-семейства и запуск каскадов фосфорилирования (Greenberg et al., 1994). В результате дополнительного фосфорилирования ITAM-домена инициируется зависящая от него сборка актина в филаменты, обеспечивающие подвижность фагоцитарных клеток при интернализации микроорганизмов. Также активируются фосфатидилинозитол-3-киназы, участвующие в везикулярном транспорте, который обеспечивает поверхность клеток дополнительным мембранным материалом для формирования псевдоподий. Связывание лигандов с Fc $\gamma$ R ведет также к активации фосфолипаз A2 (PLA2) (Suzuki et al., 1982), которые кооперируются с PI3-киназами в поддержании необходимых для осуществления движения клеток мембранных структур. Адгезия и формирование псевдоподий макрофагами сопряжены с PLA2. Активация сфингомиелиназ при фагоцитозе рассматривается в качестве негативного (подавляющего) звена регуляции фагоцитоза (Sachard et al., 1997). Ингибирующие рецепторы (Fc $\gamma$ RIIB) имеют внутриклеточный домен ITIM (immunoreceptor tyrosine inhibited motif), который мобилизует фосфатазы, отменяющие пути сигнальной трансдукции, связанные с протеинкиназами. Соотношение активирующих и ингибирующих Fc $\gamma$ R-рецепторов на поверхности фагоцитов определяет характер реагирования клеток на IgG-опсонизированные частицы при фагоцитозе и воспалении.

Рецепторы комплемента активно участвуют в фагоцитарном процессе. CR1 экспрессирован на нейтрофилах, моноцитах, эозинофилах, дендритных клетках, В-лимфоцитах и эритроцитах. Рецепторы CR3 и CR4 по своей природе являются  $\alpha\beta$ - и  $\alpha\beta$ -интегринами соответственно. Лигандами CR1 являются C1q-, C4b-, C3b-опсонизированные тела, а также маннозосвязывающий

лектин (МСЛ) на поверхности частиц. Лигандами CR3 и CR4 являются iC3b-опсонизированные объекты. Связывание лигандов с CR1, CR3, CR4, как правило, недостаточно для осуществления процесса поглощения объектов. Фагоцитоз в этих случаях протекает благодаря кооперации рецепторов комплемента с рецепторами иммуноглобулинов.

Распространен среди позвоночных и интегринопосредованный фагоцитоз. Интегрины  $\beta 1$  ответственны за связывание и поглощение *Yersinia pseudotuberculosis* в культуре эпителиальных клеток (Isberg, Leong, 1990). Плотность рецепторов и аффинитет к ним лигандов определяют эффективность фагоцитоза. К  $\beta 2$ -интегринам принадлежит CR3, экспрессируемый исключительно на гемопозитических клетках. Эти интегрины важны в адгезии, диapedезе и фагоцитозе лейкоцитов. Особенность функционирования CR3-рецепторов заключается в том, что они в ходе фагоцитоза настраиваются сначала на связывание C3bi-опсонизированных частиц и тел, а в последующем на их поглощение. Интересно, что в нейтрофилах пул CR3-рецепторов локализован в специфических гранулах, причем часть из них находится уже в форме кластеров, облегчающих при экспозиции на поверхности клеток процесс фагоцитоза.

СР первоначально были описаны как структуры, ответственные за связывание и интернализацию модифицированных липопротеинов низкой плотности (ацетилированных липопротеинов). В дальнейшем установлена их способность связывать полирибонуклеотиды, липополисахариды и частицы кремния (Plaff et al., 1999). Два представителя группы СР вовлечены в связывание и интернализацию микроорганизмов. Это SR-A и MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) рецепторы. SR-A ответственен за связывание микробных клеток, липотейхоевых кислот и липополисахаридов макрофагами. Лиганды MARCO окончательно не выяснены. СР участвуют в связывании микробов, но не в их поглощении. Наличие других рецепторов обеспечивает формирование сигналов, ответственных за интернализацию микроорганизмов.

В ходе фагоцитоза наблюдается кооперация между рецепторами различного типа. Например, фагоцитоз *Leishmania* или *Mycobacterium tuberculosis* макрофагами опосредован одновременно рецепторами комплемента и маннозы, а также СР (Wilson, Pearson, 1988; Schlesinger, 1996). FcyR-рецепторы на нейтрофилах человека активируются дополнительно хемотаксическим пептидом формилметиониллейцилфенилаланином. Описана RGD-зависимая активация FcyR и CR1, реализуемая через  $\beta 3$ -интегрин. Сурфактантный белок А (SPA) — основной белок сурфактанта легких усиливает FcyR- и CR1-зависимый фагоцитоз. SPA относится к коллектинам, включающим также маннозосвязывающий лектин и конглютинин.

Фагоцитоз сопровождается формированием псевдоподий (ложноножек), которые участвуют в обхвате объекта фагоцитоза и формировании по механизму «молнии-застежки» вакуоли — фagosомы (Griffin et al., 1975, 1976). Одновременно наблюдается образование актиновых филаментов, формирующих цитоскелет клетки, который способствует захвату и интернализации микроорганизмов (Bailey et al., 1985; Ritling et al., 1992).

Ингибитор полимеризации актина цитохалазин D в концентрации 1—2 мкМ подавляет поглощение частиц и микробных тел при фагоцитозе. Ключевым этапом процесса фагоцитоза является последующее слияние фagosом с лизосомами и эндосомами. В результате слияния антибиотические факторы различной природы и механизмов действия (кислородзависимые и независимые в своем действии от кислорода) приходят в контакт с микроорганизмами и инактивируют их. Завершается процесс фагоцитоза перевариванием микробов в фagosолизосомах под воздействием большего арсенала кислых и нейтрально-щелочных гидролаз. На этой стадии фагоцитоза микрофиламенты уже не играют важной функциональной роли, поскольку слияние лизомоподобных гранул с фagosомой зависит от микротубулярного аппарата клеток.

Таким образом, фаза поглощения (эндоцитоза, интернализации) объекта обеспечивается согласованной активацией нескольких путей сигнальной трансдукции, приводящих к формированию актиновых микрофиламентов, псевдоподий, охватывающих частицы, и последующему поглощению последних. Десятки сигнальных молекул, включая белки, связывающие актин и регулирующие движения мембран, активность ионных каналов, киназ и липаз, вовлечены в процесс фагоцитоза на стадии поглощения микробных агентов. Среди них фосфоинозитид-3-киназа, фосфолипаза С, Rho ГТФазы и протейнкиназа С играют интегрирующую роль в регуляции фагоцитоза на стадии поглощения.

Эндоцитоз микробов фагоцитами обычно сопровождается продукцией провоспалительных молекул и активацией внутриклеточных механизмов антимикробной защиты. Причем в случае иммуноглобулинопосредованного фагоцитоза эти функциональные проявления реализуются одновременно с интернализацией объекта. В процессе активации фагоцитов по современным представлениям участвуют и Толл-подобные рецепторы, которые, однако, не играют непосредственной роли в поглощительном процессе (Underhill et al., 1999; Ozinsky et al., 2000a, 2000b).

Наряду с активацией дыхательного взрыва в фагоцитах при поглощении частиц и макрофагов осуществляются реакции, приводящие к продукции хемокинов и цитокинов. В последние годы изучен путь продукции цитокинов, инициированный Толл-подобными рецепторами (ТЛР). Некоторые ТЛР в ходе фагоцитоза микроорганизмов попадают в фagosому, где они участвуют в

детекции природы инфекционных агентов (Underhill et al., 1999; Ozinsky et al., 2000a, 2000b). По-видимому, ТПР кооперируют с IgG-рецепторами и CR3 при фагоцитозе микроорганизмов макрофагами. Продукция ФНО $\alpha$  и ИЛ1 $\beta$  является одним из результатов активации моноцитов/макрофагов опосредованной ТПР.

В процессе эволюции микроорганизмы выработали ряд механизмов патогенности, позволяющих им избегать фагоцитирования моноцитами/макрофагами и нейтрофилами. Так, энтеропатогенная *E. coli* подавляет поглощение фагоцитами путем ингибирования PI3-киназы (Celli et al., 2001), а *Yersinia* подавляет полимеризацию актина в клетках (Rosqvist et al., 1990). Сальмонеллы нейтрализуют микробные факторы внутри фаголизосом (Ohl, Miller, 2001). Иерсинии, используя систему секреции III типа, инъецируют в макрофаги различные молекулы, подавляющие, в частности ГТФазы Rho-семейства, и нарушающие актиновый цитоскелет клеток (Black, Bliska, 2000). SP12-система сальмонелл позволяет им избегать при вакуолярной локализации воздействий со стороны НАДФН-оксидной системы (Ochman et al., 1996). *Mycobacterium tuberculosis* подавляет процесс закисления в фагосоме (Russell, 2001). Микобактерии *M. tuberculosis* (Armstrong, D'Arcy Hart, 1971) способны блокировать слияние фагосом с лизосомами. Этой же способностью характеризуются *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila*, *T. gondii*. Палочка Коха осуществляет рассматриваемую блокаду с помощью сульфатидов своей клеточной стенки (Goren et al., 1977). Другие микроорганизмы блокируют закисление фаголизосом. *L. monocytogenes*, многие виды риккетсий, *Trypanosoma cruzi* и *Shigella* spp. разрушают фагосомы и выходят в цитоплазму, где для них существуют приемлемые условия для внутриклеточного паразитирования.

### 3. 2. Кислородзависимые механизмы элиминации патогенов при фагоцитозе и воспалении

Активация нейтрофилов и моноцитов/макрофагов при контакте с объектами фагоцитоза и некоторыми хемокинами приводит к мобилизации внутриклеточных микробоцидных систем, среди которых различают кислородзависимые и кислороднезависимые (Klebanoff, 1999). Наиболее изученными из первых являются НАДФН-оксидазная и пероксидазная системы.

#### 3. 2. 1. НАДФН-оксидазная система

Эффективность фагоцитарных реакций, осуществляемых нейтрофилами и моноцитами/макрофагами является результирующей многих взаимодействующих морфобиохимических элемен-

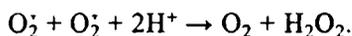
тов клеток. Одним из стереотипных проявлений функциональной готовности этих клеток к фагоцитозу является состояние их обмена веществ, получившее в литературе название «дыхательного взрыва» (Baldridge, Gerard, 1933; Klebanoff, Clark, 1978; Segal, 1989, 1991). Термин отражает быстротечность и интенсивность мобилизации энергетических и пластических ресурсов нейтрофилами в ответ на воздействия на их цитоплазматическую мембрану разнообразных по химической природе соединений: хемоаттрактантов (C5a-компонент комплемента, формилметиониловые пептиды и белки бактерий, лейкотриен В4), опсоинов (C3b-компонент комплемента, иммуноглобулины классов IgG1, IgG2, IgM) и маркированных ими микроорганизмов, поверхностно активных веществ (форболовые эфиры, дигитонин) (McPhail, Shyderman, 1984; Sandborg, Smolen, 1988). Дыхательный взрыв характеризуется резким усилением сопряженных биохимических превращений, связанных с вовлечением кислорода и его химических реактивных производных ( $O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$ ) в разнообразные защитные и повреждающие реакции организма. (Klebanoff, 1992, 1999). Наблюдаются увеличение поглощения кислорода фагоцитами в 2—20 раз по сравнению с исходным уровнем покоящейся клетки, генерация заметных количеств супероксидного радикала ( $O_2^{\cdot -}$ ) и перекиси водорода ( $H_2O_2$ ), интенсификация фосфоглюконатного (пентозофосфатного) пути окисления глюкозы и фиксации неорганического йода в биополимерсвязанную форму (Iyer et al., 1961; Karnovsky, 1962; Rossi, Zatti, 1964; Klebanoff, Clark, 1978; Segal, 1989). Отличительной особенностью дыхательного (респираторного) взрыва как процесса утилизации кислорода является его нечувствительность к ингибиторам цепи переноса электронов в митохондриях (цианид, антимицин А, азид натрия) и окислительного фосфорилирования (динитрофенол), но подавление амобарбиталом ингибитором флавопротеидов. В соответствии с этими данными было сформулировано представление о флавиновой природе кофермента энзима (НАДФН-оксидазы), ответственного за восстановление кислорода при активации фагоцитов. В настоящее время установлено, что большая часть поглощаемого нейтрофилами кислорода восстанавливается до супероксидного радикала оксидазной системой, основу которой составляет гетеродимерный цитохром  $b_{558}$  (Segal, Jones, 1978) с низким окислительно-восстановительным потенциалом ( $E = -245$  мВ), включающий в себя субъединицы двух типов:  $\alpha$  с молекулярной массой 22 кДа (p22phox) и  $\beta$  с молекулярной массой 91 кДа (gp91phox) (Segal, Jones, 1978; Segal, 1991). Цитохром  $b_{558}$  ( $b_{245}$ ) является НАДФН-связывающим флавопротеидом. Это первый флавоцитохром, описанный у высших эукариотов, который одновременно связывает гем и ФАД в соотношении 2 : 1 (Segal et al., 1992). Следует подчеркнуть, что в покоящихся нейтрофи-

лах 90 % цитохрома  $b_{558}$  локализовано в мембранах их специфических гранул и везикул (Mollinedo, Schneider, 1984; Borregaard, 1985). Под воздействием веществ, стимулирующих активацию нейтрофилов, происходит слияние мембран специфических гранул с цитоплазматической мембраной и, как следствие, перенос электронтранспортного белка на поверхность клетки со сборкой функционально полноценной НАДФН-оксидазной системы (Segal, 1991). Установлено, что наряду с цитохромом  $b_{558}$ , в формировании функционально полноценной НАДФН-оксидазной системы участвует также, как минимум, четыре цитоплазматических белка: это фосфопротеин с молекулярной массой 47 кДа (p47phox, аббревиатура phox означает for phagocyte oxidase), белок p67phox (67 кДа), белок p40phox (40 кДа) и низкомолекулярный белок Rac 1 (~21 кДа), связывающий гуаниновые нуклеотиды (Rotrosen, 1992). Стимулы, активирующие фосфорилирование белка p47phox, индуцируют перенос цитозольного комплекса из трех белков p67phox, p40phox, p47phox в область цитоплазматической мембраны. За фосфорилирование p47phox ответственно несколько киназ (PKC, PKA, p21-активируемая киназа — PAK, PI3-киназы). Rac 1, активируемый ГДФ-ГТФ обменным фактором, также транслоцируется к мембранному комплексу (Diebold, Bokoch, 2001). Сборка комплекса НАДФН-оксидазы сопряжена с функционированием актинового цитоскелета, нарушение целостности которого блокирует процесс активации оксидазной системы и продукцию супероксидного аниона. До настоящего времени неясно являются ли эти белки интегральными компонентами цепи переноса электронов к кислороду или только модулируют ее активность. Следует отметить, что сборка рассматриваемой системы может осуществляться под действием сигналов, возникающих как при поглощении опсонизированных частиц, так и растворимых факторов (формилметиониловые пептиды, форболмиристатацетат (Segal et al., 1999)). Значимость отдельных рецепторов в инициации сборки НАДФН-оксидазной системы и дыхательного взрыва различна. Наиболее очевидна в этом процессе роль IgR у макрофагов и нейтрофилов, далее по значимости идут маннозный рецептор в кооперации с  $\beta$ -гликановым рецептором и, наконец, CR3-рецептор.

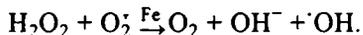
В начале фагоцитарного процесса супероксид, образуемый НАДФН-оксидазной системой, выбрасывается во внеклеточное пространство, но по мере дальнейшей инвагинации плазмалеммы и последующего образования фагосомы накопление этого цитотоксического метаболита происходит внутри клетки, где и реализуется его антимикробный потенциал (Babior et al., 1973).



В процессе ферментативной или спонтанной дисмутации супероксидного радикала образуется перекись водорода, которая является неотъемлемым компонентом микробицидной миелопероксидазной системы (Iyer et al., 1961; Klebanoff, 1980).



В присутствии ионов  $Fe^{2+}$  супероксид и перекись водорода вступают в реакцию Хабер-Вайса (Haber, Weiss, 1934), порождая один из самых сильных биогенных окислителей гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ):



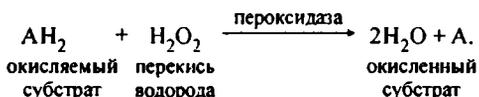
В дополнение к этим соединениям в реакциях неэнзиматической дисмутации супероксида и, частично, Хабер-Вайса может образоваться энергизированная форма кислорода синглетный кислород ( $^1O_2$ ), который активно взаимодействует с молекулами, содержащими участки повышенной электронной плотности (полиненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов мембран, основания нуклеиновых кислот, ароматические аминокислоты в белках) (Осипов и др., 1990; Янковский, 2000). Совокупное действие синглетного кислорода и гидроксильного радикала инициирует перекисное окисление липидов мембран, окисление сульфгидрильных групп биомолекул, разрушение пептидных связей в белках и оснований в нуклеиновых кислотах фагоцитированных микроорганизмов (Root, Cohen, 1981; Rosen et al., 1988). Благодаря осуществлению этих реакций может иметь место нарушение структурной целостности микробных клеток и разрушение их основных биомолекул (ДНК, РНК, белков, полисахаридов, липидов), что в значительной степени определяет эффективность киллерной функции нейтрофилов. Действительно, в экспериментально созданных анаэробных условиях наблюдается снижение микробицидной активности нейтрофилов (Mandell, 1974). Природной моделью, подтверждающей значимость дыхательного взрыва в функционировании фагоцитов, является редкое наследственное заболевание хроническая грануломатозная болезнь (Berendes et al., 1957; Holmes et al., 1967; Quie et al., 1967). Носители этого заболевания страдают от хронических аутогенных нагноительных процессов, вызванных стафилококками, сальмонеллами, грибами рода кандиды и многими другими микроорганизмами. Нейтрофилы, эозинофилы и моноциты/макрофаги больных хронической грануломатозной болезнью (ХГБ) утрачивают способность к умерщвлению многих видов микробов вследствие неспособности фагоцитов отвечать полноценным дыхательным взрывом (продукция  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) на активирующие воздействия. Это обусловлено генетически детерминированным

ми нарушениями в функционировании НАДФН-оксидазной системы. Как установлено в настоящее время (Segal, 1991; Gallin, 1992), встречаются четыре основные формы ХГБ. У большинства пациентов (60 %) имеет место отсутствие или структурный дефект большой  $\beta$ -субъединицы цитохрома  $b_{558}$ , у части (5 %) малой  $\alpha$ -субъединицы. Около 30 % больных ХГБ имеют клеточный дефицит или функциональную неполноценность белка p47phox и, наконец, у 5 % патология обусловлена отсутствием p67phox. Завершая рассмотрение биологического значения респираторного взрыва в фагоцитах, необходимо отметить, что в ходе длительной сопряженной эволюции системы хозяин-паразит микроорганизмы выработали многочисленные механизмы нейтрализации химически реактивных производных кислорода (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза). Поэтому реальный вклад токсических производных кислорода в инактивацию микробов при фагоцитозе и воспалении зависит от ряда дополнительных условий, среди которых решающими следует считать нарушение структурной целостности оболочек бактерий, грибов и некоторых оболочечных вирусов, а также блокаду в них ключевых метаболических процессов. По современным представлениям, ответственными за эти воздействия на микроорганизмы являются лизосомные (гранулярные) белки и полипептиды фагоцитов, общим физико-химическим свойством которых является катионный (основной, щелочной) характер их молекул (Ашмарин и др., 1972; Кокряков и др., 1973; Пигаревский, 1983; Spitznagel, 1984; Lehrer et al., 1988; Кокряков, 1990, 1999). Они и являются предметом нашего дальнейшего рассмотрения.

### 3. 2. 2. Пероксидазные системы инактивации микробов

Одним из ведущих гранулярных компонентов антимикробной системы фагоцитов, тесно связанным в своем функционировании с метаболитами респираторного взрыва, является пероксидаза. В нейтрофилах и моноцитах/макрофагах локализована миелопероксидаза (Agner, 1941; Klebanoff, 1967; Klebanoff, 1980; 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, 1941; Schultz, Kaminker, 1962) и составляет 2—4 мг на  $10^9$  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 —  $H_2O_2$ ) и кофакторы ( $I^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $SCN^-$ ) (Klebanoff, 1967, 1992; Роговин и др., 1977; Шафран, 1981).

В настоящее время получены и охарактеризованы по физико-химическим свойствам миелопероксидазы человека (Andersen et al., 1982) и ряда видов животных (Agner, 1972; Harrison et al., 1977; Klebanoff, 1980; Шафран, 1981; Борисов и др., 1982; Кокряков и др., 1982). Ферменты из разных источников характеризуется заметным сходством биохимических параметров. Миелопероксидазы (МПО) относятся к окислительно-восстановительным ферментам (КФ 1.11.1.7), окисляющим перекисью водорода ( $H_2O_2$ ) и некоторыми гидроперекисями ( $R-O-O-H$ ) различные по химической природе соединения (органические кислоты, ароматические амины, фенолы, анионы галоидов и др.):

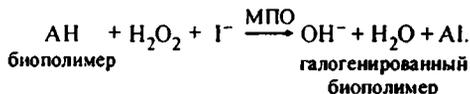


Гены МПО человека были клонированы в ряде лабораторий (Chang et al., 1986; Morishita et al., 1987). Исходный продукт трансляции белка представляет собой молекулу с массой около 84 кДа (Nauseef et al., 1988). Последующий процессинг и присоединение углеводной цепочки, состоящей из маннозы, формируют молекулу проМПО с молекулярной массой 89 кДа. Далее происходит отщепление 125 аминокислотных остатков и расщепление оставшейся молекулы на большую  $\alpha$ -субъединицу (57 кДа, 467 аминокислот) и малую  $\beta$ -субъединицу (12 кДа, 112 аминокислот). Молекула конечной зрелой МПО состоит из двух протомеров, связанных дисульфидной связью, в состав каждого из которых входит по одной  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепи. Гем, представляющий собой железосодержащий хлорин, ковалентно связан с тяжелой гликозилированной  $\alpha$ -цепью (Wu, Schultz, 1975; Hurst, 1991). Холоферменты МПО из других видовых источников построены по рассмотренному типу (Klebanoff, 1991).

Все изученные миелопероксидазы (Agner, 1941; Klebanoff, 1980; Борисов и др., 1982; Кокряков и др., 1982) 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 ( $H_2O_2$ ) 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.

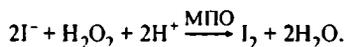
В одном из первых выдвинутых и доказанных механизмов бактерицидного действия МПО-системы галогенирование биопимеров (белков, полисахаридов, ненасыщенных жирных кислот)

микробной клетки рассматривалось в качестве основного результата ее функционирования (Klebanoff, 1967). Галогенирование, например, некоторых аминокислот (тирозин, гистидин, триптофан) в составе белков микроорганизмов приводит к нарушению их надпервичных структур и, как следствие, к потере ими функциональной активности. Реакция протекает по следующей схеме:

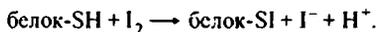


Указанная реакция лежит в основе перевода йода из свободного в органически связанное состояние, что является одним из показателей респираторного взрыва нейтрофилов. Нейтрофилы больных хронической грануломатозной болезнью с дефектом в НАДФН-оксидазной системе характеризуются сниженной способностью связывать йод с биополимерами клетки и фагоцитированных микроорганизмов. Ингибирование пероксидазной активности интактных лейкоцитов азидом или цианидом резко подавляет переход йода в кислотонерастворимую (связанную) форму (Klebanoff, 1967). Что касается природы соединений, связывающих йод, то ими по всей вероятности являются в первую очередь белки, поскольку обработка общего белка фагоцитирующих нейтрофилов протейназой (проназой) приводит к освобождению в среду йодированных форм тирозина: моно- и дийодтирозина.

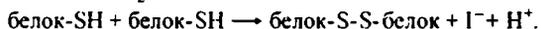
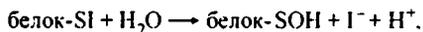
Часто доводом против рассматриваемого механизма действия миелопероксидазной системы служили данные об относительно низкой концентрации йода в нейтрофилах. По мнению Томаса и Юне (Thomas, Aune 1977, 1978a, 1987b), содержание йодида достаточно для осуществления бактерицидной функции миелопероксидазной системы, но при условии, если реакции галогенирования имеют следующую последовательность. Сначала пероксидаза окисляет перекись водорода йодид до йода:



Образовавшийся йод реагирует с SH-группами белков микроба:

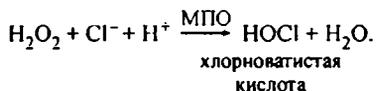


Высвобождение йодида из образующихся SI-производных может осуществляться двумя путями:

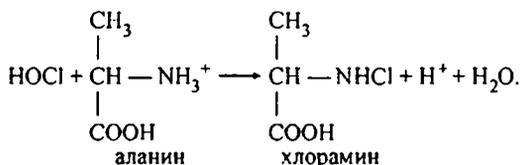


Таким образом осуществляется опосредованное I-окисление сульфгидрильных групп белков, которое является одной из непосредственных причин снижения жизнеспособности бактерий. При этом йодид в этом процессе не расходуется, хотя и является на его отдельных этапах переносчиком окислительных эквивалентов с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

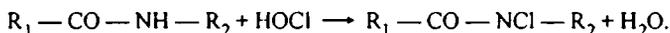
При использовании хлорида в качестве кофактора МПО-системы последовательность и характер реакций, ведущих к гибели микробов, имеют несколько иную направленность. Согласно одной из предложенных схем (Zgliczynski et al., 1968), миелопероксидаза окисляет сначала анион хлора до катиона в составе гипохлоритного иона ( $\text{OCl}^-$ ):



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

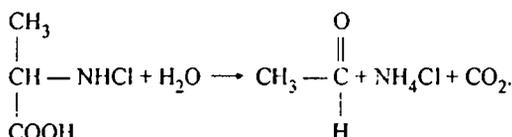


Сельварадж с соавт. (Selvaraj, 1974) показали, что хлорноватистая кислота способна реагировать с пептидными связями в микробных белках, образуя хлорамиды:



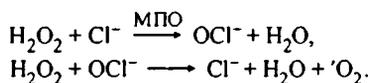
Хлорамиды в свою очередь гидролизуются с разрушением пептидной связи и формированием NCl-пептидов. Последние, как и хлорамины свободных аминокислот, окисляют компоненты микроба, усиливая первоначальные структурные нарушения (Thomas, 1979).

Хлорамины 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<sub>2</sub>, -OH), лишая их биологически значимой активности. По предположению группы авторов (Rosen et al., 1988), гипохлорит может окислять железо-серные центры некоторых электронно-транспортных белков, в частности кофакторов сукцинат-дегидрогеназы, что приводит к нарушению функционирования дыхательной цепи бактерий и разобшению 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, 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, скорее всего, являются основой ее многонаправленного действия на структуры и обменные процессы бактерий, грибов и вирусов. Именно это обстоятельство определяет ведущую роль МПО-системы среди других микробоцидных 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., 1979, 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 *E. coli*. Добавление таких антител в тест-систему *in vitro*, состоящую из микробной взвеси и ми-

елопероксидазной 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 ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{OCl}^-$ ,  $\text{O}_2$ , 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  $10^6$  бластоспор *Candida albicans*, было изучено лечебное действие миелопероксидазы (Wright, Nelson, 1985). Внутривентральное одноразовое 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 одновременное с МПО введение компонентов клеточной стенки гриба (маннанов) свидетельствует в пользу значимости адсорбции фермента на микробной клетке как необходимого условия реализации его кандидацидного действия.

Во многих отношениях сходное действие на микроорганизмы 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 первичной 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 мо-

лекул. 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 и сопряженных с ним механизмов инактивации и разрушения микроорганизмов 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 ХГБ выявлены пациенты, не страдающие от тяжелых рецидивирующих инфекционных заболеваний (Hill, 1984; Gallin, 1988), 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 рассматриваемых в настоящей монографии белков и пептидов нейтрофилов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидный проницаемость увеличивающий белок, дефенсины, кателицидины и др.) 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, 1988). 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; Pargy et al., 1981). Значительное снижение резистентности организма к бактериальной инфекции наблюдается в случаях с наследственно обусловленным отсутствием или дефицитом специфических гранул нейтрофилов и их основного компонента — лактоферрина (Spitznagel et al., 1972; Strauss et al., 1974; Komiyama et al., 1979). Подобная же морфобиохимическая и функциональная особенность нейтрофилов встречается при острой и хронической грану-

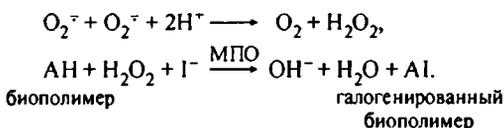
лоцитарных лейкомиах (Odeberg et al., 1976) и ожоговой болезни (Davis et al., 1980) у людей. Во всех рассмотренных примерах функциональная неполноценность нейтрофилов обусловлена в значительной степени отсутствием или недостаточностью в них лактоферрина. Это тем более парадоксально, что сам по себе этот 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 йодида) аналогичны содержимому фаголизосом. В этих условиях аполактоферрин свиньи — форма белка, лишенная 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 *St. epidermidis*, штамм 9198. 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. 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 раздельного испытания анализируемых белков. Бактерицидное действие зависит от наличия всех веществ, составляющих кооперативную

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  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ . Среди них есть микробные супероксиддисмутазы и каталаза, которые вследствие потери важных металлов каталитического центра инактивируются. Это приводит к обогащению области поверхностных структур бактерии супероксидом ( $O_2^-$ ) и продуктом его спонтанной дисмутации — перекисью водорода ( $H_2O_2$ ). 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, свидетельствует чувствительность системы к экзогенной каталазе и независимость 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 микробоцидной функции нейтрофилов как компонента, создающего условия для пролонгированного действия МПО-системы. Подобные синергические эффекты при совместном действии на бактерии аполактоферрина и МПО были также показаны в нашей лаборатории и в случае использования хлорида в качестве кофактора миелопероксидазной системы,

причем как в отношении грамположительной (*Listeria monocytogenes*), так и в отношении грамотрицательной бактерий (*E. coli*) (Берлов, 2004).

МПО 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; Clark, Klebanoff, 1980), что можно рассматривать в качестве провоспалительного эффекта.

Миелопероксидазная система может ослаблять функциональную активность естественных киллеров (НК-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, НК-клетки) подвержены ингибиторному воздействию со стороны миелопероксидазной системы (El-Hag et al., 1986). Наиболее чувствительны к ней антителопродуцирующие В-лимфоциты, а естественные киллеры и Т-лимфоциты — в меньшей степени.

МПО как модификатор структуры медиаторов и ферментов может вовлекаться в разнообразные стороны протекания воспалительных процессов. В частности, МПО-система может инактивировать один из ведущих ингибиторов сериновых протеиназ —  $\alpha$ -1-ингибитор протеиназ ( $\alpha$ -1-антитрипсин), окисляя его метионильные остатки (Matheson et al., 1979; Matheson, Travis, 1985). Непосредственно инактивирующим  $\alpha$ -1-ингибитор агентом является гипохлорная кислота — один из основных продуктов МПО-системы. Инактивация  $\alpha$ -1-ингибитора протеиназ может привести 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 (Perpin, Weiss, 1986) нейтрофилов. Коллагеназа — металлоэнзим, сохраняющийся в латентной форме в гранулах нейтрофилов. После активации и секреции из клеток она избирательно расщепляет межклеточный коллаген.

Окисляя  $\epsilon$ -аминогруппы лизиновых остатков эластина (Clark et al., 1986) и других белков (Stahmann et al., 1977) МПО-система инициирует сшивание белковых молекул, которое может привести к образованию нерастворимых полимеров, откладывающихся в воспаленной соединительной ткани. Также, 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 В<sub>4</sub> (Henderson et al., 1982) и С<sub>4</sub> (Lee et al., 1983). Она в состоянии инактивировать также растворимые хемотаксические пептиды — С<sub>5</sub>а и формилметиониловые пептиды (Clark, Klebanoff, 1979b; Clark, Szot, 1982). Молекулярный механизм инактивации этих пептидов связан с окислением тиозэфирной группы метионина (Clark et al., 1980), которое приводит к снижению аффинитета хемотаксинов к их 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 МПО-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 МПО было осуществлено при совместном введении фермента и алкилирующего соединения (тиотепа) крысам с аденокарциномой молочной железы (Schultz et al., 1976).

### 3. 2. 3. Фенолоксидаза в иммунитете беспозвоночных

Многие беспозвоночные имеют открытую кровеносную (циркуляторную) систему, а потому их выживание возможно при условии наличия развитой системы локального свертывания крови (гемолимфы), сопряженной с постоянно действующими иммун-

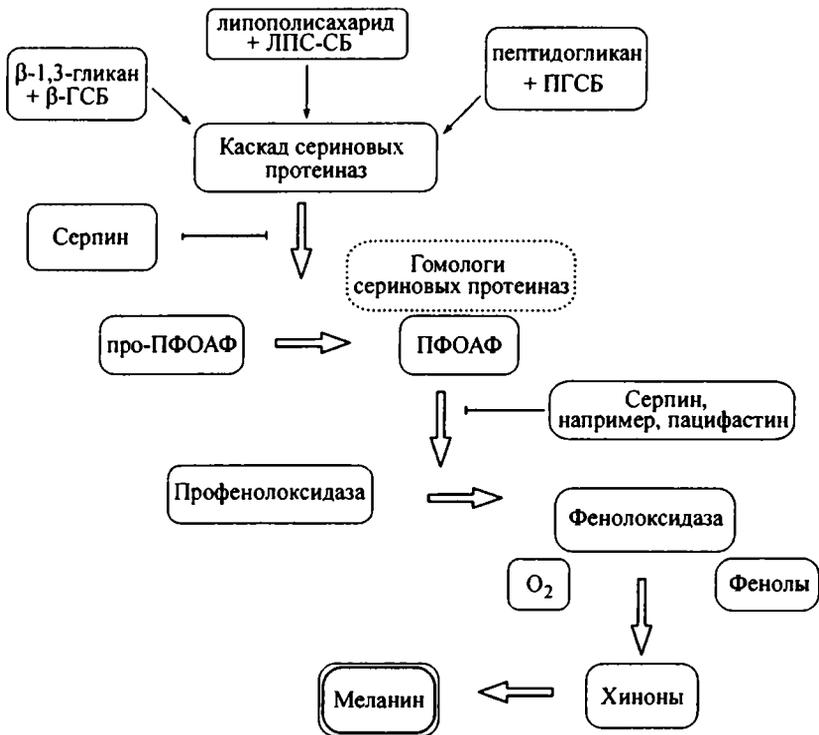


Рис. 10. Основные пути активации фенолоксидазной системы беспозвоночных.

ными механизмами распознавания, нейтрализации и элиминации патогенов инфекционной природы (Johansson, Soderhall, 1996). Одним из таких иммунных механизмов является фенолоксидаза (ФО) (Soderhall et al., 1994) и инициирующая ее профенолоксидазоактивирующая система.

Профенолоксидазоактивирующая система состоит из нескольких белков, среди которых ведущими являются рекогносцировочные белки, сериновые протеиназы, их ингибиторы и профенолоксидаза.

Фенолоксидаза (ФО) (монофенил-L-допа: кислород оксидоредуктаза; КФ 1.14.18.1) обнаружена в гемолимфе и целомической жидкости у многих беспозвоночных, но наиболее детально изучена у насекомых и ракообразных (Soderhall, Cerenius, 1998; Cerenius, Soderhall, 2004). Фермент катализирует окисление фенолов до хинонов, которые в свою очередь неэнзиматическим путем полимеризуются до меланина (рис. 10). Как промежуточные продукты окисления фенолов, так и меланин, являются токсичными для микроорганизмов соединениями (Soderhall et al., 1996).

ФО у исследованных видов животных находится в циркуляции (крови, гемолимфе, целомической жидкости) в неактивной форме как профенолоксидаза, которая активизируется ступенчатым образом профенолоксидазоактивирующим ферментом (ПФОАФ). Запуск последнего осуществляется при попадании во внутреннюю среду животного микробных клеток и/или компонентов их стенок (липополисахариды, пептидогликаны,  $\beta$ -1,3-гликаны), которые по принятому в настоящее время определению являются патогенассоциированными молекулярными паттернами. Активаторами профенолоксидазной системы у насекомых являются именно все три разновидности молекул микробного происхождения. Это свидетельствует о том, что у них существует эволюционно выверенная система распознавания чужеродного («несвоего»), которая может быть отнесена к паттернраспознающим рецепторам (молекулам) (Janeway, 1989, 1992). Рассматриваемая система представляет собой механизм защиты против инфекции, сочетающий в себе как распознающие патогенные («несвои» молекулы), так и инактивирующие их активности. Известно, что меланин — конечный продукт функционирования ФО-системы — обладает фунгистатической активностью (Soderhall, Ajaxon, 1982; Rowley et al., 1990), генерирует факторы, иммобилизующие бактерии (Margaras et al., 1993) и обладающие противовирусным действием (Ourth, Renis, 1993). С активацией профенолоксидазной системы связывают и эффективность таких защитных процессов как фагоцитоз, инкапсуляция, образование узелков (nodules), миграция и адгезия клеток крови (Johansson, Soderhall, 1996). По-видимому, не случайно некоторые паразиты, успешно внедряющиеся в тело животных, часто подавляют именно профенолоксидазоактивирующую систему (Soderhall, 1982; Beauvais et al., 1989).

ПФО и гемоцианины членистоногих, гексамерины и арилфориновый рецептор насекомых, Cr-PI аллерген таракана являются белками одного семейства (Burmester, Scheller, 1996; Durstewitz, Ternilliger, 1997). Первая ФО вторичноротого животного была клонирована из асцидии *Halocynthia roretzi* (Sato et al., 1997). ПФО ракообразных синтезируется в клетках крови, в то время как гемоцианин — в гепатопанкреасе (Aspan et al., 1995).

ПФО является ферментом, выделенным из крови некоторых членистоногих (раков и насекомых). Она имеет молекулярную массу от 70 до 90 кДа, а ФО от 60 до 70 кДа. ПФО рака *Pacifastacus leniusculus* имеет изоточку 5.4 и содержит два иона меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) (Aspan, Soderhall, 1991). Гены ПФО некоторых членистоногих клонированы, определена первичная структура белка (Aspan et al., 1995). Он имеет два сайта связывания ионов меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Установлена структурная гомология ПФО речного рака *Pacifastacus leniusculus* и трех видов насекомых *Manduca sexta*, *D. melanogaster* и *Bombyx mori*.

Фенолоксидаза (ФО) является гидрофобным белком, неспецифически сорбирующимся на различных поверхностях *in vitro* (Soderhall, Unestam, 1979). Активность ФО приводит к ковалентному сшиванию многих белков (Ashida, Yoshida, 1988), в том числе и молекул самого фермента, когда исследователи обнаруживают его агрегаты. ПФО активируется в результате ограниченного протеолиза молекулы различными протеазами *in vitro*. В случае ФО рака доказано наличие эндогенного фермента, осуществляющего расщепление ПФО в крови (Aspan, Soderhall, 1991), который является сериновой протеиназой. ПФО *in vitro* может быть активирована непротеолитическим путем посредством нагревания или инкубации с детергентами. При подобных воздействиях в молекулах ПФО происходят конформационные изменения, способствующие проявлению оксидазной активности фермента. Физиологическая значимость этого варианта активации фермента остается неясной.

ПФО локализована в гранулярных клетках крови рака (Soderhall, Smith, 1983). В процессе мерокриновой секреции фермент высвобождается в плазму в неактивной форме, и активация всей системы осуществляется уже внеклеточно после взаимодействия с компонентами микробных клеток. У некоторых насекомых наблюдается подобная ситуация с активацией фермента (Leonard et al., 1985), в то время как у других он циркулирует в плазме в форме предшественника (Ashida, 1971). Профенолоксидазоактивирующий фермент является сериновой протеазой, которая в свою очередь в плазме предшествует также в проформе, активируемой, в частности, компонентом стенки низших грибов  $\beta$ -1,3-гликаном (Aspan, Soderhall, 1991). Эта последовательность превращений доказана для анализируемой системы у рака *P. leniusculus*. Кутикула насекомых также может быть источником рассматриваемого фермента (Dohke, 1973; Saul, Sugumaran, 1986), наряду с энзимом, локализованным в гемолимфе. Есть сведения о том, что и в отсутствие микробных компонентов, но при наличии низких концентраций  $\text{Ca}^{2+}$ , может происходить трансформация ПФО в ФО (Soderhall, 1981).

Активность системы также регулируется ингибиторами протеиназ. Из плазмы рака *P. leniusculus* выделен высокомолекулярный ингибитор трипсина (Hergenhanu et al., 1987). Из тканей ряда животных выделен гомолог  $\alpha_2$ -макроглобулина позвоночных, который подавляет активность протеаз, участвующих в активации ПФО (Armstrong, Quigley, 1999).

ПФО-активирующий фермент (ПФОАФ) активируется  $\beta$ -1,3-гликанами низших грибов, липополисахаридами грамотрицательных бактерий и пептидогликанами грамположительных бактерий. Распознавание  $\beta$ -1,3-гликанов специфично, поскольку  $\alpha$ - или  $\beta$ -1,4-гликаны не иницируют ПФО активирующую систе-

му (Unestam, Soderhall, 1977). Минимально активирующая цепь  $\beta$ -1,3-гликана должна включить пять моносахаров (Soderhall, Unestam, 1979).

Активаторы микробного происхождения инициируют ПФОАФ членистоногих, иглокожих и асцидий. Белки, связывающие  $\beta$ -1,3-гликаны, очищены из плазмы шелкопряда *Bombyx mori* (Ochiai, Ashida, 1988), таракана *Blaberus crumifer* (Soderhall et al., 1988), а также некоторых ракообразных (Soderhall et al., 1994). После удаления  $\beta$ -1,3-гликансвязывающего белка ( $\beta$ -ГСБ) профенолоксидазоактивирующая система шелкопряда не активируется  $\beta$ -1,3-гликаном (Yoshida et al., 1986). Необходимо подчеркнуть, что это не единственная функция  $\beta$ -ГСБ. После взаимодействия  $\beta$ -ГСБ с  $\beta$ -1,3-гликаном происходит связывание комплекса с мембранным рецептором клеток крови. В результате этого последние секретируют компоненты ПФО-системы в ответ на грибковую инфекцию (Baggaso et al., 1991). У ракообразных  $\beta$ -ГСБ стимулирует фагоцитоз низших грибов клетками крови (Thornqvist et al., 1994). Первичная структура рассматриваемого белка не имеет очевидных гомологов, но содержит в своем составе триплет RGD, который ответственен за связывание фибронектина и ряда других внеклеточных белков с рецепторами интегринового семейства.  $\beta$ -1,3-гликансвязывающий белок, отличный от такового ракообразных и насекомых, выделен из подковообразного краба (мечехвоста). Он носит название фактора G (Muta, Iwanaga, 1996), аутокаталитически расщепляется в присутствии  $\beta$ -1,3-гликана, что создает предпосылки для активации системы, свертывающей гемолимфу. Необходимо подчеркнуть, что мечехвосты не содержат фенолоксидазу, но между каскадами активации их свертывающей гемолимфы системы и профенолоксидазоактивирующей системой ракообразных, насекомых и других беспозвоночных наблюдается заметное сходство.

Наряду с  $\beta$ -ГСБ у членистоногих обнаружены и липополисахаридсвязывающие белки (ЛПС-СБ) (Jomori et al., 1990), в том числе у мечехвостов фактор С (Iwanaga et al., 1992). В плазме шелкопряда описан пептидогликансвязывающий белок (ПГСБ), который участвует в активации фенолоксидазной системы (Yoshida et al., 1986). Эндогенные лектины таракана *Blaberus discoidalis* (Chen et al., 1995) и фосфолипиды мечехвоста *Limulus polyphemus* (Nellaiappan, Sugumaran, 1996) могут инициировать процесс активации фенолоксидазной системы.

ПФО-активирующему каскаду белков сопутствуют белки клеточной адгезии. Одним из таких белков является рецептор белка, связывающего  $\beta$ -1,3-гликан. Поскольку белок, связывающий  $\beta$ -1,3-гликан, и белки клеточной адгезии стимулируют клеточное распластывание, дегрануляцию и фагоцитоз, постольку есть основания предполагать присутствие в клетках рецепто-

ров к этим белкам. Такой рецептор для  $\beta$ -ГСБ идентифицирован и очищен (Duvic, Soderhall, 1992). Есть основания рассматривать его и в качестве рецептора белка клеточной адгезии. Взаимодействие лигандов-белков с рецептором клеток крови приводит к секреции из них компонентов профенолоксидазоактивирующей системы.

Следует обратить внимание на то, что профенолоксидазоактивирующая система и система комплемента имеют ряд сходных функциональных черт. Они обе активируются компонентами клеточных стенок микроорганизмов и генерируют опсонические факторы. Наконец, ПФО рака *P. leniusculus* содержит комплемент-подобный структурный домен.

Совокупность представленных данных свидетельствует о том, что профенолоксидазоактивирующая система функционирует, сочетая в себе рекогносцировочные и эффекторные свойства. Она развита у некоторых классов членистоногих (ракообразные, насекомые), иглокожих и оболочников. Активирование системы осуществляется  $\beta$ -1,3-гликанами, липополисахаридами и пептидогликанами, которые, связываясь с белками системы, приводят к превращению пропротеиназы (ПФОАФ) в сериновую протеиназу, переводящую в свою очередь профенолоксидазу в фенолоксидазу. Образование и полимеризация меланина на поверхности патогена завершает процесс активации профенолоксидазы, происходящий в гемолимфе или кутикуле. У рака *P. leniusculus* с рассматриваемой системой, по-видимому, в ряде случаев кооперирует адгезионный белок с пероксидазной активностью, известный как пероксинектин (Johansson et al., 1995).

### **3. 3. Кислороднезависимые механизмы инактивации микроорганизмов при фагоцитозе и воспалении**

Ранний период изучения кислороднезависимых механизмов инактивации микроорганизмов был связан с поиском веществ, которые И. И. Мечников (1903) определял как «цитазы». Под «цитазом» (автор использовал этот термин в мужском роде) И. И. Мечников понимал внутриклеточное бактерицидное вещество белковой природы с ферментативным, преимущественно протеолитическим, механизмом антимикробного действия. Он допускал существование разнообразных по ферментативной специфичности «цитазов», совокупность которых в микрофагах (нейтрофильных гранулоцитах) была обозначена им как «микроцитаз», а в моноцитах/макрофагах как «макроцитаз». Причем он не исключал того, что подобное деление цитазов из двух источников относительно условно и допускал присутствие идентичных антимикробных компонентов как в макро-, так и в микроцитазе,

но в разных количественных соотношениях. И. И. Мечников интуитивно предполагал, что «последний акт фагоцитарной реакции заключается в химическом или физико-химическом процессе переваривания микробов посредством цитазов...», и в этом, по его мнению, состоит ключевая биологическая роль этих соединений в формировании невосприимчивости (иммунитета) к инфекции бактериальной и грибковой этиологии.

Необходимо, однако, отметить, что концепция «цитаз» И. И. Мечникова носила преимущественно характер гипотезы до тех пор, пока Ф. Петтерсон в 1905 г. не выделил из лейкоцитов гноя человека антимикробные субстанции, которые по заключению автора представляли смесь щелочных протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб (Pettersson, 1905).

Продолжение этих исследований имело место только через 50 лет и было по времени и идеологически сопряжено 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). Антимикробные свойства фагоцитов в тот период пытались связать с активностью кислых гидролаз лизосом этих клеток. Однако уже в первых работах этого направления было продемонстрировано, что бактерицидная активность препаратов «лейкин» (Scarnes, Watson, 1956) и «фагоцитин» (Hirsch, 1956), полученных из псевдоэозинофилов (клеток структурно и функционально гомологичных нейтрофильным гранулоцитам человека) 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), которые из смеси кислоторастворимых белков гранул (лизосом) псевдоэозинофилов кролика и морской свинки выделили 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, отсутствующие у параллельно изученных кислых гидролаз (кислая фосфатаза, РНКаза, ДНКаза,  $\beta$ -глюкуронидаза) лейкоцитов (Zeya et al., 1966). Следует отметить, что этим биохимическим исследованиям предшествовали морфологические, в которых с использованием красителя прочного зеленого, селективно выявляющего основные по природе белки и пептиды, был установлен факт переноса лизосомных катионных белков на поверхность фагоцитированных бактерий и грибов, по времени совпадающий с потерей микроорганизмами жизнеспособности (Spitznagel, Chi, 1963). В своей совокупности эти наблюдения, которые получили дальнейшее развитие в исследованиях школы отечественных морфологов

(Пигаревский, 1983, 1988), дали основание рассматривать низкомолекулярные лизосомные катионные белки (полипептиды) нейтрофильных гранулоцитов (НГ) в качестве специализированной группы веществ, проявляющих в отношении фагоцитированных микробов цитотоксическую активность. В настоящее время эти полипептиды названы дефенсинами (от англ. defense — защита, оборона) (Ganz et al., 1985), они выделены и секвенированы из НГ человека, крупного рогатого скота, кролика, крысы, морской свинки, хомячка, курицы и индейки (Lehger et al., 1993; Кокряков и др., 1997). Их структура характеризуется наличием большого числа остатков основных аминокислот (аргинин, лизин) и шести остатков цистеина, образующих три внутримолекулярных дисульфидных мостика (в частности, дефенсин человека HNP-1: ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC). По механизму антимикробного действия дефенсины относятся к молекулярным перфораторам мембран клеток-мишеней. Формируя неспецифические поры и каналы в цитоплазматической мембране бактерий и грибов, они нарушают структурную целостность клеток, вызывают утечку из них жизненно важных компонентов, способствуют проникновению воды в клетки, их набуханию и осмотическому лизису. Таким образом, антимикробное действие дефенсинов не связано с каким-либо известным энзиматическим механизмом. (Сходным образом действуют на микроорганизмы описанные нами в совместных исследованиях с американскими учеными катионные пептиды из нейтрофилов свиньи — протегрины (Кокряков et al., 1993). В гранулярном аппарате НГ обнаружено еще несколько белковых компонентов с неферментативным механизмом антимикробного действия, которые наряду с дефенсинами будут более подробно рассмотрены нами далее.

### **3. 3. 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; Салаяев, Романенко, 1979; Фрейдлин, 1984; Маянский А., Маянский Д., 1983, 1989; Тотолян, Фрейдлин, 2000) и зарубежных исследователей (Klebanoff, Clark, 1978; Spitznagel, 1984; Lopez-Berestein, Kilbourn, 1985; Gleich, Adolphson, 1986; Elsbach, Weiss, 1992; Furth, 1992) 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, 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 (Bainton et al., 1971; Пигаревский, 1978; Baggiolini, Dewald, 1985; Gleich, Adolphson, 1986), являющегося депо физиологически активных веществ антибиотического действия, среди которых ведущую роль в умерщвлении (киллинге) микроорганизмов играет группа катионных белков и полипептидов (миелопероксидаза, лактоферрин, бактерицидная проницаемость увеличивающий протеин, эластаза, катепсин G, лизоцим, дефенсины и др.) (Ашмарин и др., 1972, 1977; Роговин и др., 1977; Кокряков и др., 1983, 1997; Ganz et al., 1985; Klebanoff, 1988; Spitznagel, Shafer, 1985; Elsbach, Weiss, 1988). Наряду с фагоцитами, многие эпителиальные клетки животных продуцируют также широкий спектр антимикробных пептидов и белков, обеспечивающих их резистентность к инфекции (Bevins, 2003).

В настоящее время уже определены первичные структуры более 900 индивидуальных антимикробных пептидов и белков, принадлежащих к разным гомологическим семействам. Все эти соединения составляют важный молекулярный механизм врожденного иммунитета животных. Обладая антимикробной активностью, эти соединения характеризуются относительно низкой токсичностью по отношению к собственным клеткам макроорганизма (организма-хозяина). Антимикробные пептиды в перспективе могут рассматриваться в качестве дополнения и замены в медицинской и ветеринарной практике конвенциональным (общепринятым) антибиотикам микробного происхождения, к которым очень быстро формируется резистентность бактерий (антибиотикоустойчивость бактерий). В связи с этим структурно-функциональное изучение пептидных антибиотиков животного происхождения создает предпосылки для разработки и производства химически или биотехнологически синтезированных гомологов этих соединений, которые могли бы найти применение в медицине и ветеринарии. Большинство этих пептидов по своим электрохимическим свойствам являются катионными (основными, щелочными) молекулами. Наряду с основными аминокислотами (аргинин, лизин, гистидин), эти пептиды содержат в своей структуре значительное число остатков аминокислот, несущих гидрофобные боковые группы (валин, лейцин, изолейцин, пролин, метионин, фенилаланин, триптофан). Причем, как правило, в функционально-активной молекуле антибиотических пептидов аминокислотные остатки, несущие

щие основные и гидрофобные боковые группы, пространственно разобщены, что определяет амфипатические (амфифильные) свойства нативных молекул (амфипатический характер их структуры). Последнее свойство рассматриваемых молекул является одним из необходимых структурных условий, обеспечивающих их функционирование в качестве эффективных мембранодезорганизующих веществ, направленных на клетки-мишени.

Исследования в растворах структуры антибиотических пептидов методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР) позволило идентифицировать среди них несколько основных классов (групп):  $\alpha$ -спиральные (LL37, магейнины, цекропины, буфорин), цистинсодержащие  $\beta$ -складчатые ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\theta$ -дефенсины, дефенсины насекомых, дрозомидин, протегрины, тахиплезины, лактоферрицин В), пептиды с невыраженной вторичной структурой (PR39, бактенецины, гистатины, индолицидин).

Рассмотрению природы низкомолекулярных антимикробных веществ различных клеточно-тканевых структур животных организмов, механизмов их действия и значению в формировании резистентности к инфекции посвящены последующие разделы книги.

### 3. 3. 2. Структура и антимикробные свойства $\alpha$ -дефенсинов

Изучение природы и функциональных 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 (Ganz et al., 1985). Последний термин отражает основное функциональное назначение рассматриваемых пептидов — способность обеспечивать защиту макроорганизма от возбудителей инфекционных болезней. В свете биохимических (Кокряков и др., 1981, 1983; Spitznagel, 1984; Кокряков, 1990; 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 компонента и дефенсина. При анализе электрофореграмм кислоторастворимых белков нейтрофилов некоторых видов животных и человека обращает на себя внимание своеобразие белковых спектров лейкоцитов кролика (Zeya et al., 1966), морской свинки (Zeya, Spitznagel, 1966a, 1966b; Selsted, Harwig, 1987) и кур (Brune, Spitznagel, 1973), которые характеризуются присутствием низкомолекулярных, опережающих по электрофоретической подвижности лизоцим, катонных

компонентов. Эта группа полипептидов и получила в настоящее время наименование дефенсинов. Сходные катионные полипептиды были обнаружены в нейтрофилах крыс (Ranadive, Cochrane, 1970; Hodinka, Modrzakowski, 1983), коров (Gennaro et al., 1983) и хомячка (Mak et al., 1996). Дефенсины, как физиологически активные вещества, отличает высокая микробоцидная активность, что и послужило основанием для их всестороннего физико-химического изучения.

В ранней (Zeya, Spitznagel, 1966a, 1966b, 1968, 1971; Ranadive, Cochrane, 1968) и последующих (Selsted et al., 1984, 1985a, 1985b) 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. 11).

Отличительным признаком молекул дефенсинов кролика является высокое (от 5 до 10 остатков) содержание в их составе аминокислоты аргинина, что в значительной степени определяет их катионный заряд, высокую изоэлектрическую точку ( $pI > 10.5$ ) и, как следствие, опережающую остальные кислоторастворимые белки нейтрофилов электрофоретическую подвижность в направлении к катоду. 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 тремя антипараллельными  $\beta$ -тяжами, образующими  $\beta$ -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 четвертым (2—4 S-S-связь) и третий с пятым (3—5 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. Эта особенность их строения подтверждена кристаллографическим (Stanfield et al., 1988; Hill et al., 1991) и ЯМР-спектроскопическим (Pardi et al., 1988) исследованиями. В дополнение к этому выявлено пространственное разделение в свернутой глобуле остатков аминокислот, несущих боковые по-

ложительно заряженные и гидрофобные группы, что дает основание характеризовать молекулу как амфипатическую. Подобная амфипатическая (амфифильная) структура дефенсинов делает их активными мембранотропными соединениями, способными не только к взаимодействию с фосфолипидами за счет электростатических свойств своей молекулы, но и внедрению в липидный бислой благодаря гидрофобным взаимодействиям (Selsted, 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., 1985a, 1985b). Общий план их строения сходен с таковым дефенсинов кролика (рис. 11), для которого характерно консервативное расположение 6 остатков цистеина, 1 — глицина, 2 — 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. В ходе 6—24-часового процессинга препредефенсина HNP-1 происходит последовательное отщепление от его N-концевой части сначала гидрофобного сигнального пептида (MRTLAILAAILLVALQAQA), затем в 2 этапа анионного профрагмента (EPLQARADEVAAAPEQIA, ADIPEVVVSLAWDES-LAPKHPGSRKNN) с образованием конечной, функционально активной молекулы дефенсина: ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQ-GRLWAFCC (Valore, Ganz, 1992). По мнению авторов, биологический смысл установленной последовательности посттрансляционного процессинга молекулы препредефенсина заключается в предупреждении аутокотического 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), хомячка (Mak et al., 1996) и обезьяны *Macaca mulatta* (Tang et al., 1999a), молекулы которых построены по единому структурному принципу, что позволяет отнести все рассмотренные полипептиды к одному гомологическому классу веществ —  $\alpha$ -дефенсинам (рис. 11). По-видимому, к семейству  $\alpha$ -дефенсинов можно отнести и пептид из кожных покровов морской миноги *Petromyzon*

### Дефеннины человека

HNP-1  
HNP-2  
HNP-3  
HNP-4  
HD-5  
HD-6

1 2 3 4 56

ACYCRIP-ACIAGERRRYGTCTIYQGR-L-WAFCC  
CYCRIP-ACIAGERRRYGTCTIYQGR-L-WAFCC  
DCYCRIP-ACIAGERRRYGTCTIYQGR-L-WAFCC  
VCYCRILV-FCRRTELVRVGNCLIGGV-S-PTYCCTRV  
ATCYCRMG-RCATRESLSGVCEISGR-L-YRLCCR  
TCHCR-R-SCYSTEYSYGTCTVMGIN-HRFCC-L

### Дефеннины обезьяны *Macaca mulatta*

RMAD-1  
RMAD-3  
RMAD-4  
RMAD-6

ACYCRIP-ACLAGERRRYGTCTFYLRV-WAFCC  
ACYCRIP-ACLAGERRRYGTCTFYRRV-WAFCC  
RRTCRCRFG-RCFRRESYSGSCNINGRI-FSLCCR  
RRTCRCRFG-RCFRRESYSGSCNINGRI-SSLCCR

### Дефеннины кролика

NP-1 (MCP-1)  
NP-2 (MCP-2)  
NP-3a  
NP-3b  
NP-4  
NP-5  
NP-6  
desG1-NP-6

VVCACRRAL-CLPLERRRAGFCRIRGRI-HPLCCR  
VVCACRRAL-CLPLERRRAGFCRIRGRI-HPLCCR  
GICACRRR-FCPNSERFSGYCRVNGAR-YVRCCSRR  
GRCVCRQLLCSYERIRIGDCKIRGVR-PFPCCPR  
VSCICRRF-SCGFGERASGSCIVNGVR-HTLCCR  
VFCRCRGL-CGSGERASGSCIVNGVR-HTLCCR  
GICACRRR-FCLNFERQSGYCRVNGAR-YVRCCSRR  
ICACRRR-FCLNFERQSGYCRVNGAR-YVRCCSRR

### Дефеннины крысы

RcNP-1  
RcNP-2  
RcNP-3  
RcNP-4

VTCYCRRT-RCGFRERLSGACGYRRI-YRLCCR  
VTCYCRST-RCGFRERLSGACGYRRI-YRLCCR  
CSCRTS-SCRFERLSGACRLNGRI-YRLCC  
ACYCRIG-ACVSGERLTGACGLNGRI-YRLCCR

### Дефеннины морской свинки

GPCP-1  
GPCP-2

RRICITTR-TCRFPYRRLGTCTIFQNRV-YTFCC  
RRICITTR-TCRFPYRRLGTCTIFQNRV-YTFCC

### Дефеннины (криптины) мыши

Сгуп-1  
Сгуп-2  
Сгуп-3  
Сгуп-4  
Сгуп-5  
Сгуп-6

LRDLVCYCRSR-GCKRREEMNGTCRK-GHLLYTLCCR  
LRDLVCYCRTR-GCKRREEMNGTCRK-GHLMYTLCCR  
LRDLVCYCRKR-GCKRREEMNGTCRK-GHLMYTLCCR  
GLLCYCRKG-HCKRGERVRGTC---G-IRFLYCCPRR  
LSKLLICYCRIR-GCKRREVRFGTCRN-LFLTFFVCCS  
LRDLVCYCRAR-GCKRREEMNGTCRK-GHLLYMLCCR

### Дефеннины хомячка

HaNP-1  
HaNP-2  
HaNP-3  
HaNP-4

VTCFCRRR-GCASREERHIGYCRF-GNTIYRLCCRR  
CFCKRP-VCDSETQIGYCR-L-GNTFYRLCCRQ  
VTCFCRRR-GCASREERLIGYCRF-GNTIYGLCCRR  
VTCFCRKP-VCDSETQIGYCR-L-GNTFYRLCCRQ

Рис. 11. Первичные структуры дефеннинов млекопитающих.

Инвариантные (консервативные) аминокислотные остатки отмечены *жирным шрифтом*. Пробелы в аминокислотных последовательностях ряда пептидов введены с целью оптимального сопоставления структур на степень гомологии (сходства). А — аланин, С — цистеин, D — аспарагиновая кислота, E — глутаминовая кислота, pE — пироглутаминовая кислота, F — фенилаланин, G — глицин, H — гистидин, I — изолейцин, K — лизин, L — лейцин, M — метионин, N — аспарагин, P — пролин, Q — глутамин, R — аргинин, S — серин, T — треонин, V — валин, W — триптофан, Y — тирозин. 1, 2, 3, 4, 5, 6 — порядковый номер цистеиновых остатков в молекуле.

*marinus*, принадлежащей к классу круглоротых (Cyclostomata), подтипу позвоночных (Vertebrata), типу хордовых (Chordata), который был выделен и секвенирован в 1996 г. (Conlon, Sower, 1996). Первичная 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 RatNP-1, хотя в ней отсутствует остаток E.

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  $\alpha$ -дефенсины. Еще в начале 80-х гг. 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., 1989) и расшифрована первичная структура этих полипептидов из клеток Панета, локализованных в покровном эпителии слизистой тонкого кишечника мышей (Eisenhauer et al., 1992; Selsted et al., 1992). Эти дефенсины получили в литературе наименование криптдинов (Eisenhauer et al., 1992), поскольку они локализованы в клетках кишечных крипт. Структура некоторых интестинальных дефенсинов мыши приведена на рис. 11. 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 резистентности организма к инфекции.

В условиях *in vitro* продемонстрированы бактерицидная (Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a, 1966b; Zeya et al., 1966; Кокряков, 1973; Кокряков и др., 1977; Анатолий и др., 1977; Ашмарин и др., 1977; 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 (Spitznagel, 1984; Ganz et al., 1985; Кокряков, 1988; Lehrer et al., 1991, 1993; Кокряков и др., 1997). 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 трансфецированной клетке была подтверждена определением пептидных молекул иммуноцитохимическим и иммуноферментным методами. Далее авторы оценивали способность исходных и трансфецированных 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 имеющихся место в зрелых нейтрофилах человека ( $\sim 50$  мкг/ $10^7$ ) и альвеолярных макрофагах кролика ( $6.5\text{--}20$  мкг/ $10^7$  клеток).

О значимости энтеральных дефенсинов (криптин) мыши в формировании противоинойфекционной резистентности на уровне кишечного тракта свидетельствуют эксперименты с животными, у которых генетическими методами делетирован ген металлопротеиназы матрилизин-7 (Wilson et al., 1999). Эта протеиназа в клетках Панета тонкого кишечника ответственна за процессинг продефенсинов в дефенсины, которые после секреции из этого типа клеток обеспечивают резистентность к инфекции на уровне кишечного тракта. Животные с нокаутом по гену матрилизина-7 характеризуются повышенной чувствительностью к сальмонеллезной инфекции по сравнению с мышами дикого типа. В другой работе были получены трансгенные мыши с дополнительным геном дефенсина человека HD5, который экспрессировался в клетках Панета экспериментальных животных наряду с генами эндогенных дефенсинов кишечника мыши, известных как криптины (Salzman et al., 2003). Трансгенные животные приобретали повышенную резистентность к летальной для мышей дикого типа инфекционной дозе *S. typhimurium*.

В морфологических исследованиях, проводимых под руководством профессора В. Е. Пигаревского в 70—90-е гг. XX в. в НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, 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 метод 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 микробоцидной активности нейтрофилов при различных формах инфекционной патологии.

Наряду с антимикробным действием,  $\alpha$ -дефенсины в культуральных условиях могут проявлять и цитотоксические свойства в отношении опухолевых (Lichtenstein et al., 1986; Плещак и др., 2000) и нормальных клеток (тимоцитов, спленоцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, эндотелиоцитов и эритроцитов) собственного организма (Lichtenstein et al., 1988; Okrent et al., 1990). Предполагают (Lehrer et al., 1993), что дефенсины являются одним из молекулярных агентов, ответственных за реализацию антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности в отношении герпесинфицированных клеток (Siebens et al., 1979). Целью исключить участия HNP1-3 в противовирусной защите. У небольшой группы пациентов, для которых характерно носительство вируса иммунодефицита человека (HIV1) без видимого проявления заболевания, при клиническом исследовании было неожиданно установлено, что их CD8<sup>+</sup>Т-лимфоциты синтезируют дефенсины HNP1-3. Для больных с быстро прогрессирующей формой заболевания не характерна экспрессия дефенсинов в цитотоксических лимфоцитах. Авторы работы связывают благоприятное для некоторых пациентов течение заболевания со способностью их цитотоксических лимфоцитов продуцировать дефенсины, обладающие прямым вирусоцидным действием по отношению к оболочечным вирусам (Zhang et al., 2002). Антивирусное действие HNP1-3 также может быть связано со способностью пептидов избирательно связываться по лектиновому типу взаимодействий с галактозой, входящего в состав поверхностных структур вириона HIV1 или (и) белка CD4 Т-лимфоцитов (Wang et al., 2004). В результате чего нарушается процесс адгезии и пенетрации вируса в клетки-мишени.

В какой степени цитотоксическая активность дефенсинов реализуется в условиях организма — это вопрос, который является предметом проводимых исследований (Ganz et al., 1992). Внеклеточная локализация части дефенсинов при фагоцитозе и воспалении является убедительно документированным фактом (Ganz, 1987; Panyutich et al., 1991, 1993). Однако благодаря быстрому и избирательному взаимодействию их с некоторыми плазменными белками, являющимися ингибиторами сериновых протеиназ и получившими в литературе название серпинов (Panyutich, Ganz, 1991; Panyutich et al., 1995), 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 боль-

шое количество кислых фосфолипидов (фосфатидилглицерола и кардиолипина), которые практически отсутствуют в цитоплазматической мембране 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, являясь одним из ведущих молекулярных факторов, обеспечивающих завершенность фагоцитоза (Spitznagel, Chi, 1963; Zeya, Spitznagel, 1963, 1966a, 1966b).

### 3. 3. 3. $\beta$ -Дефенсины

Первый представитель другого семейства дефенсинов, известных в настоящее время как  $\beta$ -дефенсины, был выделен из ресничного эпителия трахеи крупного рогатого скота и в литературе известен под названием трахеальный антимикробный пептид (TAP — tracheal antimicrobial peptide) (Diamond et al., 1991) (рис. 12). 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  $\alpha$ -дефенсинов из нейтрофилов кролика, морской свинки, человека и крысы, а потому было решено выделить пептиды с подобными структурными особенностями в отдельное семейство  $\beta$ -дефенсинов (Tang, Selsted, 1993). Необходимо подчеркнуть, что по своим вторичным и третичным структурам  $\beta$ -дефенсины, несмотря на ряд особенностей аминокислотной последовательности и аранжировки дисульфидных связей, оказались практически идентичными классическим, или  $\alpha$ -дефенсинам (Zimmerman et al., 1995). Поэтому не случайно они обладают, как правило, и сходной с  $\alpha$ -дефенсинами антимикробной активностью (Selsted et al., 1993; Harwig et al., 1994a, 1994b; Bals et al., 1998).

В 1995 г.  $\beta$ -дефенсин был выделен из эпителия языка коров (Schonwetter et al., 1995), продукция этого пептида возрастала при повреждении, ведущего к воспалению органа. Его структура оказалась гомологичной, но не идентичной TAP и  $\beta$ -дефенсинам из нейтрофилов коров, в связи с чем он был назван анти-

	1	2	3	4	56																																			
BNBD-1	DF	ASCH	TNGG	ICLP	NRCP	GHMI	QIGIC	FR	PR	VK	CC	RSW																												
BNBD-2	VR	NHV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	FG	PR	IK	CC	RSW																						
BNBD-3	PE	GVR	NHV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	FG	PR	IK	CC	RSW																					
BNBD-4	PE	VR	NP	Q	SCR	WN	MG	V	C	I	P	FL	CR	V	GM	R	QIG	TC	FG	PR	V	PC	CR																	
BNBD-5	PE	VVR	NP	Q	SCR	WN	MG	V	C	I	P	I	S	C	F	G	M	R	QIG	TC	FG	PR	V	PC	CR															
BNBD-6	PE	GVR	NHV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	FG	PR	VK	CC	RSW																					
BNBD-7	PE	GVR	NHV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	LG	P	RI	CC	RSW																					
BNBD-8	VR	NFV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	LG	P	RI	CC	RSW																						
BNBD-9	EG	VR	NFV	TCR	IN	RG	FC	VP	IR	CP	GR	TR	QIG	TC	LG	P	RI	CC	RSW																					
BNBD-10	PE	GV	RSY	LS	CG	WN	RG	IC	LL	NR	CP	GR	TR	QIG	TC	LA	PR	VK	CC	RSW																				
BNBD-11	GPL	SCR	R	NG	GV	C	I	P	I	R	C	P	G	M	R	QIG	TC	FG	PR	VK	CC	RSW																		
BNBD-12	GPL	SC	G	K	NG	GV	C	I	P	I	R	C	P	V	P	M	R	QIG	TC	FG	PR	VK	CC	RSW																
BNBD-13	SG	I	S	G	L	S	C	G	R	NG	GV	C	I	P	I	R	C	P	V	P	M	R	QIG	TC	FG	PR	VK	CC	RSW											
LAP	G	V	R	N	S	Q	---	S	C	R	R	K	G	I	C	V	P	I	R	C	P	G	S	H	R	QIG	TC	L	G	A	V	K	C	C	R	R				
EBD	G	F	T	Q	G	I	S	N	P	L	S	C	R	L	N	R	G	I	C	V	P	I	R	C	P	G	N	L	R	QIG	TC	F	P	S	V	K	C	C	R	R
TAP	G	V	G	N	P	---	S	C	V	R	N	K	G	I	C	V	P	I	R	C	P	G	S	M	K	QIG	TC	V	G	R	A	V	K	C	C	R	R			
hTAP	N	P	V	---	S	C	V	R	N	K	G	I	C	V	P	I	R	C	P	G	S	M	K	QIG	TC	V	G	R	A	V	K	C	C	R	R	R				
hBD-1	GL	G	H	R	S	D	H	Y	N	C	V	S	S	G	Q	C	L	Y	S	A	C	P	I	F	T	K	I	Q	G	T	C	Y	R	G	K	A	C	C		
hBD-2	G	I	G	D	P	---	T	C	L	K	S	G	A	I	C	H	P	V	F	C	P	R	R	Y	K	QIG	TC	L	G	P	T	K	C	C	K	K				
mBD-1	G	I	L	T	S	L	G	R	R	T	D	Q	Y	K	L	Q	H	G	F	L	R	S	S	C	P	S	N	T	K	L	Q	G	T	C	K	P	D	K	P	
GAL-1	GR	K	S	D	C	F	R	K	S	G	F	C	A	F	L	K	C	P	S	L	T	L	I	S	G	K	S	R	F	Y	L	-	C	C	K	R	I			
GAL-1α	GR	K	S	D	C	F	R	K	N	G	F	C	A	F	L	K	C	P	S	L	T	L	I	S	G	K	S	R	F	H	L	-	C	C	K	R	I			
CAL-2	L	F	C	---	K	G	S	C	H	F	G	G	C	P	S	H	L	I	K	V	G	S	C	F	G	F	R	S	-	C	C	K	W	P	W	N				
CHP-1	GR	K	S	D	C	F	R	K	S	G	F	C	A	F	L	K	C	P	S	L	T	L	I	S	G	K	S	R	F	Y	L	-	C	C	K	R				
CHP-2	GR	K	S	D	C	F	R	K	N	G	F	C	A	F	L	K	C	P	S	L	T	L	I	S	G	L	S	X	F	H	L	-	C	C						
THP-1	G	K	R	E	K	L	R	R	N	G	F	C	A	F	L	K	C	P	T	L	S	V	I	S	G	T	C	S	R	F	Q	V	-	C						

Рис. 12. Первичные структуры β-дефенсинов позвоночных животных. Консервативные аминокислотные остатки отмечены жирным шрифтом.

микробным пептидом языка (LAP — lingual antimicrobial peptide). Авторы показали, что мРНК этого пептида обнаруживается в эпителиях кожи лица, респираторного (трахеи, бронхов, легких) и репродуктивного трактов самцов и самок, мочеполовой и пищеварительной систем крупного рогатого скота.

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 данные о конститутивном синтезе BNBD-4 и BNBD-5 в их альвеолярных макрофагах (Ryan et al., 1998). Методом полимеразной цепной реакции выявлена экспрессия гена  $\beta$ -дефенсина в эпителиальных клетках тонкой кишки (Tarver et al., 1998), легких и мочеполового тракта (Bals et al., 1998) мыши. Молекулярно-генетическими методами выявлено присутствие генов  $\beta$ -дефенсинов в клетках свиньи (Zhang et al., 1998) и козы (Zhao et al., 1998).

Структурно-родственные  $\beta$ -дефенсинам крупного рогатого скота 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 гг. (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 этой 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 с соавт., 1983) нами была установлена интересная закономерность во взаимодействии хозяин—паразит: резистентность кур к 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 было осуществлено выделение и изучение структурно-функциональных свойств рассматриваемых пептидов. Удалось получить в высокоочищенном виде три 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 шести остатков цистеина, образующих три дисульфидных мостика (рис. 12). Структурная организация этих полипептидов отлична от таковой классических дефенсинов человека, кролика и крысы (рис. 11). Галлинацины, как были названы секвенированные полипептиды, на основании характера расположения цистеиновых остатков в молекуле следует отнести к группе  $\beta$ -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 $\alpha$  и Gal-1 различаются только по трем 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 $\alpha$  по сравнению с Gal-1 и их опережающую электрофоретическую подвижность по направлению к катоду.

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

В том же году независимо от нас другая группа американских ученых выделила и секвенировала два пептида из гетерофилов кур (СНР-1 и СНР-2), которые практически оказались по структуре идентичны галлинацинам 1 и 1 $\alpha$ , а также три пептида из гетерофилов крови индюшки (ТНР-1, ТНР-2, ТНР-3) (Evans et al., 1994). Различие между структурами Gal-1 и СНР-1 выявлено только по 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 в пределах отдельных фракций была установлена для дефенсинов, выделенных из нейтрофилов разных линий и пород крыс (Eisenhauer et al., 1990).

Новый интерес к исследованиям, связанным с выделением и анализом структурно-функциональных свойств  $\beta$ -дефенсинов, был инициирован обнаружением в плазме крови (Bensch et al., 1995) человека пептида (hBD-1) рассматриваемого семейства (рис. 12). Далее методом RT-PCR было показано, что ген hBD-1 экспрессируется, как минимум, на уровне транскрипции (образования мРНК) во многих органах: слюнные железы, трахея, простата, плацента, тимус, тестикулы, тонкий кишечник (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

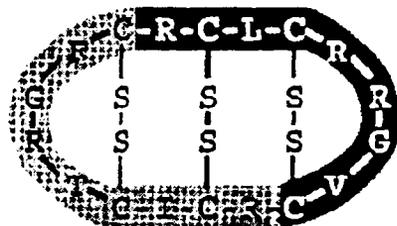
легких (McCray, Bantley, 1997) и гена экспрессируемого в эпителии трахеи человека (hTAP), который ответственен за синтез пептида практически идентичного трахеальному пептиду (TAP) из эпителия крупного рогатого скота (Ko et al., 1997). Кроме того, в кератиноцитах кожи человека выявлена мРНК, ответственная 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  $\beta$ -семейства. Это, по-видимому, свойственно и клеткам эпителия языка и мочепоолового 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).

### 3. 3. 4. $\theta$ -Дефенсины

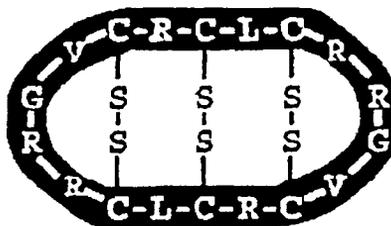
$\theta$ -Дефенсины, в отличие от дефенсинов других типов, относятся к макроциклическим пептидам, циклическая структура которых формируется пептидными, а не дисульфидными как у  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов, связями (Tang et al., 1999b; Tran et al., 2002). Этот тип дефенсинов был впервые выделен из нейтрофилов крови обезьяны *Macaca mulatta* в лаборатории профессора М. Селстеда (Tang et al., 1999b) и нами из клеток костного мозга этого же вида обезьян (Leonova et al., 2001). Первым описанным циклическим дефенсином стал RTD-1 (Rhesus Theta-Defensin), полученный американскими исследователями. RTD-1 представляет собой антимикробный пептид, содержащий три дисульфидных связи, в котором пептидный остов молекулы естественным образом замкнут в макроцикл (кольцо). Авторы показали, что полипептидная цепь RTD-1 (18 аминокислот) транскрибируется с двух различных генов и зрелая молекула  $\theta$ -дефенсина образуется путем белковой рекомбинации (рис. 13). Особенностью антимикробного действия  $\theta$ -дефенсина является способность умерщвлять микроорганизмы при повышенной ионной силе (0.1 M), тогда как  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсины в этих условиях резко снижают свою антибиотическую активность.

Нами в совместном исследовании с лабораторией профессора Р. Лерера из клеток костного мозга обезьян *M. mulatta* были выделены циклические антимикробные пептиды RTD-2 и RTD-3, названные так по аналогии с RTD-1. Показано, что RTD-2 и RTD-3, так же как и RTD-1 состоят из 18 аминокислот и образуются в результате ковалентного соединения пептидными связями двух молекул-предшественниц. Однако в отличие от RTD-1, предшественники которого транслируются с двух различных

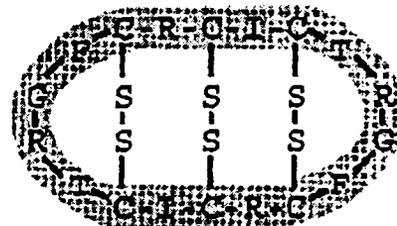
	Сигнальный пептид	Прочая часть	Зрелый пептид
Демидефенсин-1	<u>MRTFALLTGLLLVALHQAQEA</u>	RQARADEAAAQQQPGADDQGMANSFTRPENAALPLSESARGL	<u>HCLEHNGVC</u> QLL
Демидефенсин-2	<u>MRTFALLTGMILLVALHQAQEA</u>	RQARADEAAAQQQPGADDQGMANSFTRPENAALPLSESAKGL	<u>HCICTRGGC</u> RLL



RTD-1



RTD-2



RTD-3

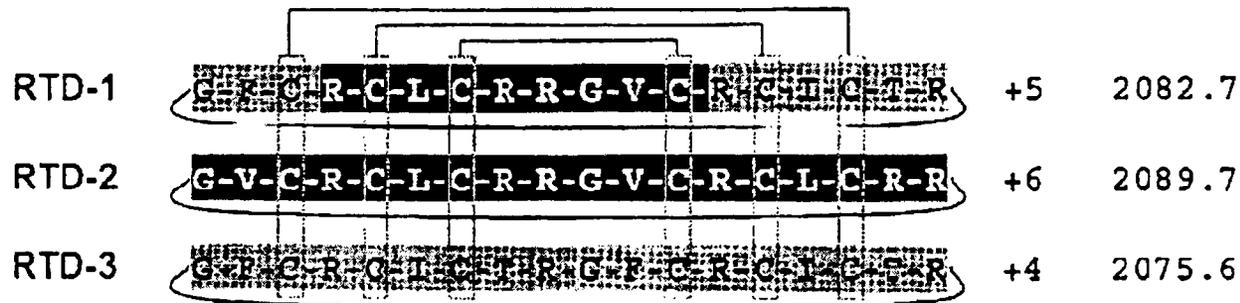


Рис. 13. θ-Дефенсины обезьяны *Macaca mulatta*.

генов (деמידефенсин-1 и демидефенсин-2), RTD-2 и RTD-3 образуются путем объединения двух идентичных нанопептидных фрагментов, кодируемых одним геном — демидефенсином-1 для RTD-2 и демидефенсином-2 для RTD-3 (рис. 13). Таким образом, впервые показано существование неопisanного ранее посттрансляционного механизма формирования разнообразия первичных структур белково-пептидных соединений антимикробной природы, когда в образовании трех молекул антимикробных пептидов (RTD-1, RTD-2, RTD-3) участвуют пептидные производные только двух генов.

Несмотря на структурное разнообразие дефенсинов рассматриваемых подгрупп, все они представляют собой, как правило, одновременно катионные и амфипатические молекулы с пространственно разобщенными гидрофильными положительно заряженными и гидрофобными боковыми группами аминокислотных остатков, благодаря чему они могут проявлять средство как к липофобным, так и липофильным соединениям и средам. Эти структурные особенности всех рассматриваемых групп дефенсинов лежат в основе проявляемой ими антимикробной активности.

### 3. 3. 5. Дефенсины беспозвоночных животных

#### 3. 3. 5. 1. Дефенсины насекомых

Дефенсины насекомых были независимо открыты двумя группами исследователей. Первоначально они были обнаружены в культуральной среде клеток NIH Sape-4, которые представляют собой поддерживаемую *in vitro* линию эмбриональных клеток из серой мясной мухи *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama, Natori, 1988). Эти пептиды в литературе получили название сапедины (saracin). В 1989 г. французские исследователи выделили из гемолимфы личинки падальной мухи *Phormia terranova* два антибактериальных пептида — формицина (phormicin), которые имели частичное структурное сходство с дефенсином NP-1 (MCP-1) из псевдоэозинофилов и альвеолярных макрофагов кролика (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 несколько десятков. 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 aegyptii* (Lowenberger et al., 1995); из отряда жесткокрылых, или жуков (Coleoptera), *Zophobas atrarus* (Bulet et al., 1991), *Tenebrio*

*molitor* (Moon et al., 1994), *Allomyrina dichotoma* (Miyanoshta et al., 1996); из отряда полужесткокрылых (Hemiptera), бескрылого красного клопа *Pyrrhocoris apterus* (Cociancich et al., 1994), зеленого древесного клопа *Palomena prasina* (Chernysh et al., 1996); из отряда перепончатокрылых (Hymenoptera), медоносной пчелы *Apis mellifera* (Fijiwara et al., 1990; Casteels-Josson et al., 1994) и шмеля (Rees et al., 1997); отряда Odonata, стрекоза *Aeschna cyanea* (Bulet et al., 1992).

Первичная структура большинства представителей дефенсинов насекомых характеризуется заметной гомологией на всех участках молекул (рис. 14). Несколько особняком в сравнимом ряду гомологичных пептидов стоит структура дефенсина из стрекозы *Ae. 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 сапещина В из серой мясной мухи *S. peregrina*. Дефенсины насекомых являются катионными (основными) молекулами, состоящими из 38—43 аминокислотных остатков. Исключение из этого правила составляет короткий (34 аминокислоты) сапещин В и длинный роялизин (51 аминокислота), выделенный 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 три 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 три различно организованных домена: гибкий и малоупорядоченный N-концевой, включающий аминокислотные остатки от 1 до 13, центральный (от 14-й до 24-й аминокислоты), представленный амфипатической  $\alpha$ -спиралью, и третий — C-концевой, являющийся  $\beta$ -слоем, сформированным двумя антипараллельными  $\beta$ -тяжами, которые связаны  $\beta$ -изгибом (27—40 аминокислотные остатки) (Vonmatin 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. 14) можно допустить, что для большинства из них характерна подобная надпервичная структура, подтвержденная экспериментально, однако, только в случае сапещинов (Hanzava et al., 1990). Она отлична от вторичной структуры  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов (Pardi et al., 1988), которая представлена тремя антипараллельными  $\beta$ -тяжами. Отличная от  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов

<i>Phormia terranova</i>	Defensin A	-----ATCDLLS---GTGINHSACAAHCL--LRGNRGGYCNG--KGVCVC--RN
	Defensin B	-----ATCDLLS---GTGINHSACAAHCL--LRGNRGGYCNR--KGVCVC--RN
<i>Sarcophaga peregrina</i>	Sapecin A	-----ATCDLLS---GTGINHSACAAHCL--LRGNRGGYCNG--KAVCVC--RN
	Sapecin B	-----LTCE-ID-----RSLCLLHCR-LKGYLRAYCSQ-QK-VCRCVQ
	Sapecin C	-----ATCDLLS---GIGVQHSACALHCV-FRGNRGGYCTG--KGICVC--RN
<i>Calliphora vicina</i>	Defensin	-----ATCDLLS---GTGANHSACAAHCL--LRGNRGGYCNG--KAVCVC--RN
<i>Eristalis tenax</i>	Defensin	-----ATCDLLS---FLNVNHAACAHAHCL-SKGYRGGYCDG--KKVCNC--R
<i>Drosophila melanogaster</i>	Defensin	-----ATCDLLS---KWNWNHTACAGHCI-AKGFKGGYCND--KAVCVC--RN
<i>Aedes aegypti</i>	Defensin A	-----ATCDLLS---GFGVGDSACAAHCI--ARGNRGGYCNS--KVCVC--RN
	Defensin B	-----ATCDLLS---GFGVGDSACAAHCI--ARGNRGGYCNS-QK-VCVC--RN
	Defensin C	-----ATCDLLS---GFGVGDSACAAHCI--ARRNRGGYCNA--KVCVC--RN
<i>Stomoxys calcitrans</i>	SMD1	AAKPMGITCDLLS---LWKVGHAAACAHAHCL-VLGDVGGYCTK--EGLCVC--KE
	SMD2	-----ATCDLLS---MWNVNHSAACAHAHCL--LLGKSGGROND--DAVCVC--RK
<i>Anopheles gambiae</i>	Defensin	-----ATCDLLS---GFGVGSLLCAAHCI--ARRYRGGYCNS--KAVCVC--RN
<i>Limnephilus stigma</i>	Defensin	-----ATCDLLS---GTGVGHSACAAHCL--LRGNRGGYCNG--KAVCVC--RN
<i>Apis mellifera</i>	Defensin	-----VTCDLLS---FKGQVNSACAANCL--SLGKAGGHCE---KGVCIC--RKTsfKDLWDKRF
	Royalisin	-----VTCDLLS---FKGQVNSACAANCL--SLGKAGGHCE---KGVCIC--RKTsfKDLWDKYF
<i>Bombus pascuorum</i>	Defensin	-----VTCDLLS---IKGVAEHSACAANCL--SMGKAGGRCE---NGICLC--RKTTFKELWDKRF
<i>Formica rufa</i>	Defensin	-----FTCDLLS---GAGVDHSACAAHCI--LRGKTGGRCNS--DRVVCV--RA
<i>Zophobas atratus</i>	Defensin A	-----FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAHCL--ALGRRGGYCNS--KVCVC--R
	Defensin B	-----FTCDVLGFEIAGTKLNSAACGAHCL--ALGRTGGYCNS--KVCVC--R
<i>Tenebrio molitor</i>	Tenicin 1	-----VTCDLLSVEAKGVKLNDAACAHAHCL--FRGRSGGYCNG--KVCVC--R
<i>Allomyrina dichotoma</i>	Defensin	-----VTCDLLSFEAKGFAANHSLCAAHCL-AIGRRGGSCER--GVCICRR
<i>Holotrichia diomphalia</i>	Holotricin 1	-----VTCDLLSLQIKGIAINDSACAAHCL--AMRRKGGSCQ---GVCVC--RN
	Holotricin 1A	-----VTCDLLSKQIKGIAINDSACAAHCL--AMRRKGGSCQ---GVCVC--RN
	Holotricin 1B	-----VTCDFLSKQIKGIAINDSACAAHCL--AMRRKGGSCQ---GVCVC--RN
	Holotricin 1C	-----VTCDLLSFEILGVALNHSGCAHCL--AITRRGGACQD---GVCVC--RN
<i>Pyrrhocoris apterus</i>	Defensin	-----ATCDILSFOSQWTFPHAGCALHCV-IKGYKGGQCKI---TVCHC--RR
<i>Palomena prasina</i>	Defensin	-----ATCDALSFSSKWLTVNHSACAIHCL--TKGYKGGKCVN---TICNC--RN
<i>Podixus maculiventris</i>	Defensin 1	-----ATCDALSFSSKWLTVNHSACAIHCL--TKGYKGGRCMN---TICNC--RN
	Defensin 2	-----ATCDALSFSSKWLTVNHSACAIHCL--TKGYKGGKCVN---TICLC--RR
<i>Notonectes glauca</i>	Defensin	-----ATCDLLSFSTPWFNTANDAACAHAHCL--VKGYKGGKCRN---GICHIC--RN
<i>Chrysopa perla</i>	Defensin	-----VTCDLMSVSTPIGSINHAACAHAHCL--LMGGRRRCYY---NNVCVIRR
<i>Aeschna cyanea</i>	Defensin	-----GFGCPLD--Q-----MQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR
<i>Leiurus quinquestriatus</i>	Defensin	-----GFGCPLN--Q-----GACHRHCRSIR--RRGGYCAAGFFKQTCTCYR
<i>Androctonus australis</i>	Defensin	-----GFGCPLN--Q-----GACHRHCRSIR--RRGGYCAAGFFKQTCTCYR
<i>Myltilus edulis</i>	Defensin 1	-----GFGCPND-----YPCRHRCKSI PGRXGGYCGGRHRLRCTCYR
	Defensin 2	-----GFGCPND-----YPCRHRCKSI PGRXGGYCGGRHRLRCTCYR
<i>Mystilus galloprovincialis</i>	Defensin	-----GFGCPNN-----YQCHRHRCKSI PGRGGYCGGXHRLRCTCYR

аранжировка дисульфидных связей дефенсинов насекомых, наряду с особенностями их первичной и вторичной структур, определяет различия третичных структур рассматриваемых пептидов (рис. 15). 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 сапелина В (дефенсина из гемолимфы мясной мухи *S. peregrina*) способности ингибировать  $K^+$ -каналы в клетках Пуркиньи из мозжечка крысы (Lee et al., 1995).

Различия в структурах дефенсинов насекомых, с одной стороны, и  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов — с другой, ответственны, по-видимому, за особенности их антимикробной активности. Так, если дефенсины млекопитающих и птиц являются универсальными антибиотическими пептидами, в микромолярных концентрациях 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 концентрации на 1—2 порядка большие 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 (secropins) (Steiner et al., 1981; Voman, 1995), апидацины (Casteels et al., 1989), дрозоцин (Bulet et al., 1993), металъниковины (Chernysh et al., 1996), которые эффективно инактивируют грамотрицательные бактерии, и дрозомицин, направлено воздействующий 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  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсины, синтезируются в препроформе.

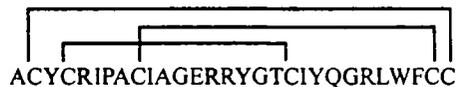
Изучение механизмов антимикробного действия дефенсинов насекомых (Sociancich et al., 1993a, 1993b) выявило в принципе все те же закономерности проявления их активности, которые были установлены для  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов (Lehrer et al., 1993; Selsted, 1995). Основной мишенью их поражающего действия на бактерии является цитоплазматическая мембрана. Перфорируя плазмалемму бактерий, дефенсины насекомых нарушают структурную целостность клетки, ее ионный гомеостаз, вызывают частичную деполаризацию мембранного потенциала и уменьшение

---

Рис. 14. Первичные структуры дефенсинов беспозвоночных.

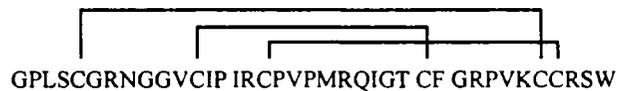
$\alpha$ -Дефенсин (1-6, 2-4, 3-5)

HNP-1



$\beta$ -Дефенсин (1-5, 2-4, 3-6)

BNBD-12



Дефенсин насекомых (1-4, 2-5, 3-6)

Формицин А



$\alpha$ -Дефенсин



$\beta$ -Дефенсин



Дефенсин насекомых



Дефенсин растений

Рис. 15. Структуры дефенсинов разных типов.

концентрации цитоплазматической 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 меньшей 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.

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, сапелин и др.). Синтез дефенсинов, как и большинства других антибиотических пептидов, носит у насекомых преимущественно индуцибельный характер (Hoffmann, Hetru, 1992; Hoffmann, Reichhart, 1997; Hoffmann, 2003). 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 этого процесса с биосинтезом и продукцией  $\beta$ -дефенсинов эпителием трахеи крупного рогатого скота (Diamond et al., 1993, 1996). Более того, существует удивительное сходство ряда молекулярно-генетических процессов в эпителиях у насекомых и млекопитающих, выражающееся в вовлечении в индуктивный синтез пептидов генетических структур и, в частности, сайтов, избирательно связывающих гомологичные транскрипционные факторы NF $\kappa$ B у млекопитающих и Dorsal, DIF и Relish у насекомых, которые ответственны за экспрессию генов антибиотических пептидов у столь эволюционно удаленных видов животных. Необходимо, однако, отметить, что, если для насекомых подобный индуцибельный характер биосинтеза антибиотических пептидов является доминирующим, то у млекопитающих феномен индуцибельного синтеза  $\beta$ -дефенсинов в эпителии трахеи и кератиноцитах кожи человека (Harder et al., 1997) сосуществует с конститутивным. Для высших животных свойственен 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 преформированной форме 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  $\kappa$ B-мотивов, поскольку впервые были обнаружены в структуре генов, ответственных за синтез  $\kappa$ -цепи иммуноглобулинов млекопитающих (Nolan, Baltimore, 1992; Baldwin, 1996).  $\kappa$ B-мотив является элементом гена, с которым избирательно связывается регуляторный транскрипционный фактор NF $\kappa$ B, который обычно находится в цитоплазме в связанном с ингибитором (IkB) состоянии. Воздействия на организм, запускающие иммунный ответ или воспалительный процесс, приводят к распаду функционально неактивного комплекса NF $\kappa$ B/IkB, освобождению NF $\kappa$ B и его транслокации в ядро, где он взаимодействует с соответствующей промоторной областью генов острофазовых белков и иммуноглобулинов, активируя транскрипционный процесс. Для дефенсинов подобный механизм регуляции активности их генов описан для генов дефенсинов эпителия трахеи крупного рогатого скота и кератиноцитов кожи мыши и человека, в то время как для биосинтеза миелоидных и энтеральных дефенсинов млекопитающих свойственны другие пути регуляции экспрессии генов.

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 микроорганизмы и вещества, инициирующие иммунный ответ. Активация этих 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 (пре-), прочасти и конечного зрелого пептида.

Проксимальная (5'-концевая) область этих генов содержит несколько последовательностей, имеющих структурную гомо-

логию с цис-регуляторными элементами промоторов генов, ответственных за синтез острофазовых белков у млекопитающих (Hoffmann et al., 1993; Hultmark, 1993; Georgel et al., 1993). Чаще всего в таких структурах идентифицируется κВ-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 ответ к ИЛ-6 и γ-интерферону. Из клеток *Hyalophora cecropia* были выделены белки, относящиеся к Rel/NF-κВ семейству, которые избирательно связываются с соответствующей областью промотора при инициации иммунного ответа у насекомых. Это, в частности, так называемый фактор, ответственный за иммунный ответ у цекропии (Cecropia immunoresponsiveness factor — Cif) (Sun, Faye, 1992). У дрозофилы он носит название Dif (dorsal-related immunity factor) и связывается специфически с промоторами генов, ответственных за синтез антибиотических пептидов (Reichhart et al., 1993; Ip 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, 2003).

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

### 3. 3. 5. 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 представляет интерес с позиции сравнительной биохимии оценка структурной гомологии антибиотических пептидов из гемолимфы скорпионов дефенсинам эволюционно близких им насекомых. В настоящее время выделены и секвенированы дефенсины из гемолимфы двух видов скорпионов: *Leiurus quinquestriatus*

Дефенсин стрекозы (отряд Odonata)

*Aeschna cyanea* GFGCPLDQMQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR

Дефенсины скорпионов

*Androctonus australis* GFGCPFNQGACHRHCRSIRRR-GGYCAGLFFKQTCTCYR

*Leiurus quinquestriatus* GFGCPLNQGACHRHCRSIRRR-GGYCAGFFKQTCTCYRN

Дефенсин А моллюска

*Mytilus edulis* GFGCP-NDYPCRHCKSIPGRXGGYCGGXHRLRCTCYR

Рис. 16. Сравнение первичной структуры дефенсинов, относящихся к классу насекомых (стрекоза), классу паукообразных (скорпионы) и типу моллюсков — класс пластинчатожабрных или двустворчатых (мидия).

(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 рода насекомых (рис. 16).

### 3. 3. 5. 3. Дефенсины мечехвостов

Мечехвосты относятся к подклассу Xiphosura (мечехвосты), класса меростомовых (Merostomata), подтипа хелицеровые (Chelicerata), входящего в тип членистоногих (Arthropoda). Это одна из древнейших, сохранившаяся до наших дней, группа членистоногих животных, а потому естественно представляет интерес факт обнаружения в гемоцитах японского подковообразного краба (*Tachypleus tridentatus*) пептидов подобных дефенсинам. (Saito et al., 1995):

<sup>1</sup>NPLIPAIYIGATVGPVSWAYLVVALVGAAAVTAANIRRASS<sup>40</sup>,  
<sup>41</sup>DNHSCAGNRGWCRSKCFRHEYVDTYYSAVCGRYFCCRSR<sup>79</sup>.

Этот пептид получил название «большой дефенсин», так как он состоит из 79 аминокислотных остатков, 37 из которых в С-концевой области имеют сходство по последовательности и наличию 3 дисульфидных мостиков с дефенсином RatNP2 из нейтрофилов крысы (Eisenhauer et al., 1989). Молекула пептида состоит из двух больших функциональных блоков: N-концевого слабоосновного гидрофобного из 42 аминокислот и С-концевого, имеющего черты структурного сходства с миелоидным дефенсином крысы (RatNP2) по первичной структуре, а по аранжировке дисульфидных мостиков, аналогичным β-дефенсинам из нейтрофилов коров. Таким образом, рассматриваемый дефенсин по сво-

им структурно-функциональным свойствам полностью выпадает из круга семейства дефенсинов насекомых, характерных, как для ряда видов насекомых, так и скорпионов.

### 3. 3. 5. 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 два 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 пластинчатожаберных, или двустворчатых моллюсков (*Lamellibranchiata*, или *Bivalvia*). Среди нескольких групп пептидов были охарактеризованы и представители дефенсинов (Charlet et al., 1996). По своей первичной структуре они оказались молекулами максимально гомологичными дефенсинам стрекозы *Ae. cyanea* (Bulet et al., 1992) и двух видов скорпионов *Leiurus quinquestratis* (Cociancich et al., 1993) и *Androctonus australis* (Ehredt-Sabatier et al., 1996) (рис. 16).

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, которые индуктивно повышают продукцию дефенсинов в организме насекомых. В связи с этим фактором представляет интерес выяснение различий в молекулярно-генетических основах биосинтеза дефенсинов у насекомых, с одной стороны, и скорпионов и моллюсков — с другой.

### 3. 3. 5. 5. Антибиотические пептиды из целомоцитов пескожила

Эволюционная систематизация и оценка структурной гомологии антимикробных пептидов различных видов животных пока не представляется возможной, поскольку сведения по дан-

ному вопросу носят фрагментарный характер, а представители многих таксонов животных до настоящего времени остаются за рамками исследований. В частности, совершенно неохваченным в этом отношении являлся ключевой в эволюционном плане тип кольчатые черви (Annelida). По современным представлениям, от древних кольчатых червей произошли два крупных типа животных: членистоногие и моллюски. Эти таксоны достигли биологического прогресса несмотря на отсутствие у них механизмов приобретенного иммунитета. Поэтому представляло интерес выявление антимикробных пептидов дефенсиновой природы в целомоцитах морского кольчатого червя — пескожила *Arenicola marina*, обитающего в прибрежных водах Белого моря и принадлежащего к семейству Arenicolidae, отряду Drilomorpha, классу Polychaeta, типу Annelida.

В совместном исследовании с сотрудниками Учебно-научного центра Института биорганической химии РАН им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова была изучена структура и функциональные свойства антимикробных пептидов, которые получили название ареницинов (Краснодембская и др., 2001; Ovchinnikova et al., 2004). Установленная полная аминокислотная последовательность двух пептидов свидетельствует о том, что они не принадлежат к семейству дефенсинов. Хотя, как и дефенсины, они и являются основными, но содержат только одну внутримолекулярную дисульфидную связь, замыкающую молекулу в циклическую структуру:

Ареницин-1: RWCYAYVVRIRGVLVRYRRCW,  
Ареницин-2: RWCYAYVVRVIRGVLVRYRRCW.

Анализ баз данных по аминокислотным последовательностям пептидов и белков показал, что приведенные выше структуры не имеют гомологии с какими-либо ранее известными, что позволяет нам говорить об открытии нового семейства пептидных антибиотиков.

В литературе описано несколько пептидов, содержащих одну дисульфидную связь (Кокряков, 1999). В основном это пептиды, выделенные из кожи лягушек, например, бревенины, эскулетины, пипинины. Имеется гомологичный им пептид, выделенный из гемолимфы насекомого, — танатин, однако между ними и выделенными нами ареницинами имеется существенное различие в положении цистеинов, образующих дисульфидную связь. У пептидов лягушек дисульфидная связь локализована на C-конце молекулы, и пространственная структура представлена в виде замкнутого кольца и длинного N-терминального хвоста. По кольцевой структуре пептиды из целомоцитов пескожила ближе всего к циклическому додекапептиду из нейтрофилов быка (небольшой замкнутой в кольцо молекуле семейства кателицидинов

с сильными антимикробными свойствами, состоящей всего из 12 аминокислот), но по остальным характеристикам (молекулярная масса, аминокислотный состав) они сильно отличаются.

Низкая молекулярная масса ареницинов в сочетании с широким спектром антимикробного действия и эффективностью повреждающего воздействия на клетки микроорганизмов, в том числе грибов, делают эти молекулы перспективными объектами для дальнейшего химического синтеза и применения в медицине и ветеринарии.

### 3. 3. 6. Кателицидины

Другой распространенной группой антимикробных пептидов фагоцитов и эпителиальных клеток являются кателицидины. В рассматриваемую группу пептидных соединений входят антимикробные пептиды, различающиеся по первичной структуре активных молекул, но имеющие схожие прочасти их молекул-предшественниц, представляющие собой белки, гомологичные ингибитору катепсина L (кателин) из лейкоцитов свиньи (Zanetti et al., 1995). К этой группе относятся открытые нами протегрины свиньи (Kokryakov et al., 1993), бактенецины (Bac5 и Bac7) нейтрофилов крупного рогатого скота (Frank et al., 1990), козы и овцы (Shamova et al., 1999), пептид LL-37 лейкоцитов человека (Agerberth et al., 1995), RL-37 лейкоцитов обезьяны *Macaca mulatta* (Zhao et al., 2001) и др. (рис. 17). Несмотря на разнообразие первичных структур зрелых молекул, все они являются положительно заряженными молекулами, что обеспечивает их тропность к мембранам микроорганизмов.

Протегрины являются антимикробными пептидами, в значительной степени определяющими защитную направленность фагоцитарного процесса у свиней. Обладая широким спектром антимикробного действия против грамположительных и грамотрицательных бактерий, низших грибов и оболочечных вирусов, они обеспечивают эффективность киллерной стадии фагоцитарного процесса (Kokryakov et al., 1993).

Антимикробные полипептиды лейкоцитов свиньи были разделены на 3 индивидуальных компонента высокоэффективной жидкостной хроматографией на колонке Vydac C18. 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 оказались в 1.5—2 раза меньше таковых дефенсинов и близки к молекулярной массе (~2 кДа) антимикробного полипептида из гемоцитов подковообразного краба — тахиплезина (Nakamura et al., 1988).

Первичная структура полипептидов, названных по предложению Р. Лерера протегринами (protegrins: от лат. *protegere* — защищать, прикрывать), была установлена нами совместно с американскими исследователями из Калифорнийского университета Лос-Анджелеса методом автоматической деградации белков по Эдману на установке Porton Model 2090 (рис. 17). Очевидна принадлежность трех 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 положении 14 содержит изолейцин вместо валина. Четыре остатка цистеина образуют два дисульфидных мостика, поскольку свободные SH-группы не определяются в пептидах реагентом Эллмана.

Структура протегринов характеризуется наличием одного блока из 3 остатков аргинина, а также 2 дисульфидными связями, формирующими классическую структуру типа антипараллельной  $\beta$ -шпильки (двухтяжевый антипараллельный  $\beta$ -слой). Эта структура была подтверждена ЯМР-спектроскопическим исследованием растворов пептида PG-1 (Fagner et al., 1996). Тяжи в  $\beta$ -слое соединены  $\beta$ -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 ( $G_4LCICRRRFC_{13}$ ) и кроличьим дефенсином NP-3a ( $G_1ICACRRRFC_{10}$ ), 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 в микромолярных концентрациях проявляют активность в отношении широкого спектра микроорганизмов: *Listeria monocytogenes*, *E. 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). Благодаря меньшей молекулярной массе протегрины являются более перспективным объектом для химического синтеза и фармакологических исследований, чем дефенсины.

PMAP-37 (C)	QALSREAVLRAVDRLNEQSSSEANLYRLELDQPPKAEDDPGTPKPVSF <sup>Ч</sup> TVKETVCPRPTWRPPELCDFKENG <sup>К</sup> RVKQCVGTVTL <sup>С</sup> DQIKDPLDITCNEIQSV
PG-1 (C)	-----RQ-----V-G-
PG-2 (C)	-----RQ-----V-G-
PG-3 (C)	-----RQ-----V-G-
PMAP-23 (C)	-----RQ-----KE-RGNF-----QL--
PMAP-36 (C)	-----NPSN-----N-D-
C12 (C)	-----R-----G-
PR-39 (C)	-----RQ-----NPSIHS--S-
FALL-39/hCAP18 (Ч)	-V--K-----I-GI-QR--D-----D--PR-TM-G--D-----T-QQS--D--KD-L--R-M-----N-ARGSF--S-DKDNKR
Индолицидин (К)	-----Q--L-----P--DN--L--R-----TIQQ-A-Q-----K-----PSN-QF-LN--L--
Vac7 (К)	-----I--R-----P--DV--R-AR--T-----TSPQ--Q-----L-----I-----SD-LF-LN--L--
Vac5 (К)	-----QF--R-----PT-ND-L--R--D-----TSQQ-L-Q-----L-----PSN-QF--N--L--
Додекапептид (К)	-----Q-----P-I-----QD--DS--R--R-----S-T-QQ--Q-----LL-R-E-----VRGNF--NH--I
CAP18 (Кр)	-D-T-----AF-Q-----SM-PQQL- <sup>К</sup> AK-Y-Q-----E--T--KL--Q-----D-L-R-----RY-AW-SF--R--RA-ES
P15 (Кр)	IPHRR-R-E-V-AQ-LQFY--GQQQP-F---ATP--SLNSKS--RI-LN-RI---IFTLD-Q-GN-A-R-G-EERI-R-AFVRRRRVRA-TLR-DRD-RR
Кателин (C)	E-R-----RQ-----NFSIHS--S-
PMAP-37 (C)	GLLSRLRDFLSDRGRRLEGEKIERIQKIKDLSEFFQS
PG-1 (C)	RGGRLCY <sup>К</sup> RRRF <sup>С</sup> VCVGR
PG-2 (C)	RGGRLCY <sup>К</sup> RRRF <sup>С</sup> VCV
PG-3 (C)	RGGRLCY <sup>К</sup> RRRF <sup>С</sup> VCVGR
PMAP-23 (C)	RIIDL <sup>Л</sup> LRVRRPQKPKFVTWVR
PMAP-36 (C)	GRFRRLAKKTRKRLKIGKVL <sup>К</sup> RWIPPIVGSIP <sup>Л</sup> GC
C12 (C)	AFPPN <sup>В</sup> VGPR FPPN <sup>Ф</sup> FGPR FPPN <sup>Ф</sup> FGPR FPPN <sup>Ф</sup> FGPR FPPN <sup>Ф</sup> FGPR FPPN <sup>Ф</sup> FGPP FPPPI <sup>Ф</sup> FGPW FPPPP <sup>Ф</sup> FRPP PFGPP <sup>Ф</sup> RF
PR-39 (C)	RRRPR <sup>П</sup> YLPRPRPP <sup>Ф</sup> PP <sup>Ф</sup> PR <sup>Л</sup> PPRI <sup>Ф</sup> PPG <sup>Ф</sup> PP <sup>Ф</sup> RF
FALL-39/hCAP18 (Ч)	FALLGDFFRK <sup>С</sup> KEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLV <sup>Р</sup> PTES
Индолицидин (К)	ILPW <sup>К</sup> W <sup>В</sup> W <sup>В</sup> WRR
Vac7 (К)	RRIPR <sup>П</sup> PR <sup>Л</sup> PRPR <sup>Л</sup> PFPR <sup>Р</sup> GRPI <sup>Р</sup> PR <sup>Л</sup> PFPR <sup>Р</sup> GRPI <sup>Р</sup> PR <sup>Л</sup> PFPR <sup>Р</sup> GRPI <sup>Р</sup>
Vac5 (К)	RFR <sup>П</sup> PIR <sup>П</sup> PIR <sup>П</sup> PP <sup>Ф</sup> Y <sup>П</sup> PF <sup>Р</sup> PIR <sup>П</sup> PIR <sup>П</sup> PP <sup>Ф</sup> Y <sup>П</sup> PF <sup>Р</sup> PIR <sup>П</sup> PP <sup>Ф</sup> Y <sup>П</sup> PF <sup>Р</sup>
Додекапептид (К)	RITKQ <sup>К</sup> KAP <sup>А</sup> QAARLCRI <sup>В</sup> VIP <sup>С</sup> CR
CAP18 (Кр)	KEPTGLR <sup>К</sup> RLR <sup>К</sup> KFR <sup>Н</sup> KIK <sup>К</sup> ELK <sup>К</sup> IGQ <sup>К</sup> IG <sup>Ф</sup> VP <sup>К</sup> LAP <sup>Р</sup> TDY
P15 (Кр)	QPEFRVTRPAGPTA

Рис. 17. Первичная структура кателицидинов (по: Zanetti et al., 1995, с изменениями).

*Курсивом* отмечены последовательности зрелых антибиотических пептидов, *прямыми буквами* – про-части молекул-предшественников антибиотических пептидов, имеющие высокую степень гомологии с ингибитором катепсина L свиньи (кателином). В *скобках* указано видовое происхождение белков (С – свинья, К – корова, Ч – человек, Кр – кролик).

PG-1 RGGRLCYCRRRFCVVCVGR\*  
 PG-2 RGGRLCYCRRRFCICV\*  
 PG-3 RGGGLCYCRRRFCVVCVGR\*  
 PG-4 RGGRLCYCRGWICFCVGR\*  
 PG-5 RGGRLCYCRPRFCVVCVGR\*  
  
 T-I K-WC--FRVC-YRGICYRRCR\*  
 T-II R-WC--FRVC-YRGICYRKCR\*  
 T-III K-WC--FRVC-YRGICYRKCR\*  
 P-I RRWC--FRVC-YRGFCYRKCR\*  
 P-II RRWC--FRVC-YKGFICYRKCR\*  
 A RSVCRQIKICRRRGGCYKCTNRPY

Рис. 18. Первичная структура протегринов (PG), тахиплезинов (Т), полифемузинов (Р) и андроктонина (А) из гемолимфы скорпиона.

*Звездочкой (\*) обозначены амидированные С-концевые аминокислоты.*

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). Это представители 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 два внутримолекулярных дисульфидных мостика, и большинства сходных аминокислотных остатков у сравниваемых пептидов (протегрины, тахиплезины, полифемузины) различно (рис. 18). В то же самое время аранжировка их S-S-связей и общая третичная структура (классическая  $\beta$ -шпилька, образованная двумя антипараллельными  $\beta$ -тяжами) у них практически идентичны (Tamamura et al., 1993; Farner et al., 1996). Пептид более гомологичный по первичной структуре тахиплезину был выделен и секвенирован из гемолимфы скорпиона, *Androctomis australis* (Ehret-Sabatier et al., 1996) (рис. 18).

Общность ряда структурных и функциональных свойств дефензинов 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, 1993; 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.

Кателицидиновые гены включают в себя 4 экзона, которые участвуют в кодировании «кателинового домена» белков этого семейства. Четвертый экзон ответственен и за структуру антимикробного пептида в составе молекулы-предшественницы. Первоначально кателицидины были выявлены только у млекопитающих (Zanetti et al., 1995). В настоящее время они детектированы у низших позвоночных, а именно у миксин, являющихся представителями класса круглоротых (Shinnar et al., 1996; Basanez et al., 2002).

У человека обнаружен пока только один кателицидин, известный как белок hCAP18 (Agerberth et al., 1995; Gudmundsson et al., 1996) или LL-37 пептид (Bals et al., 1998), выявленный как в нейтрофилах (Cowland et al., 1995), так и в ряде эпителиальных клеток (Frohm et al., 1997). По своей вторичной структуре рассматриваемый пептид относится к группе  $\alpha$ -спиральных амфипатических пептидов.

### **3. 3. 7. Механизмы антимикробного действия антибиотических пептидов**

Большинство пептидов, обладающих микробоцидной активностью (дефенсины, протегрины, цекропины, магейнины, пептид LL-37, бактенецины и др.), рассматриваются как мембраноактивные агенты, хотя имеются данные, свидетельствующие о том, что не только мембранные структуры, но и внутриклеточные компоненты могут быть мишенями для антимикробных пептидов.

Конечным результатом микробоцидного действия рассматриваемых пептидов является деполяризация мембран, нарушение их целостности, ведущее к утечке ионов из клетки и нарушению процессов жизнедеятельности микроорганизмов, приводящее к их гибели.

Изучению взаимодействия антибиотических пептидов с мембранами прокариотических и эукариотических клеток, а также модельными мембранами в настоящее время посвящено много работ, но механизм их антимикробного действия пока до конца не понят. Рассмотрим наиболее общепринятые в настоящее время концепции механизмов антимикробного действия антибиотических пептидов как мембранотропных агентов.

Большинство антимикробных пептидов имеют амфипатическую (амфифильную) структуру с поверхностно-разобщенными гидрофобными и положительно заряженными боковыми группами аминокислотных остатков. Подобная организация третичной структуры антимикробных пептидов а priori предполагает возможность их взаимодействия как с отрицательно заряженными молекулами (кислые фосфолипиды мембран, липополисахариды, тейхоевые кислоты, кислые гликозаминогликаны, гепарин, нуклеиновые кислоты, кислые белки (серпины, например), так и липофильными молекулами (алифатические хвосты жирных кислот в составе мембран, липид А липополисахарида). Следует подчеркнуть, что основные компоненты микробных стенок пептидогликаны и липополисахариды являются отрицательно заряженными молекулами, поэтому взаимодействие с ними играет важную роль в связывании (сорбции) антимикробных пептидов к клеткам-мишеням. Летальный же эффект антибиотических пептидов, скорее всего, связан с их способностью нарушать структурную целостность цитоплазматически мембран микробных клеток, что установлено морфологически (Yamanchi et al., 1993; Matsuzaki et al., 1997). D-энантиомеры  $\alpha$ -спиральных антимикробных пептидов обладают, как правило, антимикробной активностью идентичной природным L-пептидам (Wade et al., 1990), что свидетельствует об отсутствии стереоспецифичности в их взаимодействии с компонентами микробных оболочек.

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., 1988). Положительный заряд молекул дефенсинов определяет их высокое сродство к отрицательно заряженным компонентам (тейхоевые кислоты, липополисахариды, фосфолипиды) клеточной оболочки микроорганизмов. Благодаря электростатическому

взаимодействию происходит сорбция 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 0.1. 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).

Лерер с соавт. (Lehrer et al., 1989) продемонстрировали способность дефенсинов увеличивать проницаемость (пермеализовать) наружной и цитоплазматической мембран *Escherichia coli* для ионов и ряда других низкомолекулярных веществ цитоплазмы. Это потенциалзависимый процесс, так как HNP-3 поражает только метаболически активные клетки и практически не воздействует на деполаризованные 2,4-динитрофенолом мембраны. Однако более основные дефенсины кролика NP-1 и NP-2 воздействуют на микробы независимо от мембранного потенциала клеток-мишеней. Эти данные совпадают с результатами исследований по воздействию дефенсинов на искусственные липидные бислои (мембраны), в которых был продемонстрирован потенциалзависимый характер пермеализации этих структур (Kagan et al., 1990).

Обычно в водных растворах и при взаимодействии с мембранами дефенсины лейкоцитов человека образуют димеры, которые непосредственно атакуют клетки-мишени. Дефенсиновый димер по форме напоминает корзину с аполлярным основанием и полярной вершиной, образуемой двумя N-концевыми и двумя C-концевыми аминокислотными остатками. Это возможно вследствие циклической структуры дефенсиновых мономеров, формируемых дисульфидной связью между первым (1) и последним (6) цистеиновыми остатками молекулы. Амфипатичный димер дефенсина HNP-3 обладает способностью как к сорбции на поверхности мембран за счет электростатических взаимодействий с отрицательно заряженными фосфатными группами фосфолипидов, так и к внедрению в двойной липидный слой за счет гидрофобных взаимодействий липофильной части пептидного ассоциата с алкильными (алифатическими, углеводородными) хвостами жирных кислот (Hill et al., 1991).

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 вне-

дрение 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., 1988). Активно метаболизирующие бактерии и грибы являются лучшей мишенью поражающего действия дефенсинов по сравнению с клетками, находящимися в стационарной фазе роста культуры или в условиях анаэробнозиса. 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  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , фосфорсодержащих соединений, аминокислот, нуклеотидов, коферментов), деполяризацию (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 их разрыву. Результирующей всех этих структурно-метаболических изменений 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; Yeaman, Yount, 2003) и синтетическим (Афиногенов, Панарин, 1993) положительно заряженным полимерам, несмотря на наличие у последних ряда специфических структурных свойств.

Модификации нативных структур (матриц) антимикробных пептидов позволяют понять особенности механизмов их цито-

токсического действия. Увеличение числа положительных зарядов в молекулах химически синтезированных пептидов усиливает их бактерицидную активность, снижает — гемолитическую. Подобный подход оправдал себя в функциональном анализе производных магейнина 2 (Matsuzaki et al., 1997), лактоферрицина В (Hang et al., 1996) и индолицидина (Falla et al., 1996). Увеличение в составе пептидов аминокислотных остатков с гидрофобными боковыми группами приводит к усилению как гемолитической, так и бактерицидной активности этих соединений (Matsuzaki et al., 1997). Кроме того, Матсузаки с соавт. (Matsuzaki et al., 1995) продемонстрировали зависимость избирательности взаимодействия магейнина 2 с бактериальными мембранами по сравнению с мембранами млекопитающих от состава липидов мембран-мишеней. Содержание в первых кислых липидов (фосфатидилглицерин, кардиолицин, фосфатидилсерин) существенно выше, чем во вторых. В частности, магейнин 2 освобождал более эффективно калцеин из липосом, образованных фосфатидилглицерином, в то время как меллитин — классический гемолитический пептид — более активен (более чем в 100 раз по сравнению с магейнином) в отношении липосом, составленных из цвиттерионного фосфатидилхолина. Освобождение из липосом такого большого зонда как калцеин свидетельствует об образовании в них под воздействием анализируемых пептидов значительных по размерам пор. Образование таких пор предполагает трансмембранную локализацию антимикробных пептидов.

Для подавляющего большинства антимикробных пептидов в процесс связывания их с мембранами не вовлечены рецепторные механизмы. В пользу такого заключения свидетельствует факт, что синтетические пептиды, построенные из D-аминокислот, так же эффективно связываются с бактериальными мембранами и проявляют свое микробицидное действие, как и их природные стереоизомеры, состоящие из L-аминокислот (Wade et al., 1990).

Связывание антимикробных пептидов с мембранами происходит, главным образом, за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных пептидов с кислыми компонентами мембран. Эффективность этого связывания зависит от состава мембран и обуславливает избирательное действие большинства антимикробных пептидов по отношению к бактериальным клеткам, но не к эукариотическим, отличающимся по липидному составу мембран. В состав мембран эукариотических клеток входят в основном нейтральные цвиттерионные фосфолипиды, такие как фосфатидилхолин, сфингомиелин, тогда как бактериальные мембраны содержат большое количество кислых фосфолипидов — фосфатидилглицерина, кардиолипина. Кроме того, наружная мембрана грамотрицательных бактерий состоит из анионного липополисахарида, поверхность грамположи-

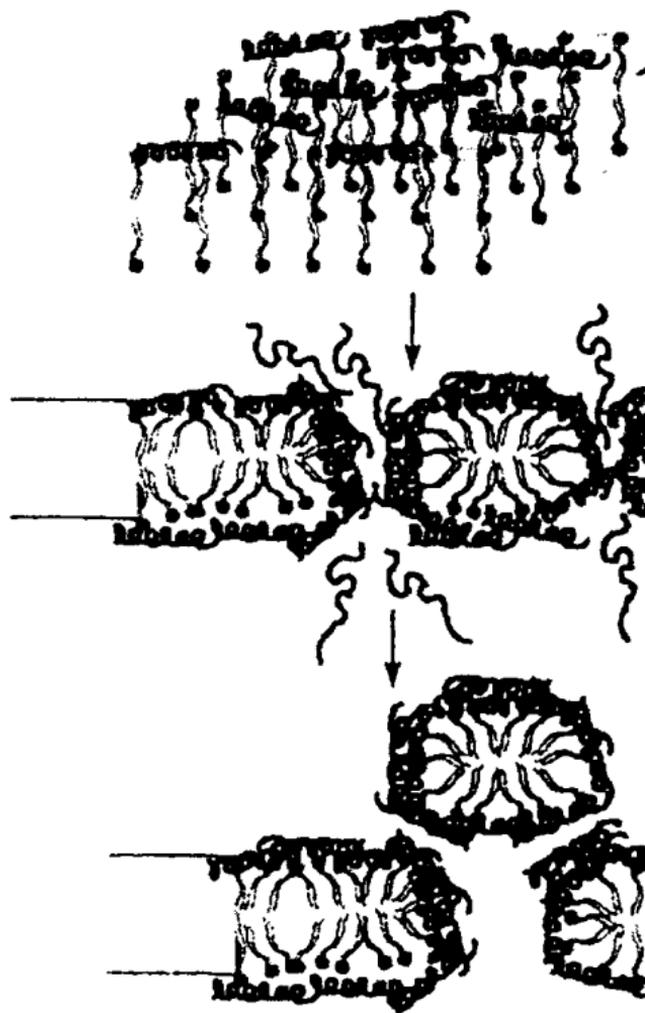
тельных бактерий включает другие отрицательно заряженные компоненты — липотейхоевые кислоты. Таким образом, отрицательный заряд поверхности бактериальных клеток значительно выше, чем эукариотических, что и определяет значительно более эффективное связывание катионных антимикробных пептидов с анионными мембранами бактерий. Следующей за стадией связывания антимикробных пептидов с клеткой-мишенью следует их встраивание в мембрану, приводящее к образованию поры, через которую происходит утечка ионов и других компонентов клетки, или формированию ионного канала, или другим нарушениям мембранных структур. Пока механизм этого встраивания антимикробных пептидов в клеточные мембраны полностью не выяснен, но в экспериментах на модельных мембранах получены данные, позволяющие разработать несколько возможных моделей взаимодействия пептидов с мембранами (White et al., 1995). Наиболее распространенными в настоящее время являются две модели взаимодействия пептидов с мембранами — модель «ковра» («carpet» mechanism) и модель «сборки бочки» («barrel-stave» mechanism) (Shai, 1999) (рис. 19).

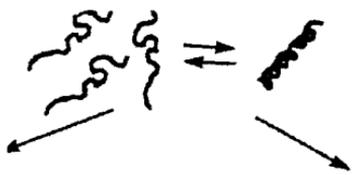
Модель «сборки бочки» предложена для дефенсинов и протегринов, формирующих трансмембранные каналы. Процесс образования такой «бочки» происходит следующим образом: пептиды в форме мономеров связываются с мембраной, при увеличении концентрации связанных с мембраной мономеров, они начинают взаимодействовать друг с другом, образуют димеры, тримеры и т. д., и далее встраиваются в мембрану, формируя пору так, что гидрофобные поверхности пептидов взаимодействуют с липидным кором мембраны, в то время как гидрофильные участки обращаются к внутренней поверхности «бочки», образуя пору для гидрофильных соединений. При нарастании концентрации пептида, все новые мономерные молекулы принимают участие в образовании поры, увеличивая ее размер. Необходимо отметить, что в данном процессе критическим моментом является агрегация мономерных пептидных молекул на поверхности мембраны, в процессе которой они ориентируются гидрофильными участками друг к другу, что предшествует встраиванию их в мембрану. Встраивание в мембрану одиночной амфипатической молекулы энергетически невыгодно, так как ее полярные участки должны бы были приходиться в соприкосновение с гидрофобными цепями жирных кислот липидов мембраны. Таким образом, в данной модели перфорации мембран клеток-мишеней ключевую роль играют гидрофобные взаимодействия и в меньшей степени величина положительного заряда пептидов.

---

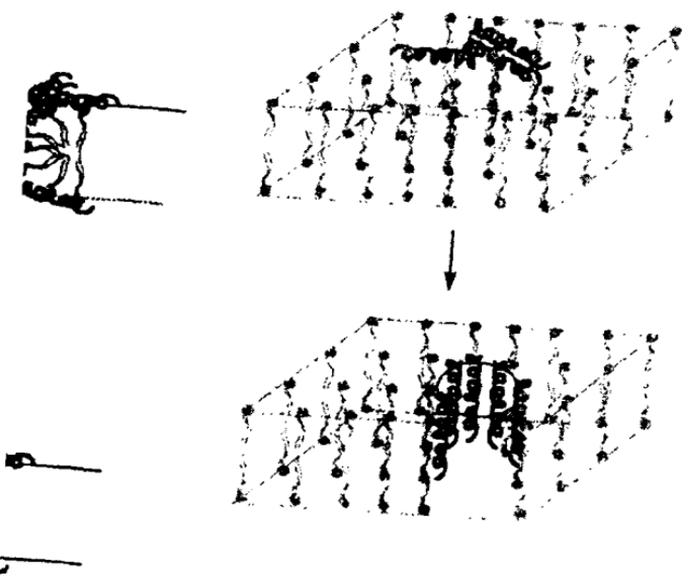
Рис. 19. Механизмы действия антимикробных пептидов на мембраны бактерий (по: Shai, 1999).

Механизм «ковра»





Механизм «сборки бочки»



Другая модель — ковровый механизм нарушения структуры мембраны — имеет в основе гидрофильные взаимодействия молекул. Этот механизм был предложен для молекул, которые имеют конформацию амфипатической  $\alpha$ -спирали (т. е. боковые цепи аминокислот с положительным зарядом располагаются вдоль одной поверхности  $\alpha$ -спирали, а боковые цепи гидрофобных аминокислот — вдоль другой), таких как дермасептин, цекропин, человеческий кателицидин LL-37 и др. (Matsuzaki, 1999), а также, как предполагается, и для некоторых мембрано-литических пептидов с  $\beta$ -структурной организацией молекулы. Согласно этой модели, литические пептиды находятся в контакте с головками кислых фосфолипидов на протяжении всего процесса деструктурирования мембраны.

Данная модель включает четыре стадии: первая — связывание молекул пептида, имеющего, как правило, высокий положительный заряд и находящегося в форме мономера, с головками фосфолипидов мембраны, а также с липополисахаридом грамотрицательных бактерий или тейхоевыми кислотами грамположительных; вторая — размещение молекул пептидов на поверхности мембраны, так, что их гидрофильные поверхности оказываются направленными либо к головкам фосфолипидов, либо к водному раствору; третья — вращение молекул пептида, приводящее к реориентации их гидрофобных участков по направлению к гидрофобному кору мембраны; четвертая — дезинтеграция мембраны вследствие нарушения структуры липидного бислоя. Стадия, предшествующая дезинтеграции мембраны, может сопровождаться образованием в ней отверстий, через которые могут проходить как ионы, так и более высокомолекулярные соединения. Такие процессы были показаны при действии дермасептина и магейнина, образующиеся при этом поры получили название тороидальных или «ход червя» (wormhole). В отличие от пор, рассматриваемых в предыдущей модели, образованных только молекулами пептидов, тороидальная пора построена как из молекул пептидов, так и липидных молекул. Через образовавшиеся тороидальные поры пептидные молекулы могут проходить через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и далее, через внутреннюю мембрану.

В пользу развиваемых представлений о механизмах антимикробного действия рассматриваемых пептидов свидетельствуют и данные о молекулярных основах резистентности бактерий к этой группе соединений (Ganz, 2001; Peschel, 2002). Выявлены штаммы *Staphylococcus aureus*, устойчивость которых к действию дефенсинов, протегринов и других антибиотических пептидов связана с модификацией структур клеточной стенки и цитоплазматической мембраны микроорганизмов, снижающих их общий отрицательный заряд поверхности. В частности, было установ-

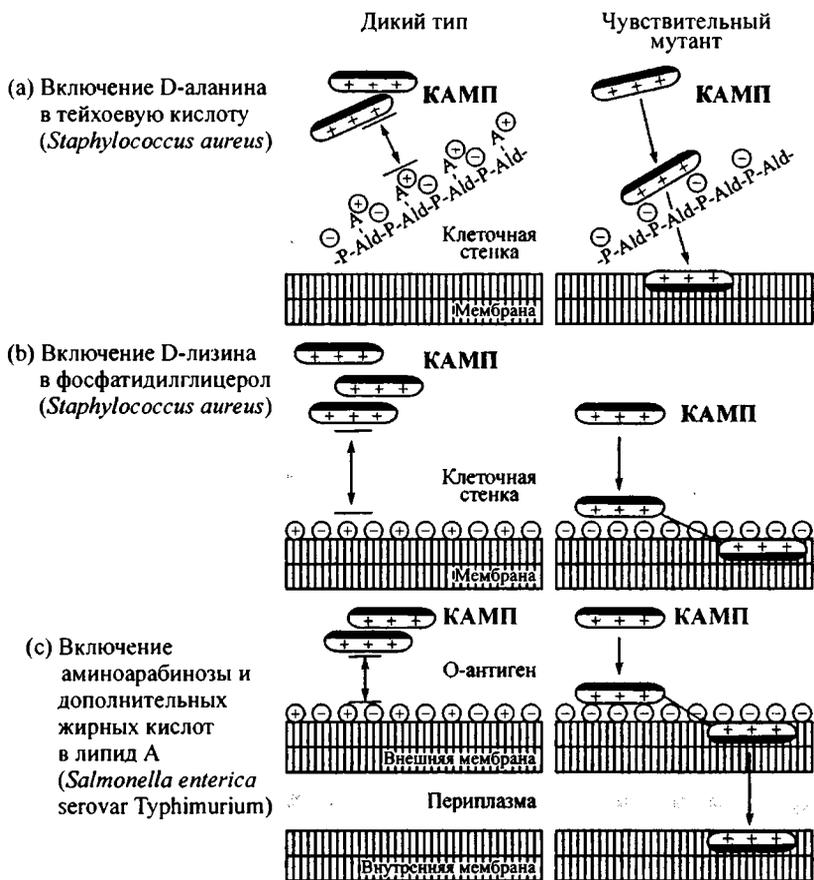


Рис. 20. Механизмы резистентности бактерий к действию антимикробных пептидов (по: Peschel, 2002).

КАМП — катионный антимикробный пептид.

лено, что у этих штаммов наблюдается повышенное включение аминокислоты D-аланина в состав тейхоевых кислот путем их эстерификации (Peschel et al., 1999). Другой вариант модификации связан с ковалентным присоединением к мембранному фосфатидилглицеролу дополнительных остатков аминокислоты L-лизин (Peschel et al., 1999). Включение D-аланина и L-лизина в состав оболочки стафилококков приводит к заметному снижению отрицательного заряда поверхности микробной клетки и, как следствие, уменьшает электростатическое связывание с ней катионных пептидов, являющееся необходимым условием их микробоцидного действия (рис. 20). У грамотрицательной бак-

терии *Salmonella enterica*, устойчивой к действию катионного пептидного антибиотика полимиксина, также выявлена структурная модификация в составе ведущего компонента наружной мембраны липополисахарида, заключающаяся в ковалентном присоединении к липиду А аминокислоты гуанидина (Guina et al., 1998), протонированная аминогруппа которой снижает отрицательный заряд поверхности микроба. Все рассмотренные модификации обеспечивают формирование резистентности микроорганизмов к пептидам катионной природы, блокируя инициальную фазу взаимодействия бактерий с пептидами.

В арсенале микробной резистентности к антибиотическим пептидам могут быть задействованы и протеазы (Guina et al., 2000). В частности, к таковой относится Pho-P-регулируемая протеаза наружной мембраны *S. enterica*, обеспечивающая повышенную резистентность бактерий к  $\alpha$ -спиральным антимикробным пептидам, благодаря их активному протеолизу. Некоторые штаммы *Neisseria gonorrhoeae* являются высокорезистентными к протеинам и LL-37, что связано со способностью бактериальных клеток активно выводить пептиды, связавшиеся с их поверхностью, используя механизмы активного переноса веществ во внеклеточную среду (Shafer et al., 1998).

### 3. 3. 8. Лактоферрин

Лактоферрин — 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 двумя атомами  $Fe^{3+}$ , окрашенный в красный цвет (Masson, Heremans, 1968). В связи с этим в ранней литературе лактоферрин (ЛФ) часто называли «красным белком» (red protein).

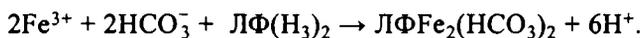
История и современное состояние исследований в области структуры и функций лактоферринов отражены в монографии П. Массон (Masson, 1970), материалах специального симпозиума (Hurchens et al., 1994) и ряде зарубежных обзоров (Aisen, Listowsky, 1980; Bezkorovainy, 1981; Reiter, 1983; Iyer, Lönnerdal, 1993; Brock, 1995). 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, жел-

чи, семенной и цервикальной жидкости, соке желудка, кишечника и поджелудочной железы) (Masson, 1970).

В 1969 г. ЛФ впервые был идентифицирован иммунохимически в гранулярном аппарате нейтрофильных гранулоцитов 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., 1987). Первичные структуры ЛФ молока человека (Metz-Boutigue et al., 1984) и коровы (Pierce et al., 1991) приведены на рис. 21.

Функционально ЛФ представляют собой природные комплексоны (хелаторы) клеток и жидких сред организма, прочно связывающие и транспортирующие катионы металлов переменной валентности ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ). 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 (Oram, Reiter, 1968; Masson, 1970; Reiter, 1983). Причем в преобладающем числе исследований продемонстрировано микробостатическое действие белка. Создавая и подерживая 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,

<i>A</i>		<sup>1</sup> GRRRRSVQWC	AVSQPEATKC	FQWQRNMRKV	RGPPVSCIKR	DSPIQCIQAI
AENRADAVTL	DGGFIYEAGL	APYKLRPVAA	EVYGTERQPR	THYYAVAVVK	KGGSFQLNEL	QGLKSCHTGL
RRTAGWNVPT	GTLRPFNLWT	GPPEPIEAAV	ARFFSASCVP	GADKGQFPNL	CRLCAGTGEN	KCAFSSQEPY
FSYSGAFKCL	RDGAGDVAFI	RESTVFEDLS	DEAERDEYEL	LCPDNTRKPV	DKFKDCHLAR	VPSHAVVARS
VNGKEDAIWN	LLRQAQEKFG	KDKSPKFQLF	GSPSGQKDLL	FKDSAIGFSR	VPPRIDSGLY	LGSGYFTAQ
NLRKSEEEVA	ARRARVWCA	VGEQELRKC	QWVSLSEGSV	TCSSASTTED	CIALVLKGEA	DAMSLDGGYV
YTACKGLVP	VLAENYKSQQ	SSDDPNCVD	RPVEGYLAVA	VVRRSDTSLT	WNSVKGKKSC	HTAVDRTAGW
NI PMGLLFNQ	TGSCKFDEYF	SQSCAPGSDP	RSNLCALCIG	DEQGENKCV	NSNERYGYT	GAFRCLAENA
GDVAVVKDVT	VLQNTDGNNN	EAWAKDLKLA	DFALLCLDGK	RKPVTEARSC	HLAMAPNHAV	VSRMDKVERL
KQVLLHQQAK	FGRNGSDCPD	KFCLFQSETK	NLLFNDNTEC	LARLHGKTTY	EKYLGPQYVA	GITNLKKCST
SPLLEACEFL	RK					

<i>B</i>		<sup>1</sup> APRKNVRWCT	ISQPEWFKCR	RWOWRMKKG	APSITCVRRA	FALECIRAIA
EKKADAVTLD	GGMVFEAGRD	PYKLRPVAAE	IYGTKESPQT	HYYAVAVVKK	GSNFQLDQLQ	GRKSCHTGLG
RSAGWVPMG	ILRPYLSWTE	SLEPPPGAVA	KFFSASCVPC	IDRQAYPNLC	QLCKGEGENQ	CACSSREPYF
GYSGAFKCLQ	DGAGDVAFVK	ETTVFENLPE	KADRQYELL	CLNNSRAPVD	AFKECHLAQV	PSHAVVARSV
DGKEDLIWKL	LSKAQEKFGK	NKRSRFQLFG	SPPGQRDLLF	KDSALGFLRI	PSKVDSALYL	ASRYLTTLKN
LRETAEEVKA	RYTRVWCAV	GPEEQKKCQQ	WSQQSGQNV	CATASTDDC	IVLVLKGEAD	ALNLDGGYIY
TAGKCGLVPV	LAENRKSSKY	SSLDCVLRPT	EGYLAVAVVK	KANEGLTWN	LKDKKSCHTA	VDRTAGWNI
MGLIVNQTGS	CAFDEFFSQS	CAPGRDPKSR	LCALCAGDDQ	GLDKCVPSK	EKYGYTGAF	RCLAEDVGDV
AFVKNDTVWE	NTNGESTADW	AKNLNREDFR	LLCLDGTRKP	VTEAQSCHLA	VAPNHAVVSR	SDRAAHVKQV
LLHQQALFGK	NGKNCPKFC	LFKSETKNLL	FNDNTECLAK	LGRPTYEY	LGTEYVTAIA	NLKKCSTSP
LEACAFLTR						

Рис. 21. Первичная структура лактоферринов человека (*A*) и крупного рогатого скота (*B*).

Последовательности, отвечающие структуре лактоферрицинов подчеркнуты.

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 микробостатической активности. По мнению американского исследователя Вейнберга (Weinberg, 1978, 1984, 1992), 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 гиперртрансферринемией 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, ИЛ-1 терапию, которая индуцирует плазменную гипоферримию (Weinberg, 1984).

Наряду с микробостатическим действием в серии работ (Arnold et al., 1977, 1980, 1981, 1982) было установлено и прямое бактерицидное действие ЛФ в отношении некоторых видов микрофлоры (*Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. mutior*, ATCC 6303, *Vibrio cholerae* 5698, *Pseudomonas aeruginosa* и др.). Это свойство присуще только ненасыщенному железом ЛФ (аполактоферрину), как и в случае проявления его микробостатической активности. Однако механизм подобного действия остается во многом неясным. Можно предположить, что в условиях этих экспериментов бактерицидность аполактоферрина являлась результатом ряда изменений в структуре оболочек бактерий. Например,

известна способность ЛФ выщеплять (высвобождают) 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  $Ca^{2+}$  (строго недоказанное), которые стабилизируют наружную мембрану. Подобным дестабилизирующим образом действует на мембраны известный хелатор ЭДТА. Наряду с этим возможно и прямое электростатическое взаимодействие слабо основных молекул ЛФ ( $pI \sim 8.5$ ) с карбоксильными группами 2-кето-3-дезоксидоктоновой кислоты (КДО) сердцевинного полисахарида и фосфатными остатками липида А (Appelmelk et al., 1994), входящих в молекулы липополисахарида, завершающееся выщеплением последней из наружной мембраны и нарушением ее целостности и барьерной функции. Подобным образом на грамположительные бактерии действует пептидный антибиотик микробного происхождения полимиксин В (Morrison, Jacobs, 1976). 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 энзимов (вскрытие их латентной активности), например фосфолипаз, гликаназ, приводящая к аутоповреждению клеток, с которыми взаимодействует лактоферрин. Сходный механизм антимикробного действия реализуется частично и бактерицидным проникающим увеличивающим белком из нейтрофильных гранулоцитов человека и кролика (Elsbach, Weiss, 1993a, 1993b). В пользу существования избирательного взаимодействия ЛФ и эндотоксина свидетельствуют результаты эксперимента, в котором парентерально введенный ЛФ коровы защищал мышей, инфицированных летальной дозой *E. coli* (Zagulski et al., 1989). Не исключены и другие варианты трактовки протективного эффекта гетерологичного ЛФ в организме мышей, например как проявление эндотоксин-нейтрализующей 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:  $^1APRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAFALECCIRAI A E K K A^{54}$ , а при обработке пепсином более короткий участок:  $^{17}FKCRRWQ-$

WRMKKLGAPSITCVRRAF<sup>41</sup>. Последний получил в литературе название лактоферрина В (Bellamy et al., 1992). Оба пептида обладают существенно большим микробицидным действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии и грибы, нежели исходная молекула. Установлено наличие дисульфидной связи в лактоферрине В, а в его функциональном гомологе из ЛФ молока человека — лактоферрине Н (<sup>1</sup>GRRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDSPI QCI<sup>47</sup>) — два S-S-мостика (Tomita et al., 1994). Интересно, что идентичный лактоферрину В пептид выделен из содержимого желудка крыс линии Wistar, которых в течение 4 дней поддерживали 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, бактеницина 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), кислородзависимой миелопероксидазной системой (Кокряков и др., 1989). Подробнее особенности такого взаимодействия описаны в главе, посвященной свойствам пероксидаз.

Таким образом, ЛФ в интактном состоянии, будучи слабым микробицидным агентом, тем не менее создает условия, препятствующие размножению микроорганизмов и способствующие реализации антимикробных свойств лизоцима (Ellison, Giehl, 1991) и миелопероксидазной системы (Кокряков и др., 1989). 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.

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, 1985). 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 НК-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., 1981; Kurose et al., 1994). Системное влияние ЛФ на защитные функции организма может быть опосредовано его способностью подавлять продукцию моноцитами и макрофагами гранулоцит-моноцит колонестимулирующего фактора, которая была установлена в культуральных (Brockmeyer, Platzner, 1984) условиях и *in vivo* (Brockmeyer et al., 1978). 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.

### **3. 3. 9. Бактерицидная проницаемость увеличивающий белок**

Поиски антимикробных факторов нейтрофилов, избирательных действующих на грамотрицательные бактерии, 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 сопровождались 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 как бактерицидные проницаемость увеличивающие белки (БПУ-белки).

БПУ-белки 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. 22) выявило значительную степень сходства их первичных структур (> 60 %) (Gray et al., 1989; Leong, Camerata, 1990; Elsbach, Weiss, 1993a, 1993b). Изоточки обоих белков находятся в щелочной области значений рН (рН~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 пролин-богатый участок, чувствительный к действию протеаз, разделяет эти две основные части молекулы БПУ-белка. После ограниченного протеолиза молекулы белка из него образуются 25 кДа аминотерминальный и 30 кДа карбокситерминальный фрагменты.

Холобелок в наномолярных (Weiss et al., 1978) концентрациях ингибирует рост и размножение многих видов грамотрицательных бактерий и не оказывает цитотоксического действия на грамположительные бактерии и эукариотические клетки.

Цитотоксическое действие БПУ-белка на грамотрицательные бактерии реализуется в две стадии. На первой стадии белки в концентрации  $10^{-8}$ — $10^{-9}$  М при нейтрально-щелочных значениях рН вызывают в течение первых минут контакта с чувствительными бактериями (*E. coli*, *S. 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 протя-

<i>A</i>		<sup>1</sup> VNPGVVVRIS	QKGLDYASQQ	GTAALQKELK	RIKIPDYSDS
FKIKHLGKGH	YSFYSDMIRE	FQLPSSQISM	VPNVGLKFSI	SNANIKISGK	WKAQKRFLKM
SGNFDSLIEG	MSISADLKLK	SNPTSGKPTI	TCSSCSSHIN	SVHVHISKSK	VGWLIQLFHK
KIESALRNKM	NSQVCEKVTN	SVSSKLQPYF	QTLPVMTKID	SVAGINYGLV	APPATTAETL
DVQMKGEFYS	ENHHNPPPPFA	PPVMEFPAAH	DRMVYLG LSD	YFFNTAGLVY	QEAGVLKMTL
RDDMI PKESK	FRLTTKFFGT	FLPEVAKKFP	NMKIQIHVSA	STPPHLSVQP	TGLTFYPAVD
VQAFVLPNS	SLASLFLIGM	HTTGSMEVSA	ESNRLVGELK	LDRLLELKH	SNIGPPVEL
LQDIMNYIVP	ILVLPRVNEK	LQKGFPLPTP	ARVQLYNVVL	QPHQNFLFLG	ADVVK
<i>B</i>		<sup>1</sup> TNPGIVARIT	QKGLDYACQQ	GVLTLQKELE	KITIPNFSGN
FKIKYLKGQ	YSFFSMVIQG	FNLPNQIRP	LPDKGLDLST	RDASIKIRGK	WKARKNFIKL
GGNFDSLVEG	ISILAGLNLG	YDPASGHSTV	TCSSCSSGIN	TVRIHISGSS	LGWLIQLFRK
RIESLLQKSM	TRKICEVVTST	TVSSKLQPYF	QTLPVTTKLD	KVAGVDYSLV	APPATANNL
DWLLKGEFFS	LAHRSPPPFA	PPALAFPSDH	DRMVYLGISE	YFFNTAGFVY	QKAGALNLT
RDDMI PKESK	FRLTTKFFGI	LIPQVAKMFP	DMQMQLFIWA	SLPPKLTMKP	SSLDLIFVLD
TQAFAILPNS	SLDPLFLLM	NLNLVVVGA	KSDRLIGELR	LDKLLLELKH	SDIGPFSVES
LQSVINYVMP	TIVLPVINKK	LQKGFPLPLP	AYIELFNLT	OPYQDFLLFG	ADVQYS

Рис. 22. Первичная структура бактерицидных проникающих увеличивающих белков из нейтрофилов человека (*A*) и крупного рогатого скота (*B*).

жении первых 20—30 мин взаимодействия бактерицидного белка с микробной поверхностью. Электронно-микроскопическое изучение морфологических изменений в обработанных БПУ-белком 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 БПУ-белка имеет N-концевой фрагмент его молекулы (Ooi et al., 1991). Полученный путем протеолиза или биотехнологически рекомбинантный аминотерминальный 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 (эндотоксину) наружной мембраны грамотрицательных бактерий (Gazzano-Santoro et al., 1992). Очищенные природные и рекомбинантные (rBPI55) холобелки, как и их аминотерминальные фрагменты (pBPI25, 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 ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-лизина, гуанидиновая аргинина) белка с кислотными компонентами (в первую очередь, по-видимому, с 3-дезоксид-маннооуктулозоновой кислотой) липополисахарида внешней мембраны грамотрицательных бактерий является первым необходимым условием реализации конечного биологического эффекта. Надфизиологические (40—80 mM) концентрации Mg<sup>2+</sup> или Ca<sup>2+</sup>, препятствующие связыванию белка с поверхностью бактерий, блокируют и проявление его антимикробных свойств. Интересно, что резистентные к действию БПУ-белка штаммы грамотрицательных (*S. marcescens*, *P. vulgaris*) и грамположительных бактерий не способны адсорбировать его на своей поверхности (Elsbach, Weiss, 1983, 1988). Чувствительность различных штаммов и видов грамотрицательных бактерий находится в прямой зависимости от степени сорбции на них бактерицидного белка. Шероховатые штаммы *S. typhimurium* и *E. coli*, несущие на своей поверхности больше анионных групп по сравнению с гладкими штаммами, связывают БПУ-белок из среды эффективнее, они и более подвержены его антимикробному действию. Можно отметить, что активности холобелка и его аминотерминального фрагмента в отношении шероховатых штаммов практически одинаковы, но рекомбинантный вариант

N-концевой части молекулы (гВР123) почти в 50 раз активнее БПУ-белка 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 БПУ-белка к ЛПС вследствие затруднения доступа к коровой анионной области молекулы эндотоксина (рис. 5).

В связи с особой значимостью присутствия ЛПС в оболочке грамотрицательных бактерий в реакции избирательного действия БПУ-белка на эту группу микроорганизмов следует кратко рассмотреть современное представление о структуре эндотоксинов (Raetz, 1990; Rietschel, Brade, 1992; Morrison et al., 1994). Липополисахарид (эндотоксин) наружной мембраны является «визитной карточкой» грамотрицательных бактерий. В составе клеточной стенки бактерий он вместе с белками и липидами 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 абеквобы, маннозы, рамнозы, галактозы и глюкозы, которая, как правило, выступает над поверхностью клеточной оболочки (рис. 4, 5) и сердцевинной (коровой) части, которая в качестве основных структурных компонентов содержит 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 наружной 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. Серцевинный полисахарид ковалентно связан с липидом А, локализованным во внешнем слое наружной мембраны. Таким образом структура на-

ружной 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 (ИЛ-1, ФНО $\alpha$  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 этих 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 БПУ-белка 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 (Elsbach, Weiss, 1993a, 1993b) и калифорнийской фармацевтической фирмой «Хота» по разработке эффективного антиэндотоксического препарата на основе БПУ-белка. Было установлено, что не только природный БПУ-белок (pBP155), но и рекомбинантная форма его N-концевой части (rBP123), полученная биотехнологическим способом, обладают высоким сродством ( $K = 2\text{—}5$  пМ) 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 является очень важным 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 (Elsbach, Weiss, 1993a, 1993b).

Интересно, что структурно-гомологичный БПУ-белку острофазовый ЛПС-связывающий белок плазмы крови человека (ЛПС-связывающий белок, ЛСБ) лишен подобной активности. Он в противоположность БПУ-белку усиливает активность липополисахаридов (Tobias, Ulevitch, 1994) как индукторов провоспалительных факторов.

Сочетание таких важных функциональных свойств у БПУ-белка, как блокада провоспалительного действия ЛПС и прямое бактерицидное действие на грамотрицательную микрофлору, является основанием для его клинического применения. Проведены клинические испытания на добровольцах рекомбинантной фор-

мы N-концевого фрагмента БПУ-белка (gBPI23 или Neuprex), 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 gBPI23 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 цементирующую роль в формировании плотного слоя наружной мембраны, обогащенного липополисахаридами, путем образования поперечных солевых мостиков между его отдельными молекулами (Elsbach, Weiss, 1983, 1988; Franklin, Show, 1984). Разрыхление липополисахаридного слоя приводит к обнажению гидрофобных областей наружной мембраны и облегчает, таким образом, 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 (Mappion et al., 1990a, 1990b) наличие в составе БПУ-белка 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, отличающиеся от мембран контрольных штаммов увеличенной концентрацией насыщенных жирных кислот (Elsbach, Weiss, 1988). Такие штаммы бактерий проявляли повышенную устойчивость к антимикробному действию БПУ-белка. 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 БПУ-белка сопряжена со структурной дезорганизацией внутренней (цитоплазматической) мембраны (Mannion et al., 1990b) и блокадой в ней транспортных и энергетических процессов.

Активность БПУ-белка в инактивации нейтрофильными гранулоцитами млекопитающих грамотрицательных бактерий усиливается еще рядом белково-пептидных соединений, выявленных в фагоцитах. В псевдоэозинофилах кролика обнаружены два 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 несколько раз эффекты ранней обратимой фазы воздействия БПУ-белка на бактерии. В то же самое время они подавляют ростингибирующую активность БПУ-белка. Оба белка проявляют ЛПС-связывающую способность и структурно гомологичны белкам CAP-18 кролика и кателину из лейкоцитов свиньи (рис. 17). Наряду с этим выявлен синергизм антимикробного действия БПУ-белка человека с катепсином G и эластазой (Olsson et al., 1978) и дефенсинами (Levy et al., 1994).

Кооперативные взаимоотношения БПУ-белка с другими факторами антимикробной защиты, по-видимому, не ограничиваются только белками лейкоцитарного происхождения. В частности, он избирательно активирует фосфолипазы бактериальной оболочки *E. coli* (Wright et al., 1990a), что приводит к взаимоусиливающему 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 БПУ-белка. Кроме того, переход от первой (обратимой) фазы ко второй (необратимой) заметно ускоряется в присутствии терминальных компонентов комплемента (Mannion et al., 1990b), что может рассматриваться в качестве примера кооперации различных молекулярных факторов врожденного иммунитета.

### 3. 3. 10. Серпроцидины

#### 3. 3. 10. 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; Baggolini, Dewald, 1985).

Протеиназа с субстратной специфичностью подобной химотрипсину была выделена из нейтрофилов человека (Olsson, 1977; Olsson et al., 1978) и ряда других 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) практически идентичными аминокислотными составами и иммунохимическими свойствами (Olsson, 1977). Расшифрована полностью первичная структура катепсина G человека (рис. 23) (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  $\alpha_2$ -макроглобулином,  $\alpha_1$ -антихимотрипсином, диизопропилфторфосфатом и фенилметилфторсульфониллом 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.

Естественными субстратами катепсина G (КФ 3.4.21.20) является казеин, фибрин и фибриноген, компоненты комплемента (C1, C3, C4, C5), коллаген и протеогликианы. Низкая субстратная специфичность фермента определяет его важную биологическую роль в разнообразных физиологических и патофизиологических процессах (Havemann, Gramse, 1984; Янковский, Довнар, 1985) организма человека и животных. Антимикробная активность катепсина G показана в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Odeberg, Olsson, 1976; Olsson et al., 1978), а также грибов (Drazin, Lehrer, 1977). Микробоцидное

Азуроцидин: <sup>1</sup>IVGGRKARPRQFPFLASIQNQGR---H-FCGGALIHARFVMTAASC<sup>F</sup>QSQNP<sup>G</sup>VSTVVL  
 Эластаза: IVGRRRAPHAWPFMVSLQLRG--G-H-FCGATLIAPNFVMSAAHC<sup>V</sup>ANVNVRAVRVVL  
 Катепсин G: IIGGRESRPHSRPYMAYLQIQSPAGQSR-CGGFLVREDFVLTAAHC<sup>W</sup>GS----NINVTL

Азуроцидин: GAYDLRRR-ERQSRQTFSSISS-MSENGYDPQQNLNDLMLLQLDREANLTSSVTILPLPL  
 Эластаза: GAHNLSRR-EP-TRQVFVAVQR-IFENGYDPVNLNDIVILQLNGSATINANVQVAQLPA  
 Катепсин G: GAHNIQRR-EN-TQQHITARRAIRHPQYNQRTIQND<sup>I</sup>IMLLQLSRRVRRNRNVNPVALPR

Азуроцидин: QNATVEA-GTRCQVA-GWGSQSRSGGRLSRFPRFVNVTVTPEDQCRPNN-----VC  
 Эластаза: QGRRLGN-GVQC-LAMGWLLGRNRGIASVLQELNVTVVVTSL-CRRSN-----VC  
 Катепсин G: AQEGLRP-GTLCTVA-GWGRVS-MRRGTDTLREVQLRVQRDRQCLRIFGSDPRR-QIC

Азуроцидин: TGVLTRRG-GICNGDGGTPLVCEGLAHGVASFSL-GPC-GRG-PDFFTRVALFRDWIDG  
 Эластаза: TFVRG-RQAGVCFGDS<sup>G</sup>SGSPLVCNGLIHGIAFVVR-GGCASGLYPDAFAPVAQFNMWIDS  
 Катепсин G: VGDRRERKAAF-KGDS<sup>G</sup>GGPLLCCNNVANGIVSYGKSSG----VPPEVFTRVSSFLPWIRT

Азуроцидин: VLNNPGP-GPA<sup>225</sup>  
 Эластаза: IIQ<sup>218</sup>  
 Катепсин G: TMRSFKLLDQMETPL<sup>235</sup>

Рис. 23. Сравнение первичных структур серпроцидинов из нейтрофильных гранулоцитов человека.

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

действие белка существенно не зависит от его протеолитической активности, поскольку оно сохранялось при ингибировании фермента диизопропилфторфосфатом 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 условием реализации антимикробных свойств белка, но не единственным. Было показано, что полное насыщение белком поверхности *S. aureus* и *E. coli* имеет место при слабо бактерицидных концентрациях. Значит, какие-то дополнительные факторы, кроме феномена адсорбции, участвуют в реализации антимикробной активности катепсина G.

По-видимому, проникновение белка во внутренние структурные области бактерий важно для осуществления им 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 *S. aureus* погибают, в то время как для равного эффекта при использовании *E. coli* в качестве мишеней необходима доза в  $2.5 \times 10^{-6}$  М.

Во-вторых, воздействие катепсина G на микробы сопровождается подавлением в них синтеза белка, РНК и ДНК-молекул, образование которых осуществляется во внутренних компартаментах 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.

### 3. 3. 10. 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 (Barrett, 1981b; Baggiolini, Dewald, 1985; Spitznagel et al., 1989) 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 вариабельности 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—9. 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 фибриноген, компоненты комплемента (C3, C5), кининогены, гемоглобин и протеогликаны. В настоящее время полностью определена первичная структура эластазы нейтрофилов человека (рис. 23) (Sinha et al., 1987).

Эластаза относится к группе антимикробных факторов нейтрофилов со слабой бактерицидной активностью. Олссон с соавт. (Olsson et al., 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 БПУ-белка.

Показана переваривающая активность эластазы в отношении некоторых белков наружной мембраны *E. 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 экзоцитоза обеспечивают эффективность поражения микроорганизмов. В настоящее время продемонстрировано взаимоусиливающее антимикробное действие эластазы и МПО-системы, эластазы и катепсина G (Odeberg, Olsson, 1976), эластазы и лизоцима, катепсина G и лизоцима (Thorne et al., 1976).

### 3. 3. 10. 3. Азуроцидин

Азуроцидин, известный также как CAP37 (Pohl et al., 1990; Pegeira, 1995), является катионным антимикробным белком, выявленным в азурофильных гранулах НГ, который избирательно активен в отношении грамотрицательных бактерий (Spitznagel, 1990; Campanelli et al., 1990), что функционально роднит его с БПУ-белком. Он, как и все представители группы серпроцидинов, является гликопротеином с тремя 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 (рис. 23). 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, 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 (PR3) 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 (Campanelli et al., 1990; Niles et al., 1989; Kao et al., 1988; Bories et al., 1989).

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 серпроцидины (*serprocidins-serine protease cidins*) (Gabay, Almáida, 1993). Все они являются гликопротеинами с молекулярной массой в

пределах 25—29 кДа и содержатся в нейтрофилах человека в относительно заметном количестве: катепсин G — 2.5 мг/10<sup>9</sup> клеток, азуроцидин — 2, эластаза — 1.5, протеиназа 3 — 1 мг/10<sup>9</sup> клеток. Наиболее активным в антимикробном отношении представителем этой группы белков является катепсин G, наиболее слабым — эластаза и протеиназа 3, причем их микробоцидность в условиях *in vitro* превышает даже таковую дефенсинов человека (HNPI, 2 и 3). 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 естественно 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 перфоридами и, возможно, дефенсинами 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 эукариот. Эти эффекты подавляются умеренными концентрациями NaCl (0.1—0.2 М), дивалентными катионами (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) и сывороткой (Campanelli et al., 1990), что свидетельствует о качественном сходстве механизмов их антимикробного действия и ряда других антибиотических факторов лейкоцитарного происхождения (дефенсины, лактоферрины и т. д.).

Интересно, что, как и в случае с лактоферрином, некоторые пептиды, высепляемые путем ограниченного протеолиза 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 хемоаттрактантом моноцитов (Pereira et al., 1990). 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 PR3 способствует процессу агрегации и дегрануляции тромбоцитов (Renesto et al., 1994). А комплекс катепсинов G с  $\alpha 1$ -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.

### 3. 3. 11. Лизоцим

Лизоцим (синонимы: мурамидаза, мукопептидгликогидролаза) — один из составных компонентов гранулярной антимикробной системы нейтрофилов человека и животных (Cohn, Hirsch, 1960a, 1960b). Со времени открытия фермента 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 низкой молекулярной массой (~15 000 Да) (Jolles, 1969; Hinderburg 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 lysodeikticus*. 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  $\beta$ -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 бактериологическая 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, БПУ-белок, сериновые протеиназы и МПО-система, которые в процессе дегрануляции оказываются локализованными в фаголизосомах. В работе Торна 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 обезьян (Rausch, Moore, 1975). Они ставят под сомнение важную роль лизоцима в защите микроорганизмов 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.

### **3. 4. Системы инаktivации микроорганизмов, сопряженные со слизистыми, наружными покровами и гуморальными средами организма**

#### **3. 4. 1. Антибиотические пептиды эпителиальных барьеров животных**

Эпителии многоклеточных животных являются тканями, покрывающими их тело и выстилающими в виде пласта их многочисленные полости. Они формируют ведущие физико-химические барьеры макроорганизмов на пути возможного проникнове-

ния в их внутреннюю среду патогенных микробов и комменсалов микробиоты (нормальной микрофлоры) (Voman, 1995; Кокряков, 1999). В процессе эволюции у животных возникли и совершенствовались многочисленные механизмы активного химического противодействия инвазии микроорганизмов через барьерные эпителии, в том числе и базирующиеся на продукции антибиотических пептидов (дефенсины, кателицидины, магейнины, дермисептины и др.) и белков (лизозим, лактоферрин, пероксидазы и др.). Эпителии кожи и слизистых желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов млекопитающих и человека вырабатывают многочисленные антимикробные вещества белково-пептидной природы, обеспечивающие защиту животных от болезнетворных микробов и вирусов на уровне «входных ворот инфекции» (Huttner et al., 1997; Schroder, Harder, 1999; Bevins, 2003). Среди этих эндогенных антибиотиков животного происхождения наиболее часто встречаются пептиды дефенсинового и кателицидинового семейств.

Первые представители эпителиальных дефенсинов были выявлены в клетках Панета, являющихся специализированными на секрецию эпителиальными клетками слизистой тонкого кишечника и локализованными в основании их Либеркюновых крипт. В силу этого данные дефенсины получили название криптдинов (Ouelette et al., 1989; Eisenhauer et al., 1992; Selsted et al., 1992). По своей структуре они относятся к группе  $\alpha$ -дефенсинов (рис. 11). У человека соответствующие им пептиды были обозначены как HD5 и HD6. Синтез этих дефенсинов носит преимущественно конститутивный характер в период дифференцировки клеток эпителиального слоя тощей и подвздошной кишок. Пептиды упаковываются в специальные гранулы, содержимое которых секретируется в просвет в ответ на бактериальный или холинергический стимул. При этом в просвете крипт концентрация дефенсинов достигает миллимолярного уровня, более чем достаточного для инактивации инфекционных агентов различной этиологии. По-видимому, именно благодаря столь высокой концентрации антибиотических пептидов в рассматриваемом отделе желудочно-кишечного тракта детектируется наименьшее количество микробов.

Эпителиальные клетки респираторного тракта также являются активными продуцентами антибиотических пептидов. Первый пептид  $\beta$ -дефенсинового семейства был выявлен в клетках эпителия трахеи крупного рогатого скота (Diamond et al., 1991, 1993). Он известен как трахеальный антимикробный пептид (tracheal antimicrobial peptide – TAP), продукция которого эпителиоцитами существенно возрастает при инфицировании слизистой трахеи или аппликации на нее липополисахаридов (Diamond et al., 1996). Индуктивный синтез TAP в этих условиях реализуется че-

рез CD14 рецептор и, возможно, TTP4, которые являются иницирующими звеньями пути сигнальной трансдукции, ведущего к активации транскрипционного фактора NFκB. У человека в эпителии дыхательных путей выявлено три пептида β-дефенсинового семейства (HBD1, HBD2 и HBD3), гомологичных TAP (Schroder, Harder, 1999), а также кателицидин LL-37 (FALL-39) (Agerberth et al., 1995). Их синергетическое действие с антимикробными белками (лизоцим, лактоферрин) на микроорганизмы обеспечивает иммунитет на уровне слизистых респираторного тракта.

Некоторые из рассматриваемых пептидов (HBD2, HBD3 и LL-37) выявлены в качестве факторов защиты и на уровне кожи человека, кератиноциты которой по индуктивному механизму продуцируют эти соединения в количестве, достаточном для инактивации потенциально патогенных микроорганизмов (Schroder, Harder, 1999). В качестве индукторов этого синтеза выступают как бактерии, так и некоторые эндогенные цитокины человека (ИЛ-1, ФНОα).

У насекомых процесс индуктивного синтеза антибиотических пептидов (дефенсины, цекропины, дрозомидин и др.) связан преимущественно с жировым телом (Hoffmann, Netru, 1992; Hoffmann, Reichhart, 1997), но он протекает, хотя и с меньшей интенсивностью, в эпителиальных клетках кишечника и мальпигиевых клубочков. Попадание бактерий и грибов на латеральную и базальную поверхность клеток эпителиального слоя инициирует в них продукцию антибиотических пептидов. Сходный процесс наблюдается при повреждении или инфицировании кутикулы насекомых (Brey et al., 1993). Это позволяет говорить о том, что между индуктивным синтезом антибиотических пептидов клетками барьерных эпителиев насекомых (Hoffmann, 2003) и эпителием трахеи крупного рогатого скота (Diamond et al., 1993, 1996) и кожи млекопитающих (Schroder, Harder, 1999) наблюдается заметное сходство. Более того, отдельные звенья путей сигнальной трансдукции, ведущие к активации транскрипционного фактора NFκB у млекопитающих (TTP, MyD88, TRAF6, IκB) и структурно-функционально гомологичного ему Dif/Relish фактора у дрозофилы (Толл-рецептор, Tube, dTRAF, Cactus) представлены структурно родственными белками (рис. 7) (Aderem, Ulevitch, 2000; Hoffmann, 2003).

Таким образом, структурно-функциональный анализ путей сигнальной трансдукции, отвечающих за активацию транс-факторов, ответственных за индуцибельный синтез антибиотических пептидов, выявил заметное сходство ряда звеньев этой регуляции в клетках жирового тела и эпителиоцитах насекомых (Hoffmann, 2003) и эпителиев млекопитающих (Bevins, 2003), что свидетельствует о древнем происхождении ряда ключевых молекул распознавания патогенассоциированных молекулярных паттернов

(Толл- и Толл-подобные рецепторы) и отдельных звеньев путей сигнальной трансдукции, ведущих к активации генов иммунного ответа в эволюции животного мира.

### 3. 4. 2. Цекропины

Изучение молекулярных основ естественного иммунитета у некоторых групп насекомых привело к открытию шведскими исследователями катионных антимикробных пептидов, получивших название цекропины (cecropins) (Hultmark et al., 1980; Boman, Hultmark, 1987). 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 (*Antheraca 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. 24). 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 не понятной, хотя, известно, что подобная модификация защищает белково-пептидные молекулы от действия карбоксипептидаз. Вторичная структура цекропина А представляет собой короткий неупорядоченный N-концевой участок (1—4 остатка), переходящий в классическую амфипатическую  $\alpha$ -спираль (5—21 остаток), которая шарнирной последовательностью (A-G-P) соединена с C-концевой преимущественно гидрофобной  $\alpha$ -спиралью (25—37 остатка) (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 (Boman et al., 1989). Структура препро-

Наименование пептида и его видовой источник	Первичная структура пептида			
Цекропин P1 нематоды <i>Ascaris suum</i>	SWLSKTAKKL	ENSAK-KR--	-ISEGIAIAI	QGG-----PR
<b>Цекропины из чешуекрылых насекомых</b>				
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	VGQAAAIAR*
Цекропин B-3 <i>Manduca sexta</i>	W--NPFKEL	ERAGQRVRDA	IISAGPAVAT	VGQAAAIAR*
Цекропин A <i>Hyalophora cecropia</i>	KW--KLFKKI	EKVGQNIIRDG	IIKAGPAVAV	VGQATQIAK*
Цекропин B <i>Hyalophora cecropia</i>	KW--KVFKKI	EKMGRNIRNG	IVKAGPAIAV	LGEAKAL*
Цекропин B <i>Antheraea pernyi</i>	KW--KIFKKI	EKVGRNIRNG	IIKAGPAVAV	LGEAKAL*
Цекропин A <i>Bombyx mori</i>	RW--KLFKKI	EKVGRMVRDG	LIKAGPAIAV	IGQAKSL*
Цекропин B <i>Bombyx mori</i>	RW--KIFKKI	EKMGRNIRDG	IVKAGPAIEV	LGSAKAI*
<b>Цекропины из двукрылых насекомых</b>				
Цекропин A <i>Drosophila melanogaster</i>	GWLKKIGKKI	ERVGQHTRDA	TI-QGLGIAQ	QAANVAATAR*
Цекропин B <i>Drosophila melanogaster</i>	GWLRKLGKKI	ERIGQHTRDA	SI-QVLGIAQ	QAANVAATAR*
Цекропин C <i>Drosophila melanogaster</i>	GWLKKLGKRI	ERIGQHTRDA	TI-QGLGIAQ	QAAMVAATAR*
Цекропин IA <i>Sarcophaga peregrina</i>	GWLKKIGKKI	ERVGQHTRDA	TI-QGLGIAQ	QAANVAATAR*
Цекропин IB <i>Sarcophaga peregrina</i>	GWLKKIGKKI	ERVGQHTRDA	TI-QVIGVAQ	QAANVAATAR*
<b>Цекропины целомоцитов асцидии</b>				
Стиелин C <i>Styela clava</i>	GWFGKAFRSV	SNFYKHKHTY	-IHAGLS---	-----AATLLG

Рис. 24. Первичные последовательности цекропинов.

Консервативные аминокислотные остатки отмечены *жирным шрифтом*. Звездочкой (\*) помечены амидированные С-концевые аминокислоты.

цекропина А выглядит следующим образом (структура, соответствующая цекропину А, подчеркнута):

MNFSRIFFFVFASCLTALAMVNAAPEPWKLFFKKIEKVGQNI  
RGIIKAGPAVAVVGOATQIAKG.

Первые N-концевые 24—26 аминокислот отсутствуют в конечном зрелом пептиде. Сигнальный пептид препроцекропина включает в себя первые 22 остатка и является гидрофобным. Про-фрагмент 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 препрочасть 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, инициирующий синтез цекропинов (Sun, Faye, 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 антибак-

териальной 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 лиганд-рецепторного 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 цекаропинов позволяют оценить значимость отдельных аминокислотных остатков в реализации антимикробных и цитотоксических свойств молекулы. Например, замена лейцина в 4-м или изолейцина в 8-м положении цекаропина А на пролин заметно снижает антимикробную активность молекулы, особенно в отношении грамположительной бактерии *M. luteus*. Пролин в данном случае нарушает амфипатическую N-концевую  $\alpha$ -спираль. Важное значение в реализации антимикробных свойств цекаропина А имеет триптофан во 2-м положении, удаление которого на два порядка снижает активность пептида в отношении *P. aeuruginosa* 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 цекаропина со свободными C-карбоксыльными 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 цекаропинов (цекаропины А и В) обладают повышенной антимикробной активностью по сравнению с менее катионным цекаропином D, в молекуле которого на три положительных заряда меньше (Boman et al., 1991).

С целью получения антибиотических пептидов с повышенной функциональной активностью и селективностью антимикробного действия идут 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 цекаропинам и мелиттину. Мелиттин является основным пептидным

компонентом пчелиного яда. Он состоит из 26 аминокислотных остатков: GIGAVLKVLTGLPALISWIKRKRQQ-NH<sub>2</sub>, образующих на N-конце молекулы гидрофобную  $\alpha$ -спираль, а на C-конце — гидрофильную  $\alpha$ -спираль. Подобная организация молекулы делает ее сильно токсическим соединением с антимикробными и гемолитическими свойствами. В серии осуществлено получение химическим твердофазным методом гибридных (химерных) молекул, фрагменты структур которых представлены как последовательностями мелиттина (М), так и цекропина А (СА) одновременно в разных сочетаниях. Антимикробная активность таких гибридных 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, как минимум состоящих 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  $\alpha$ -спирали и гидрофобной C-концевой  $\alpha$ -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 цекропин-родственный пептид P1 (рис. 24) в слизистой тонкой кишки свиньи. Треть остатков в молекулах P1 свиньи и цекропина оказались идентичными, а с учетом эквивалентного характера замен некоторых аминокислотных остатков гомология пептидов составляет около 70 % (Lee et al., 1989). Однако в настоящее время однозначно установлено, что цекропиноподобный пептид P1 является соединением, выделяемым нематодой *Ascaris suum*, паразитирующей на поверхности слизистой тонкого кишечника свиней (Anderson et al., 2003).

В 1997 г. в лаборатории профессора Лерера (США) были выделены и секвенированы цекропиноподобные пептиды (стиелины, *styelins*) из гемоцитов асцидии *Styela clava*, относящейся к хордовым животным подтипа оболочники (Lee et al., 1997).

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

### 3. 4. 3. Магейнины

Общеизвестно, что кожа лягушек является продуцентом многих биологически активных веществ (Bevins, Zasloff, 1990; Kreil, 1994), поэтому не удивительно обнаружение в ее секретах группы антимикробных пептидов, названных магейнинами (*magainins* от древнееврейского *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. 25) 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 в структуру пептида четырех дополнительных остатков лизина. Кроме магейнинов из

Магейнин 1	GIGKFLHSAG-KFG-KAFVGEIMKS
Магейнин 2	GIGKFLHSAG-KFG-KAFVGEIMNS
MSI-78	GIGKFLKKAK-KFG-KAFVK-ILKK*
Бомбинин 2	GIGA--LSA--KGALKGLAKGLAQHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 1	GIGGALLSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 2	GIGGALISAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 3	GIGASILSAG-KSALKGFAGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 4	GIGASILSAA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 5	GIGGALLSAA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-родственный пептид 6	GIGGALLSDA-KVGLKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 1 (BLP-1)	GIGASILSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 2 (BLP-2)	GIGSAILSAG-KSALKGLAKGLAEHFAN*
Бомбинин-подобный пептид 3 (BLP-3)	GIGAAILSAG-KSALKGLAKGLAEHF*
Бомбинин-подобный пептид 4 (BLP-4)	GIGAAILSAG-KSITKGLANGLAEHF*
Фрагмент предшественника ксенопсина (XPF)	GWASKIGQTLGKRIA-KVGLKELIQPK
PGLa	GMASKAGAIAGKRIA-KVALKAL*
Фрагмент предшественника левитида (LPF)	GWASKIGQTLGKRIA-KVGLQGLMQPK
Фрагмент 1 предшественника церулеина (CPF-1)	GFGSFLGKAL-KAALKIGANALGGSPOQ
Фрагмент 2 предшественника церулеина (CPF-2)	GFGSFLGKAL-KAALKIGAMALGGAPQ
Фрагмент 3 предшественника церулеина (CPF-3)	GLASLLGKAL-KAGLKIGTHFLGGAPQ
Фрагмент 4 предшественника церулеина (CPF-4)	GFGSFLGKAL-KAGLKIGTHFLGGAPQ
Фрагмент 5 предшественника церулеина (CPF-5)	GLASLLGKAL-KAALKIGANALGGSPOQ
Фрагмент 6 предшественника церулеина (CPF-6)	GLASLLGKAL-KAALKIGTHFLGGAPQ
Фрагмент 7 предшественника церулеина (CPF-7)	GLASFLGKAL-KAGLKIGANHLGGAPQ
Фрагмент 8 предшественника церулеина (CPF-8)	GFASFLGKAL-KAALKIGANMLGGAPQ
Фрагмент 9 предшественника церулеина (CPF-9)	GFASFLGKAL-KAALKIGANALGGAPQ

Рис. 25. Первичные структуры антибактериальных пептидов лягушек.

Консервативные аминокислотные остатки отмечены *жирным шрифтом*. Звездочкой (\*) помечены амидированные С-концевые аминокислоты.

кожи лягушки *Xenopus laevis* выделены антимикробные пептиды PGLa, девять фрагментов предшественников церулеина, фрагмент предшественника ксинопсина (рис. 25). Интересно, что часть этих пептидов была обнаружена и в эпителии желудка шпорцевой лягушки (Moore et al., 1991). Это дополнительное свидетельство 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. 25), 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 действие) эти пептиды не лизируют эритроциты и лимфоциты (Stuciani et al., 1991). Однако к их литическому действию оказались повышено чувствительны трансформированные (опухольные) 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  $\alpha$ -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, лишенные трех аминокислотных остатков в N-концевой области молекулы магейнина, сохраняют антимикробную активность в отношении *E. coli*, хотя и в некоторой степени сниженную. Удаление же четвертого 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 FLN лишает подобный пептид какой-либо антимикробной активности. Интересно, что замена глицина в 13-м положении на аланин, увеличивающая процент  $\alpha$ -спиральной структуры молекулы в водных растворах, приводит к усилению антимикробной активности производного магейнина, особенно в отношении *P. aeruginosa* и *S. 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 магейнина-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 (Malou, Kari, 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 гентамицин-устойчивого 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 для борьбы 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  $\alpha$ -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 располагают 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., 1989).

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., 1989), 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 по-

вышенном сродстве его катионных групп к фосфатным остаткам фосфолипидов мембран. Присутствие в мембранах эукариотических клеток холестерина, наоборот, снижает аффинитет магейнина к липидным 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 стереохимические свойства пептидов в анализируемом процессе не играют заметной роли, как это имеет место при лиганд-рецепторных 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 дорсальной 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).

Дефенсины, кателицидины, магейнины, секропины и другие катионные пептиды фагоцитов и барьерных систем у животных и человека благодаря особенностям структуры выступают эффективными антимикробными агентами, в значительной степени определяющими завершенность фагоцитоза и обеспечивающими инактивацию микроорганизмов на уровне клеточно-тканевых образований, пограничных к инфекции (входные ворота инфекции). Наряду с этой активностью антибиотические пептиды, как установлено в результате многочисленных исследований, могут проявлять и другие функциональные свойства, важные в реализации защитно-приспособительных реакций организма как при инфекции, так и в воздействии других неблагоприятных факторов окружающей среды.

### 3. 5. Защитные механизмы мечехвостов

Известно 4 наиболее изученных вида мечехвостов (подковообразных крабов): американский (*Limulus polyphemus*), японский (*Tachypleus tridentatus*) и два юго-восточных (*Tachypleus gigas* и *Carcinoscorpius rotundicauda*). Основными объектами иммунологических исследований являются первые два вида, у

которых изучены молекулярные и клеточные факторы противомикробной защиты. Особенностью этой защиты у мечехвостов является тесное сопряжение иммунных и гемостатических механизмов (Muta, Iwanaga, 1996). Эффективным механизмом поддержания гомеостаза в организме подковообразных крабов является коагуляционный каскад плазмы гемолимфы, активируемый липополисахаридами грамотрицательных бактерий и  $\beta$ -1,3-гликанами низших грибов. Исходно большая часть компонентов этого каскада локализована в гемоцитах рассматриваемых видов животных (табл. 8). При попадании во внутреннюю среду мечехвоста бактерий и низших грибов компоненты их клеточных стенок распознаются лектинами плазмы или рецепторами гемоцитов, что приводит в итоге к дегрануляции последних. Они выбрасывают в гемолимфу десятки физиологически активных веществ, включая компоненты коагуляционного каскада и набор антимикробных пептидов. Коагуляция плазмы у подковообразных крабов носит локальный, а не системный характер и направлена на иммобилизацию в сформировавшемся сгустке микроорганизмов, которые в последующем инактивируются тахиплезинами у *T. tridentatus* и *T. gigas*, полифемузинами у *L. polyphemus*, дефенсинами у *T. tridentatus*, антилипополисахаридным фактором и серпроцидином (Factor D) у других видов хелицероных.

Гуморально-клеточная кооперация факторов гемолимфы мечехвостов представляет собой пример отлаженной и отобранной в эволюции системы противомикробной защиты, которая, по-видимому, во многом определила возможность выживания указанных видов беспозвоночных на протяжении более пятисот млн лет. Они являются самой древней из ныне живущих группой животных типа членистоногих (*Arthropoda*).

Дополняет это взаимодействие совокупность лектинов плазменной (лимулин/C-реактивный белок) и клеточной локализации. Сочетанное действие рассматриваемых факторов осуществляет неотложное распознавание патогенных микроорганизмов и их элиминацию. Основные этапы коагуляционного каскада представлены на рис. 26. Ключевым ферментом каскада является коагуляционный фермент, превращающий растворимый коагулоген в коагулин, который подобно фибрину позвоночных формирует локально нерастворимый гель, иммобилизующий патогенные факторы. Основными патогенассоциированными молекулярными паттернами, распознаваемыми специализированными рецепторами и белками мечехвостов, являются липополисахариды грамотрицательных бактерий и 1,3- $\beta$ -D-гликаны низших грибов, которые двумя независимыми путями инициируют последовательную активацию протеиназ сериновой природы. Оба пути сходятся на уровне коагуляционного фермента.

## Защитные молекулы, обнаруженные в гемоцитах и в плазме гемолимфы подковообразных крабов (мечехвостов)

Белки и пептиды	Масса, кДа	Функция/специфичность	Локализация
<b>Факторы свертывания:</b>			
фактор С	123	Сериновая протеаза	L-гранулы
фактор В	64	» »	»
фактор G	110	» »	»
просвертывающий фермент	54	» »	»
коагулоген	20	Образование геля	»
<b>Ингибиторы протеаз:</b>			
LICI-1	48	Ингибитор фактора С	»
LICI-2	42	Ингибитор свертывающего фермента	»
LICI-3	53	Ингибитор фактора G	»
ингибитор трипсина	6.8	Тип Кунитца	?
<i>Limulus</i> ингибитор трипсина	16	Новый тип	?
LEBP-PI	12	» »	L-гранулы
<i>Limulus</i> цистатин	12.6	Семейство цистатинов 2	»
$\alpha_2$ -Макроглобулин	180	Ингибитор комплемента	Плазма и L-гранулы
ингибитор химотрипсина	10	?	Плазма
<b>Антимикробные вещества:</b>			
анти-ЛПС фактор	12	Гр-	L-гранулы
тахиплезины	2.6	Гр-, Гр+, грибы	S-гранулы
полифемузины	2.6	То же	»
большой дефенсин	8.6	» »	L- и S-гранулы
тахиститин	8.3	» »	S-гранулы
тахистатины	6.5	» »	»
фактор D	42	Гр-	L-гранулы

Таблица 8 (продолжение)

Белки и пептиды	Масса, кДа	Функция/специфичность	Локализация
<b>Лектины:</b>			
тахилектин-1	27	ЛПС (КДО, липид А), ЛТК	L-гранулы
тахилектин-2	27	N-ацетил-глюкозамин, ЛТК	»
тахилектин-3	15	ЛПС (О-антиген)	L-гранулы
тахилектин-4	470	ЛПС (О-антиген), ЛТК	?
тахилектин-5	380–440	N-ацетильные группы	Плазма
лимунектин	54	ФХ	L-гранулы
LAF	18	Агрегация гемоцитов	»
лимулин	300	Гемолитическая активность/ ФХ, ФЭ, СК, КДО	Плазма
Tachypleus СРБ-1	300	ФЭ	»
Tachypleus СРБ-2	330	Гемолитическая активность/ФЭ, СК	»
Tachypleus СРБ-3	340	Гемолитическая активность/СК, КДО	»
полифемин	?	ЛТК, N-ацетил-глюкозамин	»
ТТА	?	СК, N-ацетил-глюкозамин,	»
лифемин	400–500	N-ацетил-галактозамин	Гемолимфа
гарциноскорпин	420	СК	»
галактозо-связывающий белок	40	СК, КДО	»
белок А – связывающий белок	40	Галактоза	»
<b>Другие:</b>	86	Белок А	Цитозоль
Грансглутаминаза	8.6	Образование сшивок	L-гранулы
белок 8.6 кДа	80	Субстрат трансглутаминазы	»
пролин-богатый белок	3600	»	Плазма
гемоцианин		Транспорт кислорода (фенолок- сидазная активность)	
ТПР ( <i>Tachypleus Toll</i> )	110	?	Гемоциты

Примечание. LIC1 – *Limulus* внутриклеточный ингибитор коагуляции (*Limulus intracellular coagulation inhibitor*), LEBP-PI – *Limulus* эндотоксин-связывающий белок – протеазный ингибитор (*Limulus endotoxin-binding protein – protease inhibitor*), LAF – *Limulus* фактор агглютинации и агрегации (*Limulus agglutination/aggregation factor*), ТТА – *T. tridentatus* агглютинин, Гр<sup>-</sup> – грамотрицательные бактерии, Гр<sup>+</sup> – грамположительные бактерии, ФХ – фосфорилхолин, ФЭ – фосфорилэтаноламин, СК – сиаловые кислоты, ЛТК – липотейхоевые кислоты, ЛПС – липополисахарид.

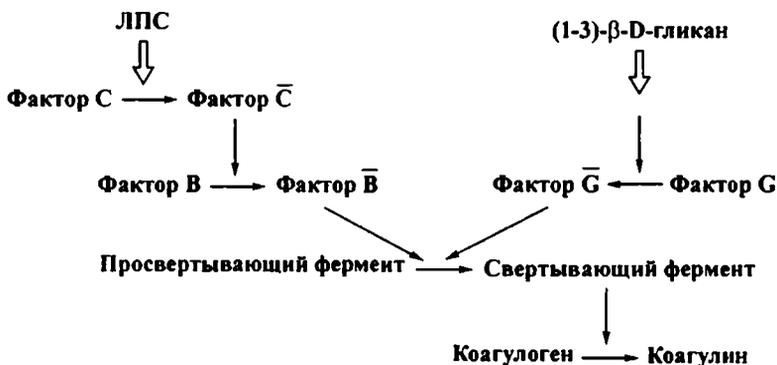


Рис. 26. Коагуляционный каскад плазмы гемолимфы мечехвостов (по: Iwanaga, 1993).

Обращает на себя внимание отсутствие среди инициирующих каскад патогенных молекул компонентов стенок грамположительных бактерий. Либо эта группа микроорганизмов малочисленна в экологической нише мечехвостов, либо существуют другие механизмы распознавания грамположительных бактерий. Действительно, в гемолимфе и гемоцитах мечехвостов присутствуют лектины (Kawabata, Iwanaga, 1999). Не исключено, что дефенсины, тахиплезины и полифемузины выполняют как функцию распознавания грамположительных бактерий, так и одновременно их инактивации (Кокряков, 1999). Следует отметить, что как коагулоген, так и коагулин являются катионными цистинсодержащими молекулами. Восемь дисульфидных связей стабилизируют третичную структуру коагулина. Представляет интерес рассмотрение отдельных компонентов коагуляционного каскада, поскольку их структурно-функциональные свойства отражают один из древнейших этапов формирования иммунных механизмов врожденного типа.

При сравнительном анализе структурных и функциональных свойств ряда компонентов системы врожденного иммунитета мечехвостов и млекопитающих обращает на себя внимание их заметная гомология столь необычная для видов животных, удаленных в своем развитии от позвоночных сотнями миллионов лет. Ряд белков системы врожденного иммунитета мечехвостов отсутствуют даже у эволюционно более близких млекопитающим иглокожих и оболочников. Причины такого необычного мозаичного по выражению в фенотипе сходства между защитными системами самой древней группы членистоногих — мечехвостов и млекопитающих — остаются невыясненными.

Роль лектинов как паттернраспознающих молекул в иммунитете японского подковообразного краба *T. tridentatus* доказана систе-

матическими многолетними исследованиями (Kawabata, Iwanaga, 1999). Лектины являются важной и необходимой составляющей набора рекогносцировочных рецепторов (молекул), обеспечивающих неотложное и эффективное распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов, которое осуществляется на основе идентификации природы углеводных компонентов клеточной поверхности микроорганизмов.

Исходно белки лектиновой природы локализованы в гранулярном аппарате гемоцитов *T. tridentatus* (Toh et al., 1991). Известны две основные популяции гранул: большие (large — L) и малые (small — S) (Kawabata, Iwanaga, 1999). В гранулах локализованы молекулярные факторы, имеющие прямое отношение к реализации иммунных и гемостатических реакций организма, которые у этой группы реликтовых животных тесно сопряжены. Это коагулоген, зимогены сериновых протеаз и их ингибиторы, лектины и набор антимикробных пептидов (тахиплезины, дефенсины) (Iwanaga et al., 1998). Гемоциты являются клетками, чрезвычайно чувствительными к бактериальным липополисахаридам, которые дегранулируют в ответ на взаимодействие с эндотоксинами. В результате экзоцитоза содержимого гранул в гемолимфе мечехвоста происходит локальная коагуляция плазмы, приводящая к иммобилизации патогенного фактора в сгустке и его дальнейшей нейтрализации и элиминации выделившимися веществами. В плазме гемолимфы предсуществуют также С-реактивный белок (Robey, Liu, 1981), известный под названием лимулина,  $\alpha$ -2-макроглобулин (Quigley, Armstrong, 1983), гемагглютинины, участвующие в той или иной степени в формировании врожденного иммунитета у мечехвостов.

Лектины *T. tridentatus* известны как тахилектины, четыре представителя которых (тахилектины 1—4) имеют исходную локализацию в гемоцитах, а один (тахилектин-5) — в плазме гемолимфы (Kawabata, Iwanaga, 1999).

Тахилектин-1 (L-6) связывается избирательно с липополисахаридами, иммобилизованными на агарозе (Saito et al., 1995). Он является доминирующим по содержанию среди лектинов гемоцитарной локализации. Лектин не обладает гемагглютинирующей активностью и взаимодействует, по-видимому, с  $\alpha$ -коровой частью эндотоксинов, а именно с дисахаридом 2-кето-3-дезоксиктонолатом (КДО) и липидом А (рис. 5). Он проявляет антимикробную активность против грамотрицательной бактерии *E. coli*, но не против грамположительных бактерий. L-6 заметно агглютинирует грамотрицательные бактерии и в меньшей степени стафилококки. Изoeлектрическая точка (pI) белка в соответствии с расчетами составляет 9.69, его молекулярная масса равна 24.3 кДа, белок содержит три дисульфидные связи и одну свободную тиольную группу цистеина. В состав молекулы L-6

входят 11 остатков аминокислоты лизина, 10 — аргинина и 6 — гистидина, а также 14 остатков аспарагина и 2 — глутамина. Необычным структурным свойством тахилектина-1 является периодичность его аминокислотной последовательности, заключающаяся в шести относительно гомологичных (32—60 % гомологии) блоках из 33—38 аминокислот. Белок имеет структуру шести-лопастного  $\beta$ -пропеллера, как это было установлено при кристаллографическом исследовании. Недавно гомологи тахилектина-1 с неизвестной функцией выявлены у миксомицета *Physarum polycephalum*. Это тектонин I и II, состоящие из 217 и 353 аминокислот соответственно (Nuh et al., 1998). Есть основания предполагать, что плазмодимальная фаза гриба, питающегося бактериями и детритом, использует эти белки для распознавания объектов фагоцитоза.

Тахилектин-2 (L-10), так же как и тахилектин-1, локализован в больших гранулах гемоцитов животного. Он обладает гемагглютинирующей активностью против эритроцитов крови человека группы А. Он, по-видимому, распознает на них поверхностный антиген D-N-ацетил-глюкозамин, при этом кальций не требуется для рассматриваемой реакции. Белок агглютинирует также *Staphylococcus saprophyticus*. Этот стафилококк в составе липотейхоевой кислоты содержит альфа (1—2) присоединенный остаток D-N-ацетил-глюкозамина (Ruhland, Fiedler, 1990), который и является лигандом тахилектина-2. Он может также взаимодействовать с D-N-ацетил-глюкозамином в составе липополисахаридов. Тахилектин-2 имеет молекулярную массу 26.6 кДа, не содержит цистеинов и состоит из пяти блоков по 47 аминокислот с различной степенью гомологии. Белок не имеет гомологов среди известных протеинов при анализе по банку данных.

Тахилектин-3 является ЛПС-связывающим лектином и агглютинирует эритроциты человека группы А (Inamori et al., 1999). Тахилектин-4 агглютинирует эритроциты человека групп А, В и О. Это лектин С-типа, он является олигомерным гликопротеином с молекулярной массой около 470 кДа, состоящий из 15—16 субъединиц. Тахилектин-4 имеет 24%-ную гомологию с  $\text{NH}_2$ -терминальным доменом пентраксина *Xenopus laevis* (Seery et al., 1993), а участок молекулы от 120-го пролина до 159-го лизина гомологичен одной из областей пентраксина 1 на 50 %.

Тахилектин-5 является плазменным лектином С-типа. Он обладает гемагглютинирующей активностью в отношении эритроцитов человека А, В и О групп крови. Он агглютинирует также широкий круг грамположительных и грамотрицательных бактерий. Его локализация свидетельствует о несомненном участии в защитных реакциях против инфекции. Тахилектин-5 проявляет повышенное сродство к ацетилированным углеводным остаткам.

Таким образом, лектиновая система мечехвоста *T. tridentatus* включает в себя несколько белков как с узкой, так и широкой специфичностью распознавания углеводов. Их мишенью являются компоненты поверхностных структур потенциально патогенных микроорганизмов, своевременная детекция и последующая инактивация которых и составляют основу врожденного иммунитета. Лектины функционируют синергично с набором антибиотических пептидов гранул и обеспечивают эффективную защиту мечехвостов от микробной агрессии. Не исключено, что это явилось одной из причин сохранения и выживания этой реликтовой группы животных на протяжении более пяти-сот млн лет.

## 4. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МЕХАНИЗМОВ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА

### 4. 1. Антимикробные пептиды в регуляции иммунных реакций организма

Как в ранний период исследований антимикробных пептидов, так и в настоящее время накапливаются данные, свидетельствующие о том, что антибиотической активностью не ограничивается функциональный потенциал этих соединений.

Лизосомные катионные белки, большую часть которых составляли дефенсины, проявляли в условиях *in vitro* и *in vivo* свойства факторов проницаемости микрососудов и дегрануляторов тучных клеток (Ranadive, Cochrane, 1968).

Благодаря основным свойствам молекулы антимикробных пептидов обладают опсонизирующей микробы активностью, способствующей протеканию фагоцитарного процесса на его инициальных стадиях (Fleischmann et al., 1985). В исследованиях с дефенсинами и некоторыми кателицидинами продемонстрирована хемотаксическая активность дефенсинов HNP1-3 (Territo et al., 1989), HBD3 и 4 (Garcia et al., 2001b) и кателицидина LL-37 для моноцитов/макрофагов и нейтрофилов (Yang et al., 2000a) HNP1-2, HBD1-2 для незрелых дендритных клеток и Т-лимфоцитов (Chertov et al., 1996; Yang et al., 1999; Viragyn et al., 2001). Следует подчеркнуть, что хемотаксические свойства дефенсины и кателицидин человека LL-37 проявляют в наномолярных концентрациях, которые на 2—3 порядка меньше их микробоцидных доз. Современный этап исследований неантимикробных свойств дефенсинов, протегринов, LL-37 и других пептидов связан с анализом и изучением их воздействия на механизмы приобретенного иммунитета.

Первые сведения о модулирующей антителогенез активности дефенсинов кролика были получены еще в начале 90-х гг. в нашей лаборатории (Шамова и др., 1993). В этой работе было установлено, что дефенсины кролика и крысы в физиологической концентрации отменяют стрессиндуцированную иммуносупрессию у животных (рис. 27). Причем уже тогда мы обратили внимание на то, что в контрольных вариантах опыта наблюдалась тен-

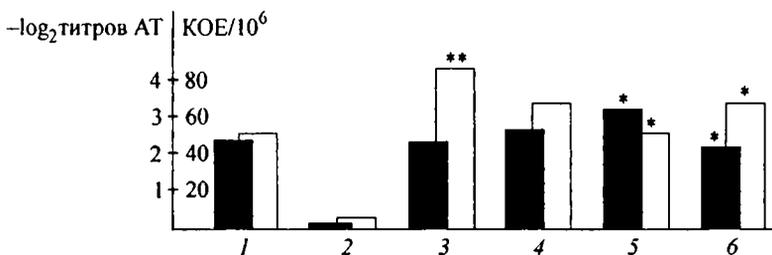


Рис. 27. Отмена стрессиндуцированной иммуносупрессии у мышей фракцией суммарных дефенсинов кролика.

1 – иммунизированные эритроцитами барана животные, неподвергнутые стрессу; 2 – животные, подвергнутые комбинированному стрессу перед иммунизацией; 3 – нестрессированные животные, получавшие дефенсины в дозе 20 мкг/г веса перед иммунизацией; 4 – нестрессированные животные, получавшие дефенсины в дозе 2 мкг/г веса перед иммунизацией; 5 – животные, подвергнутые комбинированному стрессу до иммунизации, которым инъецировали дефенсины в дозе 20 мкг/г веса за 10 мин до стрессорного воздействия; 6 – животные, подвергнутые комбинированному стрессу до иммунизации, которым инъецировали дефенсины в дозе 2 мкг/г веса за 10 мин до стрессорного воздействия. *Заштрихованные столбики* показывают отрицательный логарифм титров антител к эритроцитам барана ( $-\log_2$  титров АТ). *Незаштрихованные столбики* означают количество антиген-специфических колониеобразующих единиц на 10<sup>6</sup> клеток селезенки. \* – достоверность различий сравнимых параметров с группой 2 ( $p < 0.05$ ); \*\* – достоверность различий сравнимых параметров с группой 1 ( $p < 0.02$ )

денция к увеличению титра антител к эритроцитам барана при иммунизации нестрессированных мышей на фоне предварительного введения дефенсинов. Объяснение этому феномену мы связывали с кортикостатической активностью некоторых изоформ дефенсинов. Как известно, впервые кортикостатическая активность дефенсинов была выявлена канадскими исследователями при изучении влияния пептидов кролика на глюкокортикоидпродуцирующую активность клеток коркового слоя надпочечников крысы в культуральных условиях (Zhu et al., 1987, 1988). Ими было показано, что дефенсины по рецепторопосредованному механизму конкурентно взаимодействуют с рецептором аденокортикотропного гормона. При этом наблюдается подавление АКГГ-индуцированного (но не базального) стероидогенеза в клетках коркового слоя надпочечников (Zhu et al., 1989). В нашей работе (Шамова и др., 1993) кортикостатическая активность некоторых изоформ дефенсинов кролика была продемонстрирована на моделях АКГГ- и стрессиндуцированной глюкокортикоидной реакции у мышей и крыс. Впоследствии мы показали (Шамова, 1995; Кокряков, 1999; Korneva, Kokryakov, 2003), что среди шести изоформ дефенсинов кролика наиболее активными на уровне орга-

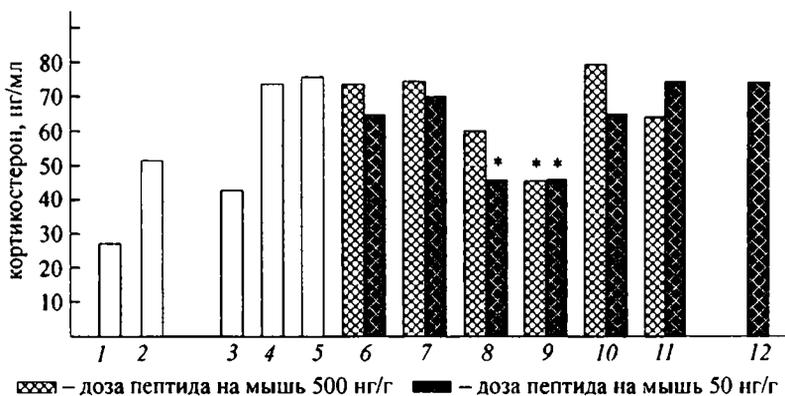


Рис. 28. Кортикостатическое действие индивидуальных фракций дефензинов кролика на АКТГ-индуцированную продукцию кортикостерона у мышей.

1 – интактные животные; 2 – контрольные животные, которым инъецировали физиологический раствор; 3 – контрольные животные, которым инъецировали дефенсин NP-1 кролика в дозе 500 нг/г веса; 4 – животные, которым инъецировали АКТГ в концентрации 0,02 МЕ/г веса; 5 – животные, которым инъецировали физиологический раствор за 30 мин до инъекции АКТГ; 6 – животные, которым инъецировали NP-1 дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 7 – животные, которым инъецировали NP-2 дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 8 – животные, которым инъецировали NP-3a дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 9 – животные, которым инъецировали NP-3b дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 10 – животные, которым инъецировали NP-4 дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 11 – животные, которым инъецировали NP-5 дефенсин за 30 мин до введения АКТГ; 12 – животные, которым инъецировали протамина сульфат (клубсин) за 30 мин до введения АКТГ; \* – достоверность различий сравниваемых параметров ( $p < 0.05$ ) по сравнению с группами 4 и 5.

низма оказались фракции NP-3a и NP-3b (рис. 28), известные как наиболее сильные кортикостатины в условиях *in vitro* (Zhu et al., 1989). Именно со способностью некоторых фракций дефензинов кролика подавлять АКТГ- и стрессиндуцированный стероидогенез мы в первую очередь связываем иммунопротективную активность этих пептидов. Ибо снижение уровня кортикостерона в крови и, как следствие, в лимфоидных тканях создает предпосылки для реализации полноценного гуморального иммунного ответа, оцениваемого по выработке антител на антигены эритроцитов барана. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о противовоспалительном и иммуносупрессирующем действии глюкокортикоидов не только в фармакологических дозах, но и при концентрации гормонов, наблюдаемой при стрессе и инфицировании (Корнева, Шхинек, 1988; Webster et al., 2002). Есть основания считать, что иммунодепрессия, индуцируемая глюкокортикоидами, физиологически оправдана, поскольку страхует организм в условиях предъявления ему множества чужеродных

и собственных антигенов от иммунного реагирования на последнее. Если подавление антителообразования носит транзиторный характер, это не опасно. Но в случае длительного или интенсивного воздействия стрессующего фактора стойкая гиперфункция надпочечников приводит к наводнению организма глюкокортикоидами и формированию хронической иммуносупрессии, создающей благоприятный фон для активизации условно-патогенных микроорганизмов и онкогенеза. Именно для коррекции таких состояний могут быть рекомендованы дефенсины, обладающие кортикостатической активностью, и другие антимикробные пептиды с целью преодоления сниженной резистентности к оппортунистической инфекции в условиях тяжелого (severe) стресса (Korneva, Kokryakov, 2003).

Наряду с рассмотренным выше механизмом воздействия антибиотических пептидов как молекулярных факторов врожденного иммунитета на иммунные реакции приобретенного типа, в работах американской группы ученых под руководством профессора Ю. Оппенхейма с середины 90-х гг. развивается и экспериментально обосновывается другой вариант участия дефенсинов в рассматриваемом взаимодействии двух блоков иммунитета. Этими исследователями было установлено, что стимулированные ИЛ-8 нейтрофилы человека секретируют дефенсины HNP1 и HNP2, которые являются хемоаттрактантами для Т-лимфоцитов (Chertov et al., 1996). Далее было показано, что  $\alpha$ -дефенсины в наномолярных концентрациях избирательно хемотаксичны для неактивированных (наивных) Т-лимфоцитов и незрелых (immature) дендритных клеток (Yang et al., 2000b), в то время как продуцируемый эпителиальными клетками индуцибельный  $\beta$ -дефенсин (hBD2) оказался хемотаксином для Т-клеток памяти (Yang et al., 1999). Хемотаксическая активность дефенсинов, подобно таковой хемокинов, подавлялась коклюшным (pertussis) токсином, что свидетельствовало о вовлечении в этот процесс G-белков, сопряженных с рецепторами (Baggiolini, 1998). Действительно, было установлено, что влияние hBD2 на незрелые дендритные клетки и Т-клетки памяти носит рецепторопосредованный характер и связано с рецептором хемокина MIP-3 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ ), известным как CCR6 (Yang et al., 1999). Уязвимым местом рассматриваемых построений было то обстоятельство, что в этих работах использовали дефенсины человека, а объектом исследования были клетки иммунной системы мыши.

Однако в 2001 г. этой группой авторов впервые было показано, что  $\beta$ -дефенсины мыши эпителиального происхождения (не криптины) mBD2 и mBD3 обладают хемотаксической активностью для незрелых дендритных клеток этого же вида животных, а также НЕК293-клеток, в которые был трансфицирован экспрессируемый ген рецептора CCR6 (Biragyn et al., 2001). Таким

образом, впервые было доказано, что CCR6 может функционировать как рецептор не только хемокина MIP-3 $\alpha$  (CCL20), но и  $\beta$ -дефенсинов эпителиального происхождения. Следовательно, в организме мышей существует система механизмов вовлечения в иммунные реакции дендритных клеток и моноцитов/макрофагов как основных антигенпредставляющих клеток, опосредованная эндогенными дефенсинами. Значимость такого звена иммунного реагирования была установлена и в экспериментах на животных. Так, интраназальная иммунизация мышей овальбумином в смеси с дефенсинами человека HNP1-3 выявила адьювантную активность у антимикробных пептидов. Уровень специфических IgG в плазме крови у таких животных был выше, чем у особей, иммунизированных чистым антигеном (Lillard et al., 1999). Кроме того, CD<sup>4+</sup>T-лимфоциты, выделенные из этих животных, продуцировали в ответ на взаимодействие с овальбумином *in vitro* больше ИФН $\alpha$ , ИЛ-5, ИЛ-6 и ИЛ-10, что свидетельствовало об усилении функциональной активности Т-хелперов по антиген-специфическому механизму. Адьювантная активность HNP1-3 была продемонстрирована также при внутрибрюшинной иммунизации мышей KLH (keyhole limpet hemocyanin) антигеном или идиотипическим антигеном В-лимфомы. В обоих случаях наблюдали более высокий титр специфических IgG к этим антигенам при условии их совместного парентерального введения с дефенсинами человека (Tani et al., 2000). Более того, мыши, иммунизированные опухолевым антигеном в смеси с IgG, проявляли заметную резистентность к развитию лимфомы, инициированной внутрибрюшинным введением трансформированных клеток.

Авторы связывают наблюдаемое в условиях их экспериментов повышение иммуногенности антигенов со способностью одновременно вводимых дефенсинов мобилизовывать дендритные клетки и моноциты/макрофаги, которые обеспечивают более эффективное поглощение, процессинг и представление антигенов Т-лимфоцитам. В этом, по их мнению, заключается одна из возможных функций дефенсинов, направленная на формирование иммунного ответа приобретенного типа. Как показано в исследованиях этих авторов, дефенсины способствуют созреванию незрелых дендритных клеток в месте их встречи с антигеном или его носителем (Yang et al., 2002). Дифференцировка дендритных клеток в иммунокомпетентные антигенпредставляющие клетки является одним из необходимых условий, обеспечивающих их выход в ближайший лимфатический узел, где и осуществляются межклеточные взаимодействия, определяющие направленность и интенсивность иммунного ответа приобретенного (адаптивного) типа.

Дополнительным подтверждением рассматриваемых представлений об иммуномодулирующей активности дефенсинов яв-

ляются эксперименты с генно-инженерными ДНК-вакцинами, разрабатываемыми с целью противоопухолевой терапии (Biragun et al., 1999, 2001). Как известно, проблемы иммунотерапии опухолевых заболеваний часто связаны с низкой иммуногенностью опухолевых антигенов в силу их незначительных структурных отличий от нормальных антигенов, к которым в организме человека и позвоночных животных вырабатывается естественная толерантность. Одним из подходов, разрабатываемых современной иммунологией, направленным на повышение иммуногенности опухолевых антигенов, является способ генно-инженерного создания химерных генетических структур, включающих в свой состав ДНК гена опухолевого антигена и ДНК гена белка (лептида) — адьюванта, которые в случае их полноценной экспрессии в организме могли бы обеспечивать формирование протективного противоопухолевого иммунитета.

Оптимальное распознавание собственных опухолевых антигенов возможно при условии активации системы врожденного иммунитета сигналами опасности (danger signal) (Matzinger, 1994, 1998) через рецепторы, распознающие патогенассоциированные молекулярные паттерны (Janeway, 1989, 1992; Medzhitov, Janeway, 1997). При этом наблюдается усиление продукции антигенпредставляющими клетками провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ФНО $\alpha$ ), которые в свою очередь индуцируют в клетках иммунной системы синтез костимуляторных молекул CD40, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) и продукцию дополнительных медиаторов воспаления, включая хемокины. Хемокины разделяют на гомеостатические (конститутивно-синтезируемые) и воспалительные, синтез которых носит индуцибельный характер (Moser, Loetscher, 2001). Воспалительные хемокины экспрессируются во время инфекции или тканевой деструкции, осуществляемой резидентными и мигрирующими (инфильтративными) лейкоцитами. Гомеостатические цитокины продуцируются непрерывно (конститутивно) в определенных клеточно-тканевых образованиях, обеспечивая движение и распределение клеток иммунной системы в физиологических условиях. Миграция клеток иммунной системы регулируется как цитокинами, с одной стороны, так и дифференциальной экспрессией рецепторов к ним — с другой. Например, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 экспрессируются преимущественно на незрелых дендритных клетках, CCR6 — на CD1 $^+$  $\alpha$  клетках Лангерганса. В процессе созревания дендритных клеток рассматриваемые рецепторы исчезают, а на их месте появляется рецептор CCR7, который обеспечивает возможность реагирования клеток на хемокины, привлекающие их в лимфоузлы. Недавно было установлено, что  $\beta$ -дефенсин 2 (HBD2) может быть лигандом рецептора CCR6 (Yang et al., 1999) на незрелых дендритных клетках и Т-клетках памяти, что определяет хемотак-

сическую активность дефенсина в отношении рассматриваемых клеток. Дефенсины усиливают продукцию цитокинов на стадии процессинга проинтерлейкина-1 и хемокинов (Perregaux et al., 2002), секрецию гистамина из тучных клеток (Yamashita, Saito, 1989), обладают адьювантной активностью при интраназальной иммунизации мышей овальбумином (Lillard et al., 1999).

Рассматриваемые свойства  $\alpha$ - и  $\beta$ -дефенсинов послужили основанием для использования пептидов с целью формирования у экспериментальных животных противоопухолевого иммунитета. С помощью  $\beta$ -дефенсинов и MIP-3 $\alpha$  (хемокин) исходно неиммуногенные опухолевые антигены трансформировали в иммуногенные и индуцировали у животных протективный противоопухолевый иммунитет.

Реализуя подобный подход, американские исследователи создали ДНК-вакцину, в составе которой были объединены гены опухолевых идиотипических эпитопов В-лимфом (sFv20 лимфомы A20 или sFv38 лимфомы 38C13) и  $\beta$ -дефенсинов мыши (mBD2 и mBD3) или провоспалительного хемокина MIP-3 $\alpha$ . Этой ДНК-вакциной в форме плазмиды они иммунизировали мышей, а потом оценивали у них иммунный ответ к опухолевым антигенам по ряду параметров (Viragyn et al., 2001). Показано, что ДНК-вакцина, включающая гены рекомбинантного белка-химеры, способствует формированию гуморального и клеточного иммунного ответа на исходно неиммуногенные компоненты-идиотипы sFv-лимфом мыши. Животные продуцировали антитела к идиотипам sFv20 и sFv38 только в тех вариантах, когда в составе плазмид ДНК-вакцин рекомбинантного гена были гены  $\beta$ -дефенсина 2 (mBD2) или MIP-3 $\alpha$  (macrophage-inflammatory protein-3 $\alpha$ ), ответственные за синтез известных лигандов рецептора CCR6 незрелых дендритных клеток. Более того, у таких мышей развивался протективный противоопухолевый иммунитет к очень агрессивной перевиваемой лимфоме 38C13, которая приводила к гибели всех контрольных мышей в течение 20 дней после инокуляции опухолевых клеток в организм.

Продемонстрировано, что защитный эффект вакцины связан как с трансформацией антигена лимфомы sFv38 в иммуногенный, на который вырабатываются антитела, так и с формированием популяции антигенспецифических активных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Авторы привели экспериментальные доказательства того, что адьювантная активность конъюгированного с исходно неиммуногенным антигеном (sFv38) лимфомы  $\beta$ -дефенсина 2 мышам связана со способностью антибиотического пептида имитировать хемотаксическую активность хемокина MIP-3 $\alpha$  в отношении незрелых дендритных клеток, которые после дифференцировки в зрелые и последующей миграции в лимфоузлы становятся ключевыми антигенпредставляющими клетками, определяющими в

значительной степени формирование иммунных реакций приобретенного типа (выработка специфических антител и цитотоксических Т-лимфоцитов). Они пришли к выводу, что сопряженная экспрессия дефенсинового гена mBD-2 с геном идиотипического антигена В-лимфомы является необходимым условием формирования протективного иммунного ответа на опухолевые клетки. Необходимо подчеркнуть, что использование в контрольных вариантах ДНК-вакцины, в которой гены опухолевого антигена и  $\beta$ -дефенсина мыши находились не в слитном состоянии, не приводило к позитивному результату. Этот факт находится в некотором противоречии с ранее изложенными результатами по иммунизации животных овальбумином, KLH и идиотипическим антигеном в присутствии дефенсинов человека, ковалентно не связанными с перечисленными антигенами. Следует, однако, подчеркнуть, что в этих опытах использовали гетерологичные для мышей дефенсины человека.

Как бы то ни было, иммуностимулирующее действие дефенсинов в рассматриваемых опытах связывается авторами преимущественно с их хемотаксической для незрелых дендритных клеток активностью (Yang et al., 2002). Однако есть основания полагать, что это не единственный механизм рассматриваемого эффекта. В частности, дефенсины человека HNP1-3 индуцируют продукцию ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  макрофагами в культуре клеток (Chaly et al., 2000). Этот процесс может осуществляться путем ускорения превращения про-ИЛ-1 $\beta$  в зрелую секретируемую клетками форму ИЛ-1 $\beta$  (Perregeaux et al., 2002). Наряду с этим провоспалительные цитокины способствуют созреванию незрелых дендритных клеток, а также обладают мощной лимфоцит-активирующей активностью, что усиливает реакции организма на антигены. ИЛ-1 $\beta$  рассматривается в настоящее время в качестве одного из эндогенных адьювантов, который способствует разворачиванию гуморального иммунного ответа на антигены (Staats, Ennis, 1999). Дефенсины облегчают рекрутирование в инфицированные ткани Т-клеток памяти, что, по-видимому, может быть одним из дополнительных факторов, укорачивающих время повторного иммунного ответа на тот же антиген (Chertov et al., 1996). Кроме того,  $\beta$ -дефенсины человека активируют продукцию хемокина ИЛ-8 эпителием дыхательных путей *in vitro* (van Wetering et al., 1997). ИЛ-8 является хемотаксическим фактором, специализированным на привлечении нейтрофилов. Таким образом, между дефенсинами и провоспалительными цитокинами (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8) существуют связи, определяющие их взаимоусиливающий синтез. Известно, что ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в различных модельных системах индуцируют синтез и секрецию дефенсинов (hBD-2, hBD-3) эпителиями (рис. 29).

Все эти факты в своей совокупности свидетельствуют о новом аспекте в анализе функциональных свойств дефенсинов, даю-

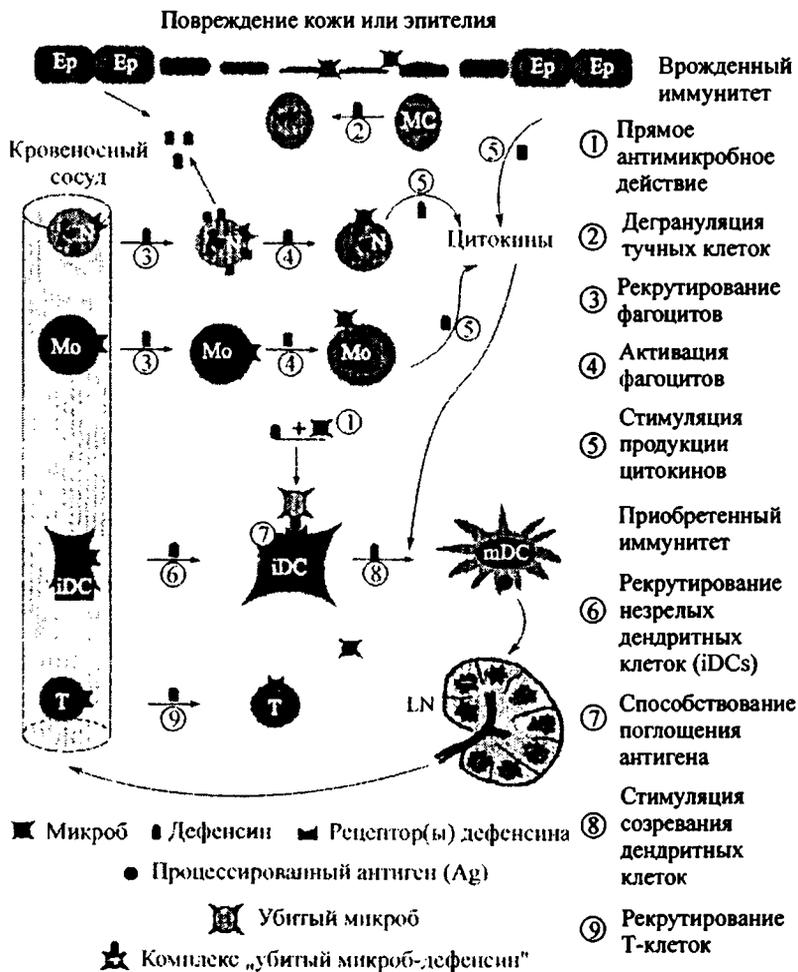


Рис. 29. Роль дефенсинов во взаимодействии врожденного и приобретенного иммунитета.

шем основание расценивать эти пептиды не только как микробоцидные соединения, но и как регуляторные молекулы иммунной системы животных, воздействующие на клетки-мишени по рецептор-опосредованному механизму (Yang et al., 2002; Korneva, Kokryakov, 2003) (рис. 30).

В связи с возможными рецептор-опосредованными эффектами дефенсинов представляют интерес данные об активирующем воздействии дефенсинов с кортикостатической активностью на кальциевые каналы L-типа (MacLeod et al., 1991), а также



Регуляторы активности  
медленных  $\text{Na}^+$  каналов

Активаторы  $\text{Ca}^{2+}$  каналов

Ингибиторы  $\text{K}^+$  каналов

Соединения, избирательно  
связывающиеся с серпинами

Комитогенная активность

Иммунопротективная активность

**Кортикостатическая активность**

**Хемотаксичная активность**

Либераторы тучных клеток

Факторы, увеличивающие  
проницаемость сосудов

Ингибиторы ферментативного  
и неферментативного фибринолиза

Ингибиторы протеинкиназы С

Опсонизирующая активность

Микробоцидная активность

**Цитотоксическая активность**



Рис. 30. Пирамида функциональной активности дефенсинов.

Показаны эффекты, проявляемые дефенсинами при различных концентрациях пептидов, которые увеличиваются в направлении от вершины к основанию пирамиды.

об их способности модулировать потенциалочувствительность медленных натриевых каналов. В серии работ отечественных физиологов, выполненных под руководством академика РАН А. Д. Ноздрачева, с помощью метода локальной фиксации потенциала изучено влияние дефенсинов кролика NP-1, NP-3a и NP-4 на мембрану нейронов спинальных ганглиев крыс (Ноздрачев и др., 1997; Плахова и др., 2000; Плахова и др., 2005). Дефенсины снижали эффективный заряд активационной воротной системы медленных (тетродотоксиннечувствительных) натриевых каналов. Этот процесс монотонным образом зависел от концентрации исследованных дефенсинов. Применение уравнения Хилла позволило установить, что величина  $K_d$  в случае взаимодействия дефенсина NP-1 с предполагаемым мембранным рецептором составляла величину  $2 \times 10^{-12}$  моль/л и в варианте NP-4 —  $8 \times 10^{-8}$  моль/л, а коэффициент Хилла был равен 0.9 и 1.0 соответственно. Было высказано, в частности, предположение о вовлечении рецепторов серотонина в анализируемый процесс, поскольку известно о существовании взаимосвязи медленных натриевых каналов мембраны сенсорного нейрона с рецепторами серотонина. Снижение возбудимости мембраны сенсорного нейрона, установленное в этих работах, может приводить к анальгетическому состоянию в условиях выработки дефенсинов на уровне структур нервной системы при стрессе и может рассматриваться в качестве одного из механизмов стресс-индуцированной опиоиднезависимой анальгезии.

Обнаружение дефенсина NP-3a в гипофизе, гипоталамусе и таламусе (Tomimaga et al., 1992; Hu et al., 1993) кролика является однозначно установленным фактом. Вопрос о присутствии в структурах нервной системы дефенсинов NP-1 и NP-4 остается открытым. Все эти данные позволяют высказать предположение, что дефенсины в нецитотоксических концентрациях (нМ, пМ) могут выступать в качестве агонистов, модулирующих передачу паттерна импульсов в центральной нервной системе, благодаря изменению потенциалочувствительных медленных натриевых каналов.

Не только дефенсины и кателицидин человека LL-37 обладают иммуномодулирующей активностью. В связи с регуляцией иммунного ответа представляют интерес данные о пептиде PR39 (основной, богатый пролином и аргинином пептид), который был впервые выделен из слизистой тонкого кишечника свиней (Agerberth et al., 1991), а позже нами (Кокряков, 1995) и американской группой исследователей (Huang et al., 1997) из лейкоцитов крови этого же вида животных (рис. 17). Клонирование и изучение структуры гена рассматриваемого пептида (Storici, Zanetti, 1993; Gudmundsson et al., 1995) позволило отнести его к группе кателицидинов (Zanetti et al., 1995), для которых характерна сход-

ная N-концевая последовательность аминокислот, гомологичная ингибитору катепсина L (кателину), и C-концевая часть молекулы, представляющая в данном случае пептид из 39 аминокислот, обладающий мощным антибактериальным и противогрибковым действием (Кокряков, 1995).

Кроме антимикробной активности широкого спектра действия, PR39 ингибирует НАДФН-оксидазную систему фагоцитов (Shi et al., 1996), индуцирует синтез синдеканов (Gallo et al., 1994), что, в частности, объясняет роль пептида как одного из регуляторов ангиогенеза *in vivo* (Li et al., 2000), а также обладает хемотаксической активностью в отношении нейтрофилов (Huang et al., 1997). Рассматриваемый пептид может избирательно связываться с белком р300 (Cas) (Chan, Gallo, 1998) и  $\alpha 7$ -субъединицей протеасомного комплекса клеток млекопитающих (Gao et al., 2000). В последней работе установлено, что антибактериальный пептид PR39 из лейкоцитов свиньи обратимо связывается с  $\alpha 7$ -субъединицей 26S протеасом, блокируя при этом деградацию ингибитора транскрипционного фактора NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B $\alpha$ ) по убиквитин-протеасомному пути. Причем фосфорилирование и убиквитилирование I $\kappa$ B $\alpha$  происходят нормально, как и последующее связывание модифицированного белка с валозинсодержащими белками. Подавление процесса протеолиза I $\kappa$ B $\alpha$  в протеасомах отменяет по еще неясному механизму активацию и транслокацию NF $\kappa$ B в ядро, следствием чего является неактивное состояние генов, ответственных за иммунное реагирование и синтез провоспалительных цитокинов и адгезионных факторов. Отмена экспрессии генов, активируемых NF $\kappa$ B, под воздействием пептида PR39 наблюдали как в культуре клеток HUVEC, так и, что особенно важно, на моделях острого панкреатита и инфаркта миокарда у мышей. Инфузия пептида PR39 в организм животных приводит к значительному уменьшению размеров повреждения их сердечной мышцы при экспериментальном инфаркте. Представленные данные позволяют рассматривать PR39 и родственные ему пептиды в качестве эффективных профилактически-терапевтических средств для предупреждения и ограничения повреждений, сопряженных с воспалительными процессами в органах. Выявленный противовоспалительный эффект пептида PR39, связанный с регуляцией протеолиза I $\kappa$ B $\alpha$  и косвенно генов иммунного реагирования, дополняет ранее установленное функциональное свойство пептида ингибировать НАДФН-оксидазную систему (Shi et al., 1996).

Дефенсины, пептид LL-37 и родственные им соединения фагоцитов и барьерных систем у животных и человека, благодаря особенностям структуры, выступают эффективными антимикробными агентами, в значительной степени определяющими завершенность фагоцитоза и обеспечивающими инактивацию

микроорганизмов на уровне клеточно-тканевых образований, пограничных к инфекции (входные ворота инфекции). Наряду с этой активностью дефенсины, как установлено в результате многочисленных исследований, могут проявлять и другие функциональные свойства, важные в реализации защитно-приспособительных реакций организма как при инфекции, так и воздействии других неблагоприятных факторов окружающей среды.

В силу электрохимических свойств молекул дефенсинов и родственных им соединений, являющихся положительно заряженными, они эффективно сорбируются на поверхности бактериальных и эукариотических клеток. В результате этого взаимодействия наблюдается снижение отрицательного заряда клеток, в том числе и микробных. Это облегчает фагоцитоз последних нейтрофилами и моноцитами/макрофагами. Подобные наблюдения послужили основанием рассматривать дефенсины в качестве опсонизирующих микроорганизмы соединений (Fleischmann et al., 1985) при фагоцитозе и воспалении наряду с производными комплемента.

Таким образом, в очагах воспаления дефенсины могут подавлять жизнеспособность микроорганизмов и проявлять свойства молекул, обладающих хемотаксической, опсонизирующей и адьювантной активностью. Если принять во внимание данные о способности дефенсинов дегранулировать тучные клетки (Yamashita, Saito, 1989) и повышать проницаемость сосудов микроциркуляторного русла (Ranadive, Cochrane, 1968), то становится очевидным, что эти полипептиды способны влиять на течение фагоцитарного и воспалительных процессов, выступая в роли регуляторных молекул.

Антимикробные пептиды могут являться модуляторами воспалительных реакций организма при инфекции и, в частности при сепсисе. Сепсис характеризуется присутствием микроорганизмов и их токсинов в крови. Симптоматика сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями, в значительной степени определяется липополисахаридами (эндотоксинами) наружной мембраны микроорганизмов. Известно, что эндотоксины связываются в плазме с липополисахаридсвязывающим белком (ЛСБ), который способен переносить липополисахарид к поверхностной молекуле белка CD14, локализованного в плазмалемме моноцитов и макрофагов. Комплекс липополисахарида с CD14 белком иницирует через Толл-подобный рецептор 4 типа (ТЛР4) путь сигнальной трансдукции, завершающийся активацией NF $\kappa$ B транскрипционного регулятора (фактора), ответственного за регуляцию более, чем 150 генов, участвующих, в частности, и в иммунных реакциях (Underhill, Ozinsky, 2002). В результате наблюдается интенсивный синтез и секреция из макрофагов и эндотелиальных клеток провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6,

избыточная системная продукция которых приводит к гиперактивации клеток иммунной системы и эндотелия и проявляется в форме септического шока, который часто приводит к гибели пациентов. Известно, что катионные пептиды (дефенсины, протегрины, LL-37 и т. д.) и белки (лактоферрин, БПУ-белок) связывают липополисахариды, являющиеся амфипатическими полианионами, подавляя при этом способность последних активировать продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами. В лаборатории профессора Р. Хэнкока (Канада) было впервые продемонстрировано, что катионные пептиды (дефенсины человека HNP-1 и HBD2, индолицидин из лейкоцитов крупного рогатого скота, полифемузин и некоторые синтетические поликатионы) ингибируют процесс связывания ЛПС с ЛПС-связывающим белком и благодаря этому подавляют ЛПС-индуцированную продукцию TNF- $\alpha$  макрофагами (Scott et al., 2000).

Наряду с антиэндотоксической активностью дефенсины и другие антимикробные пептиды очагов воспаления могут выступать в качестве молекул с прокоагулирующей активностью по двум дополняющим друг друга механизмам. В нашей совместной работе с сотрудниками кафедры физиологии человека и животных Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова было изучено влияние общей фракции дефенсинов кролика на систему неферментативного фибринолиза крови крыс. Основным выводом этих исследований заключается в признании за дефенсинами умеренной прокоагулирующей активности (Кудряшов и др., 1989), заключающейся в связывании и нейтрализации гепарина крови — ведущего компонента системы неферментативного фибринолиза. Кроме того, зарубежными исследователями была продемонстрирована способность дефенсинов человека влиять ингибирующим образом и на каскад ферментативного фибринолиза крови. В частности, было показано, что дефенсины нейтрофилов человека ингибируют фибринолиз, запускаемый активатором плазминогена тканевого типа (Higazi et al., 1995, 1996). Также, по-видимому, действует и дефенсин человека, который конкурирует с плазминогеном за связывание с фибрином. Возможно, что антифибринолитическая активность дефенсинов в очагах воспаления служит фактором, препятствующим распространению инфекции благодаря иммобилизации бактерий в фибриновых сгустках.

Один из важных механизмов поддержания гемостаза связан с тромбоцитами и их физиологически активными соединениями. В связи с этим представляет важный интерес изучение взаимодействия дефенсинов и протегринов на функциональную активность и метаболизм тромбоцитов. Исследование в этом направлении осуществлено отечественными учеными (Ашмарин и др., 1993; Tkachenko et al., 1993; Ткаченко и др., 1994; Tkachenko et

al., 1994; Ткаченко и др., 1996). 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, в случае инфекционной патологии содержание дефенсинов человека в плазме крови может достигать одного или более мкг/мл (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 костномозгового депо значительного числа нейтрофилов.

Таким образом, сочетание в дефенсинах антимикробных и модулирующих отдельные стороны воспалительных и иммунных процессов 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., 1989).

На основании экспериментальных и литературных данных можно предположить, что функциональное значение нейтрофила при воспалении и стрессе не ограничивается 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 (Panyutich et al., 1991). При этом последние в роли гуморальных факторов могут проявлять свои кортикостатические и иммунопротективные свойства, обеспечивая взаимодействие иммунной и нейроэндокринной систем, направленное на формирование защитных реакций.

Таким образом, дефенсины и другие антимикробные пептиды являются не только физиологически активными веществами широкого спектра антимикробного действия, но и медиаторами отдельных реакций фагоцитарных, воспалительных и стрессорных процессов, т. е. выступают в роли регуляторных пептидов адаптогенного действия, что отражено на рис. 30.

#### **4. 2. Инструктирующая роль врожденного иммунитета в становлении некоторых реакций приобретенного иммунитета**

Распознавание антигенов, особенно белковой природы, осуществляется специфическими рецепторами В- и Т-лимфоцитов, разнообразие которых формируется благодаря механизмам генетической рекомбинации генных сегментов (V-, J-, D- для тяжелых цепей иммуноглобулинов; V-, J- для легких цепей иммуноглобулинов и для  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - цепей Т-клеточных рецепторов) и гипермутагенеза. Однако сам по себе акт детекции антигенов (антигенных детерминант, эпитопов) рецепторами В- или Т-лимфоцитов не определяет биологический источник антигена, его чужеродность и потенциальную патогенность. Бактериальные и собственные антигены белковой природы организма хозяина хорошо распознаются рецепторной системой В- и Т-лимфоцитов. Адаптивный (защитный, протективный) характер антителообразования и (или) формирования специфически реагирующего на антиген клона Т-лимфоцитов возможны только при условии реагирования на чужеродные антигены (ксеноантигены), носителями которых, в частности, являются микробные клетки, вирусы, трансформированные и вирусинфицированные клетки. Какие взаимодействия в иммунной системе человека определяют биологическую природу источника антигена и адекватную направленность иммунного ответа организма после его детекции? В последние годы накапливаются экспериментальные данные и клинические наблюдения, свидетельствующие о том, что система врожденного иммунитета формирует сигналы, инструктирующие систему приобретенного (адаптивного) иммунитета (Janeway, Medzhitov, 2002). Основным сигналом исходит от фагоцитирующих и антигенпрезентирующих клеток, которые одновременно представляют антиген и секретируют цитокины (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12) в ответ на распознавание патогенассоциированных молекулярных паттернов. Наряду с взаимодействием антигена с его рецептором, этот сигнал является необходимым для адекватного реагирования клеток системы приобретенного иммунитета на патогены. Например, Т-лимфоциты с помощью Т-клеточных рецепторов распознают антигены в комплексе с белками МНСII или МНСI, но на основе только лишь этого взаимодействия они не могут отличать «свое» от «несвоего», поэтому представление антигена само по себе еще недостаточно для активации Т-лимфоцитов. Для этого Т-лимфоциты должны получить второй костимулирующий сигнал. Таким сигналом могут быть, например, экспрессированные на поверхности антигенпредставляющих клеток (АПК) молекулы CD40, CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2), а также целый спектр секретируемых ими цитокинов. Распознавание представляемого Т-лимфоцитам антигена в

отсутствии CD80 или CD86 на поверхности антигенпредставляющих клеток приводит, как правило, либо к стойкой инактивации (анергии), либо к апоптозу Т-лимфоцитов. Таким образом, реактивный или толерантный ответ Т-клеток в ходе распознавания антигенов зависит от уровня экспрессии на поверхности АПК CD40, CD80- и CD86-молекул, который в свою очередь контролируется сигналами, исходящими от системы врожденного иммунитета. Когда Толл-подобные рецепторы АПК распознают ПАМП, клетки начинают экспрессировать CD80- и CD86-молекулы, т. е. их экспрессия происходит только в присутствии инфекционных (патогенных) агентов или продуцируемых ими соединений, которые детектируются ППП (рис. 9). Аутоантигены не распознаются рецепторами врожденной иммунной системы, а потому они не индуцируют экспрессию CD80- и CD86-молекул на поверхности АПК, а, следовательно, при возможном контакте дендритных клеток или В-лимфоцитов с Т-хелперами последние не активируются или даже вступают на путь апоптоза. Благодаря этому механизму организм не подвергается аутоиммунному поражению. После активации Т-хелперы осуществляют контроль за активностью других звеньев приобретенного иммунитета: цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и макрофагов. Таким образом, распознавание ПАМП, осуществляемое системой врожденного иммунитета, создает морфофизиологические предпосылки для формирования второго регулирующего сигнала, который при условии взаимодействия двух клеток, опосредованном рецепторами Т-лимфоцитов, является достаточным для активации последних. Таково одно из установленных в настоящее время межклеточных взаимодействий между системами врожденного и приобретенного иммунитета. При всей логичности рассматриваемой схемы, многое в ней еще остается неясным. Так, взаимодействие ПАМП с антигенпредставляющими клетками (кроме В-лимфоцитов) происходит вне периферических лимфоидных органов, в которых осуществляется представление антигена Т- и В-лимфоцитам. Встает вопрос о том, что направляет проактивированные на периферии АПК в ближайшие лимфоузлы, где они осуществляют представление антигена Т-лимфоцитам? Это только один из вопросов, которые возникают при анализе рассматриваемых взаимодействий.

Во взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета важную роль играет система комплемента. По мнению ряда специалистов, иммунный ответ приобретенного типа может быть адекватен (протективен) только при условии сопряженной активации некоторых механизмов врожденного иммунитета (Janeway, 1992, 2002; Fearon, Locksley, 1996). В последние годы эта идея получила экспериментальное обоснование. И это, в частности, связано с изучением ДНК-вакцин, которые в

перспективе, по-видимому, будут конкурировать в медицинской и ветеринарной практике белковыми с вакцинами. При исследовании модифицированных ковалентным связыванием с C3d-компонентом комплемента белковых антигенов было установлено, что последние становятся более иммуногенными по сравнению с неконъюгированными антигенами (Dempsey et al., 1996). Адьювантный эффект C3d объясняют тем, что для этого производного комплемента на В-лимфоцитах и фолликулярных дендритных клетках есть рецептор CR2 (CD21). На В-лимфоцитах CR2 (CD21) комплексируется с CD19 молекулой, что обеспечивает более эффективное связывание антигена в комплексе с C3d и активацию иммунокомпетентных клеток. CD21 на фолликулярных дендритных клетках способствует развитию и поддержанию В-лимфоцитов памяти. Если в составе ДНК-вакцины против гриппа наряду с гемагглютинином есть три копии C3d, то это заметно усиливает ее протективные свойства, что было установлено на экспериментальной модели у мышей (Ross et al., 2000). В молекулярно-генетических исследованиях на мышах показано, что дефицит рецепторов комплемента CD21 (CR2) и CD35 (CR1), а также C3- и C4-компонентов комплемента ведет к заметному снижению гуморального иммунного ответа к Т-зависимым антигенам (Ahearn et al., 1996; Fischer et al., 1996). Эти факты свидетельствуют о критической значимости системы комплемента и ее рецепторов в реализации некоторых иммунных реакций приобретенного типа, осуществляемых популяцией В1-лимфоцитов (Carroll, Prodeus, 1998). Активация комплемента естественными антителами (nIgM) (Muller-Eberhard, 1988), маннозосвязывающим лектином (Epstein et al., 1996) и С-реактивным белком (Szalai et al., 1997) приводит к генерации анафилатоксинов (C5a, C4a, C3a), сборке на поверхности микробной клетки или вириона мембраноатакующего комплекса и ковалентному связыванию производных C3-компонента комплемента (C3b, C3b, iC3d) с антигенами (Muller-Eberhard, 1988). Ковалентное связывание C3d с антигенами играет ключевую роль в инициации реакций приобретенного иммунитета, так как такие антигены эффективно распознаются CD19/CD21/ТАРА-1 комплексом В-лимфоцитов (Fearon, Carter, 1995), что является одним из необходимых условий для антителообразования. Важные в распознавании C3d-маркированных антигенов CR1(CD35) и CR2 (CD21) экспрессируются как на В-лимфоцитах, так и на фолликулярных дендритных клетках. Благодаря этим рецепторам система комплемента является медиаторной между врожденным и приобретенным иммунитетом. Увеличение копий C3d, связанных с антигеном (яичный лизоцим кур), до 3 снижает иммуногенную дозу белка в 1000 раз (Dempsey et al., 1996). Кроме того, выяснено, что мыши дефицитные по CD21(CR2) и CD35(CR1) имеют резко сниженное

количество CD5<sup>+</sup>V1-лимфоцитов, которые продуцируют естественные (нормальные) антитела IgM. Таким образом, система комплемента является фактором, регулирующим антителообразование, продукцию естественных антител IgM и формирование В-лимфоцитов памяти (Caroll, Prodeus, 1998). Особенность C3d-модифицированного антигена заключается в том, что он может взаимодействовать одновременно с рецептором антигена (BCR) и комплексом CD21/CD19/ TAPA-1 на поверхности В-лимфоцитов. В опытах *in vitro* показано, что C3d-маркированные антигены снижают В-лимфоцитактивирующую дозу в 10—100 раз (Carter, Fearon, 1992). Ковалентное конъюгирование антигена с C3d является необходимым условием для активации и клонообразования узнающих его лимфоцитов популяции В1, являющихся основным источником естественных (нормальных) IgM. С последними связывают эффективность защиты мышей от эндотоксического шока, поскольку они избирательно лигируют липополисахариды и способствуют их удалению из организма (Fisher et al., 1997; Reid et al., 1997). Таким образом, между системой комплемента, активируемой по классическому пути либо нормальными (естественными) антителами IgM, либо маннозосвязывающим лектином или С-реактивным белком, и популяцией В1-лимфоцитов, являющейся основным продуцентом нормальных антител, существует двусторонняя связь, которая обеспечивает эффективность иммунной защиты от микробной инфекции и эндотоксического шока. Именно поэтому организмы, дефицитные по компонентам комплемента С3 и С4 или рецепторной системе В1-лимфоцитов (CD21/CD19/TAPA1), уязвимы в противостоянии микробной агрессии, вызываемой грамотрицательными бактериями (Caroll, Prodeus, 1998).

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ КОНЦЕПЦИИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

Иммунная система человека и позвоночных животных состоит из двух взаимодействующих блоков — врожденного (innate) и приобретенного (acquired). Морфологическим субстратом (носителем) приобретенного иммунитета являются Т- и В-лимфоциты. Клетки лимфоидной системы несут структурно уникальные для каждого клона В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов рецепторы к антигенам. Набор этих рецепторов исчисляется по оценкам разных специалистов от  $10^9$  до  $10^{14}$  для рецепторов В-лимфоцитов (BCR) и в диапазоне  $10^7$ — $10^8$  для рецепторов Т-лимфоцитов (TCR). В основе формирования столь огромного разнообразия специфических рецепторов к антигенам лежат молекулярно-генетические механизмы соматической рекомбинации генных сегментов и гипермутагенеза, происходящие в онтогенезе индивидуальной особи в ее центральных и периферических лимфоидных органах. Образование рекомбинантов и мутантов носит стохастический (случайный) характер. Ежедневно возникают тысячи новых вариантов лимфоидных клеток, каждая из которых имеет только по одной, характерной для нее, специфически распознающей антигены варибельной области рецептора (Tonegawa, 1988). В случае появления во внутренней среде макроорганизма антигенов, последние являются факторами отбора тех лимфоидных клеток, на поверхности которых к ним есть рецепторы. После взаимодействия антигена с рецептором возникает необходимое условие для последующих морфоиммунофизиологических реакций, которые приводят либо к иммунному реагированию, либо к иммунной толерантности. В первом случае из одной материнской лимфоцитарной клетки возникает популяция клеток, несущая рецептор к антигену (антигенной детерминанте) только одной специфичности. Эта совокупность клеток, избирательно реагирующая на индивидуальный антиген, получила наименование клона. Поэтому очень часто рассматриваемая форма иммунитета носит название клонального. Именно клональный отбор, инициируемый анти-

генами, является одним из базовых механизмов формирования приобретенного (адаптивного, клонального, антиген-специфического) иммунитета. Становление клона лимфоцитов представляет необходимое условие для формирования резистентности к инфекции. Однако этот процесс требует для своего завершения минимум 3—5 дней, что, несомненно, является ахиллесовой пятой приобретенного иммунитета. При средней скорости размножения микробов в течение суток одна бактериальная клетка может дать около  $10^8$  потомков. Ясно, что при отсутствии механизмов защиты от инфекции, определяемых нами как механизмы врожденного иммунитета, выживание животных в среде, изобилующей потенциально патогенными микроорганизмами, было бы невозможным. Начиная с простейших и примитивных многоклеточных животных (губки, кишечноротовые) в эволюции возникали и получили дальнейшее развитие механизмы защиты от инфекции, включающиеся экстренно (неотложно). Это в первую очередь механизмы неспецифической резистентности, как то: структурная целостность покровов и слизистых животных, кислая среда желудочного сока и пота, жирные кислоты, липиды сурфактанта.

Но наряду с этими факторами, в организме животных существуют механизмы защиты от инфекции, составляющие блок врожденного иммунитета. Иммунные реакции врожденного типа формируются благодаря наличию у клеток этой системы специализированного распознающего патогены рецепторного аппарата, отличного по химической природе и принципам формирования от рецепторов В- и Т-лимфоцитов. Компоненты микробных клеток и вирионов, которые распознаются этими рецепторами, по предложению американского иммунолога Ч. Дженэвэя (Janeway, 1989, 1992) получили название патогенассоциированных молекулярных паттернов — ПАМП (pathogen-associated molecular patterns — PAMPs), а сами рецепторы — паттернраспознающих рецепторов (молекул) — ПРР (patterw-recognition receptors (molecules) — PRRs, PRMs). Многие составляющие ПРР(М) известны достаточно давно (табл. 1). Это, в частности, рецепторы формилметионил-пептидов, обеспечивающие эффективность инициальных стадий фагоцитарного процесса как основного клеточного механизма врожденного иммунитета. Другие представители ПРР(М) открыты относительно недавно, как-то: некоторые сквенджер рецепторы (СР), маннозный рецептор макрофагов, маннозо (маннан)-связывающий белок, липополисахаридсвязывающий белок, рецептор CD14, Толл-подобные рецепторы. Механизмы врожденного иммунитета включаются немедленно после инфицирования макроорганизма, а подчас и предупредительно (альвеолярные макрофаги) на поверхности слизистых и покровов, совместно с факторами неспецифической резистентности, обеспечивая инактивацию патогенов. В последние десятилетия достигнуты боль-

шие успехи в расшифровке эффекторных механизмов врожденного иммунитета, ответственных за нейтрализацию и элиминацию ПАМП и их носителей. В этих исследованиях доказана ведущая роль в инактивации микроорганизмов и оболочечных вирусов группы разнообразных по химической структуре пептидов (дефенсины, протегрины, бактенецины, цекропины и др.) и белков (лизоцим, серпроцидины, бактерицидная проникающая способность увеличивающий белок, лактоферрин, пероксидазы и др.), продуцируемых фагоцитами и эпителиальными клетками (Пигаревский, 1978; Lehrer et al., 1993; Voman, 1995; Кокряков, 1999; Zasloff, 2002). После длительного периода (50—80-е гг. XX в.) недооценки рассматриваемых механизмов иммунной защиты против инфекции в настоящее время наблюдается формирование современной иммунологической парадигмы, неотъемлемым и базовым элементом которой является концепция о врожденном (естественном по И. И. Мечникову) иммунитете (Medzhitov, Janeway, 2000; Janeway, 2002). Как было подчеркнуто ранее, основное различие между системами врожденного и приобретенного (адаптивного) иммунитета заключается в механизмах распознавания патогенов, осуществляемого этими блоками иммунной системы. Активация приобретенного иммунитета инициируется в результате антиген-специфического реагирования, а врожденного иммунитета — взаимодействия с патогенассоциированными молекулярными паттернами. Последние представляют из себя структурные компоненты микробных клеток и вирионов, которые являются мало изменяющимися в эволюции макромолекулами, как то: липид А липополисахаридов грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, мурамилпептиды пептидогликанов бактерий, N-формилметиониловые пептиды как типичная структура, образующая при белковом синтезе бактерий, белок бактериальных жгутиков флагеллин, неметилованные по цитозину тандемы цитозин—гуанин (CpG) ДНК бактерий, одно- и двуспиральная РНК вирусов. Консерватизм структур этих соединений обеспечивает микроорганизмам очевидные преимущества в выживании, так как они являются ключевыми химическими блоками клеточной организации микроорганизмов, процессов их репликации и трансляции. В то же самое время не случайно, что в ходе эволюции животных у последних возникли и совершенствовались механизмы детекции инфекционных агентов именно по этим патогенассоциированным молекулярным паттернам. Это очень точный механизм обнаружения «несвоего», а к тому же, с генетической точки зрения, экономичный, так как для его реализации необходимо всего несколько десятков генов (20—40), ответственных за синтез рецепторных белков (ППР). В дополнение к этому, передача этих генов по наследству через половые клетки стабильно сохраняет в эволюции систему эффективной

дискриминации «свое»/«несвое». Передача по наследству генов, ответственных за синтез белков системы распознавания ПАМП, является необходимым условием выживания того или иного вида животных. Специфичность рецепторов, распознающих ПАМП, генетически детерминирована, поскольку гены, в которых заложена информация об их структуре, передаются из поколения в поколение половым путем. В связи с этим следует подчеркнуть, что все разнообразие рецепторов В- и Т-лимфоцитов, распознающих антигены, формируется в онтогенезе позвоночных и несомненно благоприятствует их выживанию. Но единожды приобретенный организмом спектр рецепторов В- и Т-лимфоцитов не передается по наследству. В онтогенезе позвоночных каждый раз заново должен формироваться реестр адаптивных рецепторов, распознающих антигены патогенных микроорганизмов и вирусов.

Таким образом, стратегия иммунного распознавания системной врожденного иммунитета базируется не на детекции тонких различий антигенов (например, О-антигенов), а на избирательном связывании микробных макромолекул с консервативной структурой — патогенассоциированных молекулярных паттернов (молекулярных матриц, шаблонов), свойственных одновременно большим группам микроорганизмов. Это обеспечивает эффективное фокусирование элиминационных механизмов (фагоцитоз, продукция антимикробных пептидов и белков, система комплемента) врожденного иммунитета на носителях ПАМП и протективный характер защитных реакций, осуществляемых рассматриваемой иммунной системой. Структурно паттернраспознающие рецепторы разнообразны и принадлежат к нескольким семействам белков. Наиболее часто в распознавании ПАМП участвуют домены СР, лектинов С-типа и структуры с лейцинобогатыми повторами (Толл-подобные рецепторы, NOD-белки). Функционально ПРР могут быть подразделены на три группы: секреторные, эндцитирующие и сигнальные. Наиболее охарактеризованным рецептором ПАМП первого типа является маннозо (маннан)-связывающий лектин (белок) — МСЛ (МСБ), который распознает ПАМП, формирующийся терминально расположенными в углеводных цепях олигосахаров, пептидогликанов, гликолипидов и гликопротеинов остатками D-маннозы, L-фукозы, D-N-ацетилглюкозамина (Fraser et al., 1998). Высокоаффинно фиксируясь на поверхности микробных клеток-мишеней и некоторых вирусов, МСЛ опсонизирует их для рецептор-опосредованного (через ClqR) фагоцитоза нейтрофилами и моноцитами/макрофагами и (или) активирует систему комплемента по лектиновому пути, сочетающему признаки классического и альтернативного путей активации комплемента (рис. 3). Эндцитирующие ПРР расположены на цитоплазматической мембране фагоцитов, они распознают ПАМП, локализованные на поверхности микробных клеток и вирионов. Это СР

(Suzuki et al., 1997) и маннозный рецептор (Fraser et al., 1998) макрофагов. Последний является рецептором С-лектинового типа.

Распознавание ПАМП сигнальными рецепторами инициирует продукцию клетками иммунной системы комплекса цитокиновых молекул и антибиотических пептидов. Наиболее известными рецепторами этой группы являются Толл-рецепторы беспозвоночных и Толл-подобные рецепторы млекопитающих и человека.

Все большее подтверждение получает концепция Дженэвэй (Janeway, 1989, 1992) о важности системы врожденного иммунитета (innate immunity) в реализации начальных стадий некоторых реакций приобретенного иммунитета (acquired immunity). Активация ряда механизмов врожденного иммунитета, ведущая к продукции провоспалительных цитокинов и антибиотических пептидов, обеспечивает инструктирующими сигналами иммунные реакции приобретенного типа. Дженэвэй обратил внимание на то обстоятельство, что по данным иммунологических исследований образование антител на растворимые Т-зависимые антигены невозможно без использования адьювантов. Компонентами полного адьюванта Фрейнда, традиционно используемого для получения антител, являются вещества клеточной стенки микобактерий. По мнению Дженэвэй именно микробные вещества распознаются системой рецепторов врожденного иммунитета, реагирование которой в форме продукции цитокинов, антимикробных пептидов и ряда острофазовых белков обеспечивает последующее формирование протективного (адекватного) иммунного ответа приобретенного типа. Цитокины (ИЛ-1, ИЛ-12, ФНО $\alpha$  и др.) обеспечивают необходимые дополнительные молекулярно-клеточные взаимодействия, определяющие эффективность клонообразования лимфоцитов и клеточный или гуморальный иммунный ответ приобретенного типа (Упанов, 1997). Кроме продукции и секреции цитокинов макрофагами и естественными киллерами, присоединение некоторых компонентов комплемента к антигену (Dempsey et al., 1996), вовлечение микробными антигенами лектиновых рецепторов антигенпредставляющих клеток (Jiang et al., 1995), поддержка антиген-реактивных Т-лимфоцитов (Vella et al., 1995), индукция экспрессии В7.1 и В7.2 на антигенпрезентирующих клетках (Lenschow et al., 1996) являются взаимодополняющими путями реализации воздействий системы врожденного иммунитета на иммунные реакции приобретенного типа. Так, например, В7.1- и В7.2-белки на поверхности антигенпредставляющих клеток (активация экспрессии которых имеет место под воздействием липополисахаридов), взаимодействуя с рецепторами Т-лимфоцитов, обеспечивают формирование «второго сигнала» (первым является взаимодействие антиген—рецептор антигена), необходимого для последующего клонообразования и формирования протективного иммунного ответа. Синтез

В7.1-белка макрофагами и дендритными клетками инициируется через активацию Толл-подобных рецепторов (Medzhitov et al., 1997). Так возникают сети коммуникаций между врожденным и приобретенным блоками иммунной системы у млекопитающих.

Этот «второй сигнал», обеспечивающий связь двух блоков иммунной системы, является результатом распознавания «несвоего» рекогносцировочной системой врожденного иммунитета и реагирования на него клеток иммунной системы (Janeway, 1989, 1992, 2002; Matzinger, 1994, 2001; Fearon, Locksley, 1996). Возможно, что в ходе расшифровки этих связей мы будем продвигаться от представлений о «несвоем—своем» к классификации «инфекционное—неинфекционное» (Fearon, Locksley, 1996), «вредное—безвредное» (Matzinger, 1994), «патогенное—свое».

Значимость системы врожденного иммунитета позвоночных определяется ее незаменимой, осознаваемой только в настоящее время, ролью в процессе дискриминации «свое—несвое». Именно этот процесс в значительной степени определяет реактивный или толерогенный характер ответа на антигены со стороны системы механизмов приобретенного иммунитета. При этом ключевую позицию в рецепторном аппарате системы врожденного иммунитета, детектирующим «несвое», занимают Толл-подобные рецепторы, взаимодействие лигандов с которыми запускает путь трансдукции сигнала, завершающийся транслокацией транскрипционного фактора NFκB в ядро и активацией группы генов, которые ответственны за синтез антимикробных пептидов, цитокинов и ряда белков острой фазы. Одни из этих веществ ответственны за информирование блока механизмов приобретенного иммунитета о необходимости реализации своей физиологической защитной функции, другие осуществляют эффекторную функцию по нейтрализации и элиминации патогенов.

Многообразие рецепторов системы приобретенного иммунитета является несомненным достоинством, обеспечивающим тонкое распознавание антигенных детерминант (эпитопов, сигнатур). Уязвимость этой рекогносцировочной системы состоит в том, что она сама по себе, без инструкций от системы врожденного иммунитета, далеко не всегда способна детектировать биологическую природу источника антигена, т. е. дискриминировать «свое» от «несвоего» (чужеродного). Процесс дискриминации является многоступенчатым (многоактным), включающим обязательное участие в нем определенных механизмов врожденного иммунитета. Рецепторный аппарат системы врожденного иммунитета при относительной ограниченности составляющих его молекул (всего несколько десятков) в состоянии более однозначно осуществлять распознавание «несвоего» (чужеродного), поскольку в основе этого процесса лежит избирательное (высокоаффинное, комплементарное) взаимодействие паттернраспознающих рецепторов (лек-

тины, Толл-рецепторы, ТПР, сквенджер рецепторы и т. д.) с набором эволюционно консервативных, присущих большому числу инфекционных агентов, патогенассоциированных молекулярных паттернов. Информация, исходящая от клеток блока врожденного иммунитета, играет инструктирующую роль в ответе Т-лимфоцитов на антигены и часто определяет в значительной степени возможность образования (формирования) клона лимфоцитов специфически реагирующего на конкретный антиген. Несмотря на относительную ограниченность в разнообразии и неспособность различать тонкости близко гомологичных по структуре соединений, рецепторы системы врожденного иммунитета осуществляют однозначную детекцию тех немногих веществ микробных клеток и вирусов, которые присущи одновременно большому таксономическим группам микроорганизмов: липополисахариды грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты грамположительных бактерий, пептидогликаны клеточных стенок бактерий, липопептиды микобактерий, фосфатидилглицерин и кардиолипин цитоплазматических мембран бактерий, маннаны низших грибов, дуспиральные РНК вирусов, метилированные по цитозину пары CpG ДНК бактерий, формилметиониловые пептиды, флагеллин.

Таким образом, система механизмов врожденного иммунитета обеспечивает неотложное иммунное реагирование организма на инфекцию. Она осуществляет эффективное распознавание инфекционных агентов и их элиминацию у преобладающего числа видов живого мира на протяжении его длительной эволюции, включая и растения (Vorregaard et al., 2000). Часто в качестве довода, характеризующего несовершенство этой системы защиты от инфекции, говорят об отсутствии у нее феномена «памяти» (усиленного иммунного ответа при реинфицировании). Однако это представление является не совсем обоснованным, так как рассматриваемая система защиты реализует механизмы видовой, а не онтогенетической, генетической памяти в полной мере и практически без латентного периода при уже первичном инфицировании. В реагировании животных организмов на инфекцию задействованы сотни генов, передающихся неизменными из поколения в поколение через половые клетки. Эти гены ответственны за синтез рецепторных (паттернраспознающих рецепторов) и эффекторных (антимикробные пептиды и белки, комплемент) молекул, и в отличие от генов иммуноглобулинов, рецепторов В- и Т-клеток экспрессируются конститутивно либо в первые же минуты/часы после инфицирования. Именно эти особенности формирования рассмотренного в настоящей монографии иммунитета позволяют его характеризовать как врожденный, т. е. присутствующий от рождения и независимый от сложного процесса соматической рекомбинации генных сегментов, ответственного за реализацию механизмов приобретенного иммунитета.

*Автор выражает глубокую признательность своим коллегам — академику РАМН Е. А. Корневой, к. б. н. Г. М. Алешинной, к. б. н. О. В. Шамовой, к. б. н. Н. С. Новиковой, к. б. н. Л. Е. Леоновой, к. б. н. М. Н. Берлову, к. м. н. Д. С. Орлову, к. б. н. Е. Г. Краснодембскому, к. б. н. А. Д. Краснодембской, к. х. н. Т. В. Овчинниковой, м. н. с. А. В. Меньшенину, м. н. с. Е. С. Клушевской, аспирантам Д. Крыловой, А. Мальцевой и Е. С. Кораблевой, инженеру Е. В. Цветковой, лаборантам-исследователям Г. Е. Викуловой и В. В. Игнатъевой, многолетняя совместная творческая работа с которыми способствовала получению ряда важных экспериментальных данных, отраженных в настоящей монографии. Автор глубоко благодарен к. б. н. М. Н. Берлову и лаборантам-исследователям Г. Е. Викуловой и В. В. Игнатъевой за профессиональную помощь в подготовке рукописи книги к изданию.*

## ЛИТЕРАТУРА

- Адо А. Д. Патологическая физиология 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 противовирусные 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., Лызлова С. Н., Раменская Н. П. Взаимодействие катионных белков гранул и миелопероксидазы лейкоцитов // Вопр. мед. химии. 1977. № 4. С. 534—537.
- Берлов М. Н. Сравнительное исследование антимикробных белков нейтрофилов собаки и человека: Автореф. дис. канд. биол. наук. СПб., 2004.
- Бойд У. Основы иммунологии. М., 1969. 647 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.
- Вавилова Л. М., Голосова Т. В. Система комплемента. М., ВИНТИ. Сер. Иммунология. Т. 24. 160 с.
- Данилова М. А. Морфологические проявления антимикробного действия катионных белков нейтрофильных гранулоцитов // Клиническая морфология нейтрофильных гранулоцитов. Л., 1988. С. 52—75.
- Ждан-Пушкина С. М. О действии протаминов, гистонов и полипептидов основного характера на микроорганизмы // Научн. докл. высшей школы. 1973. Вып. 8. С. 82—98.
- Зильбер А. А. Основы иммунологии. М., 1958. 599 с.
- Кагава Я. Биомембраны. М., 1985. 303 с.
- Козлов Л. В. Белки системы комплемента: активация и регуляция // Иммунология. 1997. Вып. 2. С. 8—13.
- 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.** Физико-химические и функциональные свойства антимикробных белков нейтрофилов: Автореф. дис. докт. биол. наук. СПб., 1995.
- Кокряков В. Н.** Биология антибиотиков животного происхождения. СПб., 1999. 162 с.
- Кокряков В. Н., Алешина Г. М., Слепенков С. В., Яковлева М. Ф., Пигаревский В. Е.** О степени структурной гомологии лактоферринов молока и нейтрофильных гранулоцитов // Биохимия. 1988. Т. 53, вып. 11. С. 1837—1843.
- 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., Борисов А. И., Слепенков С. В., Лызлова С. Н.** Сравнительное исследование некоторых физико-химических свойств миелопероксидаз свиньи и коровы // Биохимия. 1982. Т. 47, вып. 1. С. 100—107.
- 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 / Под ред. А. Н. Маянского. Горький, 1989. С. 98—103.
- Кокряков В. Н., Ротова Г. М., Мазинг Ю. А.** Морфобioхимические основы функциональной активности нейтрофилов млекопитающих // Морфофункциональные аспекты неспецифической резистентности и демиелинизирующих заболеваний. Л., 1981. С. 31—45.
- 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.
- Кокряков В. Н., Толыбеков 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.
- 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. научн. общ-ва патологоанатомов. Вып. XXIV. Л., 1983. С. 93—95.
- Корнева Е. А., Шхник Э. К.** Гормоны и иммунная система. Л., 1988. 251 с.
- Краснодембская А. Д., Алешина Г. М., Лодыгин П. А. и др.** Новые антимикробные пептиды из целомотцов пескожила *Agenicola marina* // Вест. СПбГУ. 2001. Сер. 3, вып. 4. С. 104—108.
- 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.
- Маянский А. Н., Маянский Д. Н.** Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск, 1-е изд. 1983. 254 с.; 2-е изд. 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.
- Назаров П. Г.** Реактанты острой фазы воспаления. СПб., 2001. 423 с.
- Ноздрачев А. Д., Крылов Б. В., Сабанов В. С. и др.** Эндогенные антибиотики дефенсины как возможные регуляторы функционирования натриевых каналов нейронов спинномозговых ганглиев // ДАН. 1997. Т. 355, № 5. С. 705—707.

- Осипов А. Н., Азизова О. А., Владимиров Ю. А. Активные формы кислорода и их роль в организме // Успехи биол. химии. 1990. № 31. С. 180—208.
- Петров Р. В. Иммунология. М., 1982. 368 с.
- Плахова В. Б., Рогачевский И. В., Щеголев Б. Ф. и др. Дефенсин NP-4 уменьшает потенциалочувствительность медленных натриевых каналов сенсорных нейронов // Сенсорные системы. 2005. Т. 19, № 2. С. 123—131.
- Пигаревский В. Е. Лизосомально-катионный тест // Патол. физиол. и экспер. терапии. 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.
- Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М., 1976. 382 с.
- Рогачевский И. В., Плахова В. Б., Щеголев Б. Ф. и др. Рецептор дефенсина: возможный механизм снижения возбудимости мембраны сенсорного нейрона // ДАН. 2000. Т. 375, № 6. С. 843—846.
- Роговин В. В., Пирузян Л. А., Муравьев Р. А. Пероксидазосомы. М., 1977. 205 с.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. М., 2000. 582 с.
- Салаяев Р. К., Романенко А. С. Эндоцитоз. Новосибирск, 1979. 112 с.
- Сент-Дьердьи А. Биозлектроника. М., 1971. 80 с.
- Тотолян А. А., Фрейндлин И. С. Клетки иммунной системы. Нейтрофилы. Моноциты/макрофаги. СПб., 2000. 231 с.
- Франклин Т., Сноу Дж. Биохимия антимикробного действия. М., 1984. 240 с.
- Фрейндлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов. М., 1984. 272 с.
- Хадорн Э., Венер Р. Общая зоология. М., 1989. 528 с.
- Хантов Р. М., Игнатьева Г. А., Сидорович И. Г. Иммунология. М., 2000. 432 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 совр. биологии. 1981. № 92. С. 365—379.
- Шульц Г., Ширмер Р. Принципы структурной организации белков. М., 1982. 354 с.
- Янковский О. Ю., Довнар Т. Е. Роль протениаз и продуктов деградации белков в защитных реакциях // Журн. общ. биол. 1985. № 44. С. 93—101.
- Янковский О. Ю. Токсичность кислорода и биологические системы. СПб., 2000. 294 с.
- Янковский О. Ю., Довнар Т. Е., Ткаченко А. А. К механизму антимикробного действия миелопероксидазы. Роль адсорбции фермента на поверхности клетки-мишени // Журн. микробиол. 1981. № 6. С. 58—61.
- Янковский О. Ю., Кокряков В. Н., Лызлова С. Н. Физико-химические и кинетические характеристики миелопероксидазы нейтрофильных лейкоцитов коров // Укр. биохим. журн. 1979. Т. 51, № 5. С. 492—496.
- Aderem A., Hume D. A. How do you see CG? // Cell. 2000. Vol. 103 (7). P. 993—996.
- Aderem A., Ulevith R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response // Nature. 2001. Vol. 406. P. 782—787.

- 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. Vol. 92. P. 195—199.
- 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 antibacterial peptides // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 202. P. 849—854.
- Agner K.** Crystalline myeloperoxidase // *Acta Chem. Scand.* 1958. Vol. 12, N 1. 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.
- Agner K.** Verdoperoxidase. A ferment isolated from leucocytes // *Acta Physiol. Scand.* 1941. Vol. 2 (Suppl. 8). P. 1—62.
- Agner K.** Studies on peroxidative detoxification of purified diphtheria toxin // *J. Exp. Med.* 1950. Vol. 92. P. 317—342.
- Ahearn J. M., Fischer M. B., Croix D.** et al. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen // *Immunity.* 1996. Vol. 4 (3). P. 251—262.
- Aisen P., Listowsky I.** Iron transport and storage proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 1980. Vol. 49. P. 357—393.
- Akira S., Hemmi H.** Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family // *Immunol. Lett.* 2003. Vol. 85 (2). P. 85—95.
- Allen R. C.** Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocyte in the phenomenon of electronic excitation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975. Vol. 63, N 3. P. 675—683.
- Almeida R. P., Melchior M., Campanelli D.** et al. Complementary DNA sequence of human neutrophil azurocidin, an antibiotic with extensive homology to serine proteases // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. Vol. 177. P. 688—695.
- Al-Sharif W. Z., Sunyer J. O., Lambris J. D., Smith L. C.** Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3 // *J. Immunol.* 1998. Vol. 160 (6). P. 2983—2997.
- 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. Dis.* 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. Biophys.* 1982. Vol. 214, N 1. P. 273—283.
- Anderson K. V., Bokla L., Nusslein-Volhard C.** Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product // *Cell.* 1985. Vol. 42 (3). P. 791—798.
- Anderson K. V.** Toll signaling pathways in the innate immune response // *Curr. Opin. Immunol.* 2000. Vol. 12 (1). P. 13—19.
- Andersson M., Boman A., Boman H. G.** *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides // *Cell Mol. Life Sci.* 2003. Vol. 60 (3). P. 599—606.
- Appelmek B. J., An Y., Geerts I.** et al. Lactoferrin is a lipid A-binding protein // *Infect. Immunol.* 1994. Vol. 62. P. 2628—2632.
- Armstrong J. A., D'Arcy Hart P. D.** Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes // *J. Exp. Med.* 1971. Vol. 134 (3 Pt 1). P. 713—740.
- Armstrong P. B.** The contribution of proteinase inhibitors to immune defense // *Trends Immunol.* 2001. Vol. 22. P. 47—52.

- Armstrong P. B., Quigley J. P.**  $\alpha$ 2-macroglobulin: an evolutionary conserved arm of the innate immune system // *Develop. Compar. Immunol.* **1999.** Vol. 23. P. 375—390.
- Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J.** Bactericidal activity of human lactoferrin. Sensitivity of a variety of microorganisms // *Infect. Immunol.* **1980.** Vol. 28, N 3. P. 893—898.
- Arnold R. R., Cole M. F., McGhee J. R.** A bactericidal effect for human lactoferrin // *Science.* **1977.** Vol. 197, N 4300. P. 263—265.
- Arnold R. R., Russell J., Champion W. J., Gauthier J. J.** Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical condition and metabolic state of the target microorganism // *Infect. Immunol.* **1981.** Vol. 32, N 2. 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. Immunol.* **1982.** Vol. 35. P. 792—799.
- Ashida M.** Purification and characterization of pre-phenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* // *Arch. Biochem. Biophys.* **1971.** Vol. 144 (2). P. 749—762.
- Ashida M., Yoshida H.** Limited proteolysis of prophenoloxidase during activation by microbial products in insect plasma and effect of phenoloxidase on electrophoretic mobilities of plasma proteins // *Insect. Biochem.* **1988.** Vol. 18. P. 11—19.
- Aspan A., Huang T. S., Cerenius L., Soderhall K.** cDNA cloning of prophenoloxidase from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* and its activation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995.** Vol. 92 (4). P. 939—943.
- Aspan A., Soderhall K.** Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase // *Insect. Biochem.* **1991.** Vol. 21. P. 363—373.
- Babior B. M., Kipnes R. S., Curnutte J. T.** Biological defence mechanisms: the production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent // *J. Clin. Invest.* **1973.** Vol. 52. P. 741—744.
- 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.
- Baeuerle P. A., Baltimore D.** I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor // *Science.* **1988.** Vol. 242 (4878). P. 540—546.
- Baggiolini M.** Chemokines and leukocyte traffic // *Nature.* **1998.** Vol. 392 (6676). P. 565—568.
- Baggiolini M., de Duve C., Masson P. L., Heremans J. F.** Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes // *J. Exp. Med.* **1970.** Vol. 131, N 3. P. 559—570.
- Baggiolini M., Dewald B.** The neutrophil // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **1985.** Vol. 76 (suppl. 1). P. 13—20.
- 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.* **1971.** Vol. 134, N 4. P. 907—934.
- Baker B., Zambryski P., Staskawicz B., Dinesh-Kumar S. P.** Signaling in plant-microbe interactions // *Science.* **1997.** Vol. 276 (5313). P. 726—733.
- Baldridge C. W., Gerard W.** The extra respiration of phagocytosis // *Amer. J. Physiol.* **1933.** Vol. 103, N 6. P. 235—236.
- Baldwin A. S.** The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B Proteins: New discoveries and insights // *Amm. Rev. Immunol.* **1996.** Vol. 14. P. 649—681.
- Bals R., Goldman M. J., Wilson J. M.** Mouse  $\beta$ -defensin is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract // *Infect. Immunol.* **1998.** Vol. 66, N 3. P. 1225—1232.

- 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.
- Barracco M. A., Duvic B., Soderhall K.** The  $\beta$ -1,3-glucan-binding protein from the crayfish *Pacifastacus leniusculus*, when reacted with a  $\beta$ -1,3-glucan, induces spreading and degranulation of crayfish granular cells // *Cell Tiss. Res.* **1991**. Vol. 266. P. 491—497.
- Barrett A. J.** Cathepsin G // *Methods Enzymol.* **1981a**. Vol. 80. P. 561—565.
- Barrett A. J.** Leukocyte elastase // *Methods Enzymol.* **1981b**. Vol. 80. P. 581—588.
- Basanez G., Shinnar A. E., Zimmerberg J.** Interaction of hagfish cathelicidin antimicrobial peptides with model lipid membranes // *FEBS Lett.* **2002**. Vol. 532. P. 115—120.
- 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, N 20. P. 9300—9308.
- Beamer L. J., Carroll S. F., Eisenberg D.** Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution // *Science.* **1997**. Vol. 276. P. 1861—1864.
- Beg A. A., Baldwin A. S. Jr.** The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors // *Genes Dev.* **1993**. Vol. 7 (11). P. 2064—2070.
- 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. Biophys. Acta.* **1992**. Vol. 1121. P. 130—136.
- Belvin M. P., Anderson K. V.** A conserved signaling pathway. P. the *Drosophila* Toll-dorsal pathway. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**. Vol. 12. P. 393—416.
- Bensch K. W., Raida M., Magert H.-J. et al.** hBD-1: a novel  $\beta$ -defensin from human plasma // *FEBS Lett.* **1995**. Vol. 368. P. 331—335.
- Berczi I., Bertok L., Bereznai T.** Comparative studies on the toxicity of *Escherichia coli* lipopolysaccharide endotoxin in various animal species // *Can. J. Microbiol.* **1966**. Vol. 12. P. 1070—1071.
- Berendes H., Bridges R. A., Good R. A.** Fatal granumatos of child hood: 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. Biophys. Acta.* **1986**. Vol. 864. P. 123—141.
- Bertin J., Nir W. J., Fischer C. M. et al.** Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB // *J. Biol. Chem.* **1999**. Vol. 274 (19). P. 12 955—12 958.
- 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.
- Beutler B.** Endotoxin, tumor necrosis factor, and related mediators: new approaches to shock // *New Horiz.* **1993**. Vol. 1 (1). P. 3—12.
- Beutler B.** Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate Immunity // *Current. Opini. Microbiol.* **2000**. Vol. 3. P. 23—28.
- Beutler B.** Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling // *Nature.* **2004**. Vol. 430 (6996). P. 257—263.
- Beutler B., Mahoney J., Le Trang N. et al.** Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells // *J. Exp. Med.* **1985**. Vol. 161 (5). P. 984—995.

- Bevins C. L.** Antimicrobial peptides as effector molecules of mammalian host defense // *Host Response Mechanisms in infectious diseases* / Ed. H. Herwald. Contrib. Microbiol. Basel, 2003. Vol. 10. P. 106—148.
- 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.
- Biragyn A., Surenhu M., Yang D.** et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens // *J. Immunol.* 2001. Vol. 167 (11). P. 6644—6653.
- Biragyn A., Tani K., Grimm M. C.** et al. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity // *Nat. Biotechnol.* 1999. Vol. 17 (3). P. 253—258.
- Biron C. A.** Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections // *Semin Immunol.* 1998. Vol. 10 (5). P. 383—390.
- Black D. S., Bliska J. B.** The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence // *Mol. Microbiol.* 2000. Vol. 37 (3). P. 515—527.
- 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.
- Blystone S. D., Graham I. L., Lindberg F. P., Brown E. J.** Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1 // *J. Cell Biol.* 1994. Vol. 127 (4). P. 1129—1137.
- Blystone S. D., Slater S. E., Williams M. P.** et al. A molecular mechanism of integrin crosstalk: alphavbeta3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates alpha5beta1 function // *J. Cell Biol.* 1999. Vol. 145 (4). P. 889—897.
- Bode J. G., Ludwig S., Freitas C. A.** et al. The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription // *Biol. Chem.* 2001. Vol. 382 (10). P. 1447—1453.
- Bode J. G., Nimmegern A., Schmitz J.** et al. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 463 (3). P. 365—370.
- Boman H. G.** Cecropins: antibacterial peptides from insects and pigs // *Phylogenetic Perspectives in Immunity: The Insect Host Defense* / Eds J. Hoffmann, S. Natori, C. Janeway. Austin TX, 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., Boman I. A., Andreu D.** et al. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 5852—5860.
- 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., Hultmark D.** Cell-free immunity in insects // *Annu. Rev. Microbiol.* 1987. Vol. 41. P. 103—126.

- Bonmatin J.-M., Bonnat J. L., Gallet X.** et al. Two-dimensional <sup>1</sup>H-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. Immunol*. 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. Immunol*. 1991b. Vol. 59, N 4. P. 1368—1377.
- Bories D., Raynal M., Rolomon D. H.** et al. Down-regulation of a serine protease, myelo-blastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells // *Cell*. 1989. Vol. 59. P. 959—968.
- Borregaard N.** The respiratory burst of phagocytosis: biochemistry and subcellular localization // *Immunol. Lett*. 1985. Vol. 11. P. 165—171.
- Borregaard N., Elsbach P., Ganz T.** et al. Innate immunity: from plants to humans // *Immunol Today*. 2000. Vol. 21 (2). P. 68—70.
- Borron P. J., Crouch E. C., Lewis J. F.** et al. Recombinant rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production // *J. Immunol*. 1998. Vol. 161 (9). P. 4599—4603.
- Boyde T. R., Pryme I. F.** Alpha2-macroglobulin binding of trypsin, chymotrypsin, papain, and cationic aspartate aminotransferase // *Clin Chim. Acta*. 1968. Vol. 21 (1). P. 9—14.
- Boyd W. C., Shapleigh E.** Separation of individuals of any blood group into secretors and non-secretors by use of a plant agglutinin (lectin) // *Blood*. 1954. Vol. 9 (12). P. 1194—1198.
- Breathnach S. M., Koffer H., Sepp N.** et al. Serum amyloid P component binds to cell nuclei in vitro and to in vivo deposits of extracellular chromatin in systemic lupus erythematosus // *J. Exp. Med*. 1989. Vol. 170 (4). P. 1433—1438.
- Breton-Gorius J., Mason D. Y., Buriot D.** et al. Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in recurrent infections // *Am. J. Pathol*. 1980. Vol. 99. P. 413—419.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. Vol. 90. P. 6275—6279.
- Brower D. L., Brower S. M., Hayward D. C., Ball E. E.** Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin beta subunits from a coral and a sponge // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. Vol. 94 (17). P. 9182—9187.
- Brown G. D., Gordon S.** Immune recognition. A new receptor for beta-glucans // *Nature*. 2001. Vol. 413 (6851). P. 36—37.
- Broxmeyer H. E., Platzer E.** Lactoferrin acts on Ia- and Ie/c antigen<sup>+</sup> 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 granulocyte-derived inhibitor of colony-stimulating activity production // *J. Exp. Med*. 1978. Vol. 148, N 4. P. 1052—1067.
- Brune K., Shitznagel J. K.** Peroxidaseless chicken leucocytes: isolation and characterization of antibacterial granules // *J. Infect. Dis*. 1973. Vol. 127, N 1. P. 84—94.

- 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, N 36. 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* carries an O-glycosylated substitution // *J. Biol. Chem.* **1993**. Vol. 268. P. 14 893—14 897.
- Bulet Ph., Stocklin R., Menin L.** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates // *Immunol. Revs.* **2004**. Vol. 198. P. 169—184.
- Bullen J. J., Armstrong J.** The role of lactoferrin in the bactericidal function of polymorphonuclear leucocytes // *Immunology.* **1979**. Vol. 36. P. 781—791.
- Bullen J. J., Rogers H. J., Griffiths E.** Role of iron in bacterial infection // *Current. Top. Microb. Immunol.* **1978**. Vol. 80. P. 1—35.
- Burmester T., Scheller K.** Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor // *J. Mol. Evol.* **1996**. Vol. 42 (6). P. 713—728.
- 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.* **1990**. Vol. 85. P. 904—915.
- 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, N 3. P. 2961—2968.
- Carroll M. C., Prodeus A. P.** Linkages of innate and adaptive immunity // *Curr. Opin. Immunol.* **1998**. Vol. 10 (1). P. 36—40.
- Carter R. H., Fearon D. T.** CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes // *Science.* **1992**. Vol. 256 (5053). P. 105—107.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F.** et al. Apidaecins: antibacterial peptides from honey-bees // *EMBO J.* **1989**. Vol. 8. P. 2387—2391.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T.** et al. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversation of the precursor structures // *J. Biol. Chem.* **1994**. Vol. 269. P. 28 569—28 575.
- Celli J., Olivier M., Finlay B. B.** Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways // *EMBO J.* **2001**. Vol. 20 (6). P. 1245—1258.
- Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S.** et al. Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells // *Eur. Cytokine Netw.* **2000**. Vol. 11 (2). P. 257—266.
- Chamaillard M., Girardin S. E., Viala J., Philpott D. J.** Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation // *Cell Microbiol.* **2003**. Vol. 5 (9). P. 581—592.
- Chan Y. R., Gallo R. L.** PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas) // *J. Biol. Chem.* **1998**. Vol. 273 (44). P. 28 978—28 985.
- 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, N 36. P. 21 808—21 813.
- Chen C., Durrant H. J., Newton R. P., Ratcliffe N. A.** A study of novel lectins and their involvement in the activation of the prophenoloxidase system in *Blaberus discoidalis* // *Biochem. J.* 1995. Vol. 310 (Pt 1). P. 23—31.
- Chen H. C., Brown J. H., Morell J. L., Huang C. M.** Synthetic magainin analogues with improved antimicrobial activity // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 236 (2). P. 462—466.
- Chenoweth D. E., Hugli T. E.** Human C5a and C5a analogs as probes of the neutrophil C5a receptor // *Mol. Immunol.* 1980. Vol. 17 (2). P. 151—161.
- 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. N 1. P. 81—89.
- Chertov O., Michiel D. F., Xu L. et al.** Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 2935—2940.
- Christensen B., Fink J., Merrifield R. B., Mauzeralla D.** Channel-forming properties of cepropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. Vol. 85. P. 5072—5076.
- Chronos Z. C., Abdolrasulnia R., Whitsett J. A. et al.** Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271 (27). P. 16 375—16 383.
- 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-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., Klebanoff S. J., Einstein A. B., Fefer A.** Peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide system: cytotoxic effect on mammalian tumor cells // *Blood.* 1975. Vol. 45. P. 161—170.
- 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., 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., Szot S., Williams M. A., Kagan H. M.** Oxidation of lysine side-chains of elastin by the myeloperoxidase system and by stimulated neutrophils // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. Vol. 135. P. 451—457.
- Cociancich S., Dupont A., Hegy G. et al.** Novel inducible antibacterial peptides from a Hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus* // *Biochem. J.* 1994. Vol. 300. P. 567—575.
- 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. Biophys. Res. Commun.* **1993b**. Vol. 194, N 1. P. 17—22.
- Cohen J.** The immunopathogenesis of sepsis // *Nature*. **2002**. Vol. 420. H. 885—891.
- Cohn J. R., Uhm T., Ramu S. et al.** Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula* // *Plant Physiol.* **2001**. Vol. 125 (4). P. 2104—2119.
- Cohn Z. A., Hirsch J. G.** The isolation and properties of the specific cytoplasmic granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes // *J. Exp. Med.* **1960a**. Vol. 112, N 6. P. 983—1005.
- Cohn Z. A., Hirsch J. G.** The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med.* **1960b**. Vol. 112, N 6. P. 1015—1022.
- Conlon J. M., Sower S. A.** Isolation of a peptide structurally related to mammalian corticostatin from lamprey *Petromyzon marinus* // *Comp. Biochem. Physiol.* **1996**. Vol. 114B, N 2. P. 133—137.
- Cooper N. R.** Biology of the complement system // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3<sup>rd</sup> ed. / Eds. J. I., Gallin, R. Shydermann. Lippincott Philadelphia, **1999**. P. 281—316.
- Couto M. A., Liu L., Lehrer R. I., Ganz T.** Inhibition of intracellular *Histoplasma capsulatum* replication by murine macrophages that produce human defensin // *Infect. Immunol.* **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.
- Crouch E. C.** Structure, biologic properties, and expression of surfactant protein D (SP-D) // *Biochim. Biophys. Acta.* **1998**. Vol. 1408 (2—3). P. 278—289.
- Crouch E., Wright J. R.** Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense // *Annu Rev. Physiol.* **2001**. Vol. 63. P. 521—554.
- Cruciani R. A., Barker J. L., Zasloff M. et al.** Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation // *Proc. Natl. 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.
- Daher K. A., Lehrer R. I., Ganz T., Kronenberg M.** Isolation and characterization of human defensin cDNA clones // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1988**. Vol. 85. P. 7327—7331.
- Daher K. A., Selsted M. E., Lehrer R. T.** Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins // *J. Virol.* **1986**. Vol. 60, N 3. P. 1068—1074.
- Dalpke A. H., Oppen S., Zimmermann S., Heeg K.** Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs // *J. Immunol.* **2001**. Vol. 166 (12). P. 7082—7089.
- Dangl J. L., Jones J. D.** Plant pathogens and integrated defence responses to infection // *Nature*. **2001**. Vol. 411 (6839). P. 826—833.
- Darveau R. P.** Lipid A diversity and the innate host response to bacterial infection // *Curr. Opin. Microbiol.* **1998**. Vol. 1 (1). P. 36—42.
- David M.** Underhill and Adrian Ozinsky. Toll-like receptors P key mediators of microbe detection // *Curr. Opin. Immunol.* **2002**. Vol. 14. P. 103—110.
- David 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., Pressman B. C., Gianetto R. et al.** Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution paterus of enzymes in liver tissue // *Biochem. J.* 1955. Vol. 60. P. 604—617.
- Dempsey P. W., Allison M. E., Akkaraju S. et al.** C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity // *Science.* 1996. Vol. 271 (5247). P. 348—350.
- De Sousa M., Breedvelt F., Dynesius-Trentham R. et al.** Iron, iron-binding proteins and immune system cells // *Ann. NY Acad. Sci.* 1988. Vol. 526. P. 310—322.
- Diamond G., Jones D. E., Bevins Ch. L.** Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene // *Proc. Natl. 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 5156—5160.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. Vol. 88. P. 3952—3956.
- 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.
- Diebold B. A., Bokoch G. M. et al.** Molecular basis for Rac2 regulation of phagocyte NADPH oxidase // *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2 (3). P. 211—215.
- 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.
- Dohke K.** Studies on prephenoloxidase-activating enzyme from cuticle of the silkworm *Bombyx mori*. II. Purification and characterization of the enzyme // *Arch. Biochem. Biophys.* 1973. Vol. 157 (1). P. 210—221.
- Drazin R. E., Lehrer R. I.** Fungicidal properties of a chymotrypsin-like cationic protein from human neutrophils adsorption to *Candida parapsilosis* // *Infect. Immunol.* 1977. Vol. 17, N 2. P. 382—388.
- Dunne D. W., Resnick D., Greenberg J. et al.** The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes ilpoteichoic acid // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. Vol. 91. P. 1863—1867.
- Durell S. R., Raghunathan G., Guy H. R.** Modeling the ion channel structure of cecropin // *Biophys. J.* 1992. Vol. 63 (6). P. 1623—1631.
- Durstewitz G., Terwilliger N. B.** cDNA cloning of a developmentally regulated hemocyanin subunit in the crustacean *Cancer magister* and phylogenetic analysis of the hemocyanin gene family // *Mol. Biol. Evol.* 1997. Vol. 14 (3). P. 266—276.
- Duvic B., Soderhall K.** Purification and partial characterization of a beta-1,3-glucan-binding-protein membrane receptor from blood cells of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* // *Eur. J. Biochem.* 1992. Vol. 207 (1). P. 223—228.
- East L., Isacke C. M.** The mannose receptor family // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1572 (2—3). P. 364—386.
- Ehrenstein M. R., Leaker B., Isenberg D., Cambridge G.** Production of human monoclonal antibodies to myeloperoxidase // *Immunology.* 1992. Vol. 77 (4). P. 617—620.
- 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, N 47. P. 29 357—29 364.
- Ehrt S., Schnappinger D., Bekiranov S. et al.** Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuber-*

- culosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase // *J. Exp. Med.* **2001**. Vol. 194 (8). P. 1123—1140.
- Eisenhauer P., Harwig S. S., Lehrer R. I.** Cryptdins: antimicrobial defensins of the murine small intestine // *Infect. Immunol.* **1992**. Vol. 60, N 9. P. 3556—3565.
- Eisenhauer P. B., Harwig S. S., Szklarek D.** et al. Purification and antimicrobial properties of three defensins from rat neutrophils // *Infect. Immunol.* **1989**. Vol. 57 (7). P. 2021—2027.
- Eisenhauer P., Harwig S. S., Szklarek D.** et al. Polymorphic expression of defensins in neutrophils from outbred rats // *Infect. Immunol.* **1990**. Vol. 58 (12). P. 3899—3902.
- El-Hag A., Clark R. A.** Immunosuppression by activated human neutrophils. Dependence on the myeloperoxidase system // *J. Immunol.* **1987**. Vol. 139. P. 2406—2413.
- 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. Immunol.* **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  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  // *J. Gen. Microb.* **1990**. Vol. 136. P. 1437—1446.
- Elomaa O., Kangas M., Sahlberg C.** et al. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages // *Cell.* **1995**. Vol. 80 (4). P. 603—609.
- Elsbach P.** Degradation of microorganisms by phagocytic cells // *Rev. Infect. Dis.* **1980**. Vol. 2, N 1. P. 106—128.
- Elsbach P., Weiss J.** Oxygen — independent antimicrobial systems of phagocytes // *Inflammation. Basic principles and clinical correlates* / Eds J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Shydermann. New York, **1992**. P. 603—636.
- Elsbach P., Weiss J.** Bactericidal/permeability increasing protein and host defense against gram-negative bacteria and endotoxin // *Curr. Opin. Immunol.* **1993a**. Vol. 5 (1). P. 103—107.
- Elsbach P., Weiss J.** The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent element in host-defense against gram-negative bacteria and lipopolysaccharide // *Immunobiology.* **1993b**. Vol. 187 (3—5). P. 417—429.
- Elsbach P., Weiss J.** Lipid metabolism by phagocytic cells // *The reticuloendothelial system: a comprehensive treatise. Vol. 2* / Eds H. F. Friedman, M. Escobar, S. Reichard (Biochemistry and metabolism) / Eds A. J. Sbarra, R. R. Strauss. New York, **1980**. P. 91—119.
- Elsbach P., Weiss J.** A reevaluation of the roles of the  $O_2$ -dependent and  $O_2$ -independent microbicidal systems of phagocytes // *Rev. Infect. Dis.* **1983**. Vol. 5, N 5. P. 843—853.
- Emi M., Asaoka H., Matsumoto A.** et al. Structure, organization and, chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene // *J. Biol. Chem.* **1993**. Vol. 268. P. 2120—2125.
- Endo T. A., Masuhara M., Yokouchi M.** et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits YAK kinases // *Nature.* **1997**. Vol. 387. P. 921—924.
- Epstein J., Eichbaum Q., Sheriff S., Ezekowitz R. A. B.** The collectins in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* **1996**. Vol. 8. P. 29—35.
- 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.

- Ezekowitz R. A. B.** Ante-antibody immunity // *Curr. Biol.* 1991. Vol. 1. P. 60—62.
- Ezekowitz R. A. B., Sastry K., Bailly P., Warner A.** Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in COS-1 cells // *J. Exp. Med.* 1990. Vol. 172. P. 1785—1794.
- Falla T. J., Karunartne N., Hancock R.E.W.** Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 19 298—19 303.
- Farner R. L., Dieckmann T., Harwig S. S. et al.** Solution structure of protegrin-I, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leucocytes // *Chem. Biol.* 1996. Vol. 3. P. 543—550.
- Fearon D. T., Carter R. H.** The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity // *Annu Rev. Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 127—149.
- 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 *Drosophilla* induces 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 M. B., Ma M., Goerg S. et al.** Regulation of the B cell response to T-dependent antigens by classical pathway complement // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157 (2). P. 549—556.
- Fleischmann J., Selsted M. E., Lehrer R. I.** Opsonic activity of MCP-I 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. Lond.* 1922. Vol. 93. P. 306—317.
- 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.
- Franc N. C., Dimarcq J.-L., Lagueux M. et al.** Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells // *Immunity.* 1993. Vol. 4. P. 431—443.
- Frank R. W., Gennaro R., Schneider K. et al.** Amino acid sequences of two proline-rich bactericins // *J. Biol. Chem.* 1990. Vol. 265, N 31. P. 18 871—18 874.
- Fraser I. P., Koziel H., Ezekowitz R. A.** The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity // *Semin. Immunol.* 1998. Vol. 10 (5). P. 363—372.
- Freudenberg M. A., Keppler D., Galanos C.** Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin // *Infect. Immunol.* 1986. Vol. 51 (3). P. 891—895.
- Friis P., Svehag S. E., Andersen O. et al.** Conglutinin exhibits a complement-dependent enhancement of the respiratory burst of phagocytes stimulated by *E. coli* // *Immunology.* 1991. Vol. 74 (4). P. 680—684.
- Frohm 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, N 24. P. 15 258—15 263.
- Frohm-Nilsson M., Sandstedt B., Sorensen O. et al.** The human cationic peptide (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous

- epithelia and colocalizes with interleukin-6 // *Infect. Immunol.* **1999.** Vol. 67. P. 2561—2566.
- Fujii N., Minetti C. A., Nakhasi H. L.** et al. Isolation, cDNA cloning, and characterization of an 18-kDa hemagglutinin and amoebocyte aggregation factor from *Limulus polyphemus* // *J. Biol. Chem.* **1992.** Vol. 267 (31). P. 22 452—22 459.
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y.** The lectin-complement pathway its role in innate immunity and evolution // *Immunol. Rev.* **2004.** Vol. 198. P. 185—202.
- 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, N 19. P. 11 333—11 337.
- Furth R.** Development and distribution of mononuclear phagocytes // *Inflammation. Basic principles and clinical correlates* / Eds J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Shydermann. New York, **1992.** P. 325—340.
- 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.
- Gadjeva M., Thiel S., Jensenius J. C.** The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response // *Curr. Opin. Immunol.* **2001.** Vol. 13 (1). P. 74—78.
- Gahr M., Speer C. P., Damerau B., Sawatzki G.** Influence of lactoferrin on the function of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes // *J. Leukocyte Biol.* **1991.** Vol. 49. P. 427—433.
- Gallin J. I.** Neutrophil specific granule deficiency // *Annu Rev. Med.* **1985.** Vol. 36. P. 263—274.
- Gallin J. I.** Disorders of phagocytic cells // *Inflammation. Basic Principles and clinical correlates* / Eds J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Shydermann. New York, **1992.** P. 859—874.
- Gallo R. L., Ono M., Povsic T.** et al. Syndecans, cell surface heparin sulfate proteoglycans, are induced by proline-rich antimicrobial peptide from wounds // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1994.** Vol. 91. P. 11 035—11 039.
- Ganz T.** Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes // *Infect. Immunol.* **1987.** Vol. 55, N 3. P. 568—571.
- Ganz T.** Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides // *Antimicrobial Peptides* / Eds Marsh J., Goode J. A. Ciba Foundation Symposium. Vol. 186. New York: Wiley, **1994.** Vol. 186. P. 62—76.
- Ganz T.** Fatal attraction, evaded: how pathogenic factors resist cationic polypeptides // *J. Exp. Med.* **2001.** Vol. 193. P. F31—F33.
- 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., Selsted M. E., Szklarek D.** et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* **1985.** Vol. 76. P. 1427—1435.
- Gao Y., Lecker S., Post M. J.** et al. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide // *J. Clin. Invest.* **2000.** Vol. 106 (3). P. 439—448.
- Garcia J. R., Jaumann F., Schuiz S.** et al. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction // *Cell Tissue Res.* **2001a.** Vol. 306. P. 257—264.
- Garcia J. R., Krause A., Schuiz S.** et al. Human beta-defensin 4: A novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity // *FASEB J.* **2001b.** Vol. 15. P. 1819—1821.

- 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. Immunol.* 1992. Vol. 60. P. 4754—4761.
- Gennaro R., Dolzani L., Romeo D.** Potency of bactericidal proteins purified from the large granules of bovine neutrophils // *Infect. Immunol.* 1983. Vol. 40, N 2. P. 684—690.
- 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. Biophys. Res. Commun.* 1993. Vol. 197. P. 508—517.
- Gerard C., Gerard N. P.** The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte // *Curr. Opin. Immunol.* 1994. Vol. 6 (1). P. 140—145.
- Gewurz H., Zhang X. H., Lint T. F.** Structure and function of the pentraxins // *Curr. Opin. Immunol.* 1995. Vol. 7 (1). P. 54—64.
- Ghiran I., Barbashov S. F., Klickstein L. B. et al.** Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin // *J. Exp. Med.* 2000. Vol. 192 (12). P. 1797—1808.
- 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.
- Girardin S. E., Sansonetti P. J., Philpott D. J.** Intracellular vs extracellular recognition of pathogens — common concepts in mammals and flies // *Trends Microbiol.* 2002. Vol. 10 (4). P. 193—199.
- Girardin S. E., Tournibize R., Mavris M. et al.** CARD4/Nod1 mediates NF- $\kappa$ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri* // *EMBO Rep.* 2001. Vol. 2 (8). P. 736—742.
- Gleich G. J., Adolphson C. R.** The eosinophilic leukocyte: structure and function // *Adv. Immunol.* 1986. Vol. 39. P. 177—253.
- Gmeiner J., Luderitz O., Westphal O.** Biochemical studies on lipopolysaccharides of *Salmonella* R mutants. 6. Investigations on the structure of the lipid A component // *Eur. J. Biochem.* 1969. Vol. 7 (3). P. 370—379.
- Goldstein J. L., Ho Y. K., Basu S. K., Brown M. S.** Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein producing massive cholesterol deposition // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979. Vol. 76. P. 333—337.
- Gordon S.** Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response // *Cell.* 2002. Vol. 111 (7). P. 927—930.
- Goren M. B.** Phagocyte lysosomes: interactions with infections and experimental perturbations in function // *Ann. Rev. Microbiol.* 1977. Vol. 31. P. 507—533.
- Gray P. W., Flagg G., Leong S. R. et al.** Cloning of the c DNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural and function correlations // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 9505—9509.
- Greenberg S., Chang P., Silverstein S. C.** Tyrosine phosphorylation of the gamma subunit of Fc gamma receptors, p72syk, and paxillin during Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269 (5). P. 3897—3902.
- Griffin F. M. Jr., Griffin J. A., Leider J. E., Silverstein S. C.** Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane // *J. Exp. Med.* 1975. Vol. 142 (5). P. 1263—1282.
- Griffin F. M. Jr., Griffin J. A., Silverstein S. C.** Studies on the mechanism of phagocytosis. II. The interaction of macrophages with anti-immunoglobulin IgG

- coated bone marrow-derived lymphocytes // *J. Exp. Med.* **1976**. Vol. 144 (3). P. 788—809.
- 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., Agerberth B., Odeberg J.** et al. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes // *Eur. J. Biochem.* **1996**. Vol. 238. P. 325—332.
- 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 for the human peptide antibiotic FALL-39 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**. Vol. 92. P. 7085—7089.
- Guina T., Yi E. C., Wang H.** et al. A Pho-P-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides // *J. Bacteriol.* **2000**. Vol. 182. P. 4077—4076.
- Gunn J. S.** PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance // *Mol. Microbiol.* **1998**. Vol. 27. P. 1171—1182.
- Haber F., Weiss J.** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // *Proc. Roy. Soc. Lond.* **1934**. Vol. A147. P. 332—351.
- Hall M., Scott T., Sugumaran M.** et al. Proenzyme of *Manduca sexta* phenol oxidase: purification, activation, substrate specificity of the active enzyme, and molecular cloning // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**. Vol. 92 (17). P. 7764—7768.
- Hampton R. Y., Golenbock D. T., Penman M.** et al. Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors // *Nature.* **1991**. Vol. 352. P. 342—344.
- Hancock R. E. W., Scott M. G.** The role of antimicrobial peptides in animal defenses // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**. Vol. 97. P. 8856—8861.
- Hanzava H., Shimada I., Kuzuhara T.** et al. IH 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. (Letter.)
- Harrison J. E., Pabalan S., Schultz J.** The subunit structure of crystalline canine myeloperoxidase // *Biochim. Biophys. Acta.* **1977**. Vol. 493, N 2. P. 247—259.
- Hartshorn K. L., Crouch E., White M. R.** et al. Pulmonary surfactant proteins A and D enhance neutrophil uptake of bacteria // *Am. J. Physiol.* **1998**. Vol. 274 (6 Pt 1). P. L958—L969.
- Harwig S. S., Swiderek K. M., Kokryakov V. N.** et al. Gallinacins: Cysteine — rich antimicrobial, peptides of chicken leukocytes // *FEBS Lett.* **1994a**. Vol. 342. P. 281—285.
- Harwig S. S., Swiderek K. M., Kokryakov V. N.** et al. Primary structure of gallinacin-I an antimicrobial  $\beta$ -defensin from chicken leukocytes // *Techniques in Protein Chemistry V* / Ed. J. Crabb. **1994b**. P. 49—57.
- Havemann K., Gramse M.** Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes // *Proteases: potent role in health and disease* / Int. Symp. Wursburg. **1984**. P. 1—20.
- Hawkins P. N., Tennent G. A., Woo P., Pepys M. B.** Studies in vivo and in vitro of serum amyloid P component in normals and in a patient with AA amyloidosis // *Clin. Exp. Immunol.* **1991**. Vol. 84 (2). P. 308—316.
- Heeg K., Dalpke A.** TLR-induced negative regulatory circuits: role of suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins in innate immunity // *Vaccine.* **2003**. Vol. 21 Suppl. 2. P. S61—S67.

- Henderson W. R., Jorg A., Klebanoff S. J.** Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, and D<sub>4</sub> // *J. Immunol.* **1982.** Vol. 128 (6). P. 2609—2613.
- Hergenahn H. G., Aspan A., Soderhall K.** Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma // *Biochem. J.* **1987.** Vol. 248 (1). P. 223—228.
- 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.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.* **1974.** Vol. 71. P. 1653—1657.
- Hirsch J. G.** Phagocytin: a bactericidal substance from polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med.* **1956.** Vol. 103, N 5. P. 589—611.
- Hodinka R. L., Modrzakowski M. C.** Bactericidal activity of granule contents from rat polymorphonuclear leukocytes // *Infect. Immunol.* **1983.** Vol. 40, N 1. P. 139—146.
- 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.** The immune response of *Drosophila* // *Nature.* **2003.** Vol. 426 (6962). P. 33—38.
- 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.
- 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.
- Holmes B., Page A. R., Good R. A.** Studies of the metabolic activity of leukocytes from patients with a genetic abnormality of phagocyte function // *J. Clin. Invest.* **1967.** Vol. 46. P. 1422—1432.
- Holmskov U., Malhotra R., Sim R. B., Jensenius J. C.** Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system // *Immunol. Today.* **1994.** Vol. 15 (2). P. 67—74.
- Hortsch M., Goodman C. S.** Cell and substrate adhesion molecules in *Drosophila* // *Annu Rev. Cell Biol.* **1991.** Vol. 7. P. 505—557.
- 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.
- 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, N 39. P. 24 224—24 233.
- Huang H. J., Ross C. R., Blecha F.** Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide // *J. Leukoc. Biol.* **1997.** Vol. 61. P. 624—629.
- Hughes P. E., Pfaff M.** Integrin affinity modulation // *Trends Cell Biol.* **1998.** Vol. 8 (9). P. 359—364.
- Huh C. G., Aldrich J., Mottahedeh J.** et al. Cloning and characterization of Physarum polycephalum tectonins. Homologues of Limulus lectin L-6 // *J. Biol. Chem.* **1998.** Vol. 273 (11). P. 6565—6574.

- Hultmark D.** Immune reactions in *Drosophila* and other insects — a model for innate immunity // *Trends Genet.* 1993. Vol. 9. P. 178—183.
- 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 // *Peroxidases in chemistry and biology* / Eds J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham. Boca Raton, FL, 1991. Vol. 1. P. 37—62.
- Hutchens T. W., Rumball S. V., Lonnerdal B.** (eds). Lactoferrin. Structure and function // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994. 295 p.
- Huttner K. M., Kozak C. A., Bevins C. L.** The mouse genome encodes a single homolog of the antimicrobial peptide human  $\beta$ -defensin 1 // *FEBS Lett.* 1997. Vol. 413. P. 45—49.
- Iannuzzi L., Gallagher D. S., Di Meo G. P.** et al. High-resolution FISH mapping of  $\beta$ -defensin genes to river buffalo and sheep chromosomes suggests a chromosome discrepancy in cattle standard karyotypes // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. Vol. 75. P. 10—13.
- Ilangumaran S., Rottapel R.** Regulation of cytokine receptor signaling by SOCS1 // *Immunol. Rev.* 2003. Vol. 192. P. 196—211.
- Inamori K.-I., Ariki Sh., Kawabata Sh.-I.** A Toll-like receptor in horseshoe crabs // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 198. P. 106—115.
- Inamori K., Saito T., Iwaki D.** et al. A newly identified horseshoe crab lectin with specificity for blood group A antigen recognizes specific O-antigens of bacterial lipopolysaccharides // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274 (6). P. 3272—3278.
- Inohara N., Koseki T., del Peso L.** et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor- $\kappa$ B // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274 (21). P. 14 560—14 567.
- Inohara N., Koseki T., Lin J.** et al. An induced proximity model for NF- $\kappa$ B activation in the Nod1/RICK and RIP signaling pathways // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275 (36). P. 27 823—27 831.
- Inohara N., Ogura Y., Chen F. F.** et al. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276 (4). P. 2551—2554.
- 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.
- Iwanaga S., Kawabata S., Muta T.** New types of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1998. Vol. 123 (1). P. 1—15.
- Iwanaga S., Miyata T., Tokunaga F., Muta T.** Molecular mechanism of hemolymph clotting system in *Limulus* // *Thromb Res.* 1992. Vol. 68 (1). P. 1—32.
- Iyer G. Y. N., Islam D. M. F., Quastel J. H.** Biochemical aspects of phagocytosis // *Nature.* 1961. Vol. 192. P. 535—541.
- Iyer S., Lönnerdal B.** Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism // *Eur. J. Clin. Nutrition.* 1993. Vol. 47. P. 232—241.
- Jacobs A. A., Lew J. E., Paul B. B.** Mycoplasmacidal activity of peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide systems // *Infect. Immunol.* 1972. Vol. 5, N 1. P. 127—131.
- Janeway C. A., Jr.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1989. Vol. 54. P. 1—13.
- Janeway C. A., Jr.** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self // *Immunol. Today.* 1992. Vol. 13. P. 11—16.
- Janeway C. A., Jr.** A trip through my life with an immunological theme // *Annu Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20. P. 1—28.

- Janeway C. A., Medzhitov R.** Innate immune recognition // *Annu Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20. P. 197—216.
- Janoff A., Scherer J.** Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med.* 1968. Vol. 128. P. 1137—1155.
- Ji X., Azumi K., Sasaki M., Nonaka M.** Ancient origin of the complement lectin pathway revealed by molecular cloning of mannan binding protein-associated serine protease from a urochordate, the Japanese ascidian, *Halocynthia roretzi* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. Vol. 94 (12). P. 6340—6345.
- Jiang W., Swiggard W. J., Heufler C.** et al. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing // *Nature.* 1995. Vol. 375. P. 151—155.
- Johansson M. W.** Cell adhesion molecules in invertebrate immunity // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. Vol. 23 (4—5). P. 303—315.
- Johansson M. W., Lind M. I., Holmblad T.** et al. Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. Vol. 216 (3). P. 1079—1087.
- Johansson M. W., Patarroyo M., Oberg F.** et al. Myeloperoxidase mediates cell adhesion via the alpha M beta 2 integrin (Mac-1, CD11b/CD18) // *J. Cell Sci.* 1997. Vol. 110 (Pt 9). P. 1133—1139.
- Johansson M. W., Soderhall K.** Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells // *J. Cell Biol.* 1988. Vol. 106 (5). P. 1795—1803.
- Johansson M. W., Soderhall K.** The prophenoloxidase activating system and associated proteins in invertebrates // *Prog. Mol. Subcell Biol.* 1996. Vol. 15. P. 46—66.
- Jolles P.** Lysozyme, a chapter of molecular biology // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1969. Vol. 8. P. 227.
- Jomori T., Kubo T., Natori S.** Purification and characterization of lipopolysaccharide-binding protein from hemolymph of American cockroach *Periplaneta Americana* // *Eur. J. Biochem.* 1990. Vol. 190 (1). P. 201—206.
- Jones D. E., Bevins C. L.** Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267, N 32. P. 23 216—23 225.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87, N 1. P. 210—214.
- Kalina M., Blau H., Riklis S., Kravtsov V.** Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions // *Am. J. Physiol.* 1995. Vol. 268 (1 Pt 1). P. L144—L151.
- Kang D., Liu G., Lundstrom A.** et al. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95 (17). P. 10 078—10 082.
- Kao R. C., Wehner N. G., Skubitz K. M.** et al. Proteinase 3: A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters // *J. Clin. Invest.* 1988. Vol. 82. P. 1963—1973.
- Kaplan M. H., Volanakis J. E.** Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. I. Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with the choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin // *J. Immunol.* 1974. Vol. 112 (6). P. 2135—2147.
- Karnovsky M. L.** Metabolic basis of phagocytic activity // *Phys. Rev.* 1962. Vol. 42, N 1. P. 143—168.
- Kawabata S., Iwanaga S.** Role of lectins in the innate immunity of horseshoe crab // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. Vol. 23 (4—5). P. 391—400.

- Kini R. M., Evans H. J.** A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptides // *Int. J. Peptide Protein Res.* **1989.** Vol. 134. P. 277—286.
- Kinjyo I., Hanada T., Inagaki-Ohara K.** et al. SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation // *Immunity.* **2002.** Vol. 17 (5). P. 583—591.
- Kinoshita C. M., Gewurz A. T., Siegel J. N.** et al. A protease-sensitive site in the proposed Ca(2+)-binding region of human serum amyloid P component and other pentraxins // *Protein Sci.* **1992.** Vol. 1 (6). P. 700—709.
- Kishimoto T. K., Baldwin E. T., Anderson D.S.** The role of  $\beta 2$  integrins in inflammation // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3<sup>rd</sup> ed. / Eds J. I. Gallin, R. Shydermann. Lippincott Philadelphia, **1999.** P. 537—570.
- Klebanoff S. J.** Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism // *J. Exp. Med.* **1967.** Vol. 126. P. 1063—1078.
- Klebanoff S. J.** Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxidase antibacterial system // *J. Bacteriol.* **1968.** Vol. 96 (5), N 10. 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* / Ed. J. Schultz. Amsterdam, **1970.** P. 89—110.
- Klebanoff S. J.** Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes // *Ann. Intern. Med.* **1980.** Vol. 93. P. 480—489.
- Klebanoff S. J.** Myeloperoxidase: occurrence and biological Function // *Peroxidases in chemistry and biology* / Eds J. Everse, K. E. Everse, M. B. Grisham. Boca Raton, FL, **1991.** P. 1—35.
- Klebanoff S. J.** Oxygen metabolites from phagocytes // *Inflammation. Basic principles and clinical correlates* / Eds J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Shydermann. New York, **1992.** P. 541—588.
- Klebanoff S. J.** Oxygen metabolites from phagocytes // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3<sup>rd</sup> ed. / Eds J. I. Gallin, R. Shydermann. Lippincott Philadelphia, **1999.** P. 721—768.
- Klebanoff S. J., Agosti J. M., Jorg A., Waltersdorph A. M.** Comparative toxicity of the horse eosinophil peroxidase-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-halide system and granule basic proteins // *J. Immunol.* **1989.** Vol. 143, N 1. P. 239—244.
- 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.** 810 p.
- Klebanoff S. J., Henderson W. R., Jong E. C.** et al. Role of peroxidase in eosinophil function // *Immunobiology of the eosinophil* / Ed. T. Yoshida, M. Torisu. **1983.** P. 261—282.
- Klebanoff S. J., Smith D. C.** The source of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the uterine fluid-mediated sperm-inhibitory system // *Biol. Reprod.* **1970.** Vol. 3. P. 236—242.
- 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.
- Kokryakov V. N., Harwig S. S., Panyutich E. A.** et al. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides combine features of corticostatic defensins and facyplelins // *FEBS Lett.* **1993.** Vol. 327, N 2. P. 231—236.
- Kopp E. B., Medzhitov R.** The Toll-receptor family and control of innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* **1999.** Vol. 11. P. 13—18.

- Korneva E. A., Kokryakov V. N.** Defensins: antimicrobial peptides with a broad spectrum of biological activity // *Neuroimmune Biology*. 2003. Vol. 3. P. 451—463.
- Kramer J. M.** Genetic analysis of extracellular matrix in *C. elegans* // *Annu Rev Genet*. 1994. Vol. 28. P. 95—116.
- Kreil G.** Antimicrobial peptides from amphibian skin: an overview // *Antimicrobial Peptides*. Ciba Foundation Symposium N 186 / Ed. J. Goode. Chichester, 1994. P. 77—90.
- Kremlev S. G., Umstead T. M., Phelps D. S.** Effects of surfactant protein A and surfactant lipids on lymphocyte proliferation in vitro // *Am. J. Physiol*. 1994. Vol. 267 (4 Pt 1). P. L357—364.
- Kremlev S. G., Umstead T. M., Phelps D. S.** Surfactant protein A regulates cytokine production in the monocytic cell line THP—1 // *Am. J. Physiol*. 1997. May. Vol. 272 (5 Pt 1). P. L996—1004.
- Krieger M., Stern D. M.** Series introduction: multiligand receptors and human disease // *J. Clin Invest*. 2001. Vol. 108 (5). P. 645—647.
- Kristensen T., Moestrup S. K., Gliemann J. et al.** Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor // *FEBS Lett*. 1990. Vol. 276 (1—2). P. 151—155.
- Kuhlman M., Joiner K., Ezekowitz R. A.** The human mannose-binding protein functions as an opsonin // *J. Exp. Med*. 1989. Vol. 169 (5). P. 1733—1745.
- Kurdowska A., Travis J.** Acute phase protein stimulation by alpha 1-antichymotrypsin-cathepsin G complexes // *J. Biol. Chem*. 1990. Vol. 265. P. 21 023—21 026.
- 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.
- Lachman P. J.** A comparison of some properties of bovine conglutinin with those of rabbit immuno-conglutinin // *Immunology*. 1962. Vol. 5. P. 687—705.
- 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 bacterial peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. P. 262—266.
- Lee C. W., Lewis R. A., Tauber A. I. et al.** The myeloperoxidase-dependent metabolism of leukotrienes C4, D4, and E4 to 6-trans-leukotriene B4 diastereoisomers and the subclass-specific S-diastereoisomeric sulfoxides // *J. Biol. Chem*. 1983. Vol. 258 (24). P. 15 004—15 010.
- Lee I. H., Cho Y., Lehrer R. I.** Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava* // *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1997. Vol. 118B. P. 515—521.
- Lee J. J., Boman A., Chuanxin S. et al.** Antimicrobial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. Vol. 86. P. 9159—9162.
- Lee R. T., Ichikawa Y., Kawasaki T. et al.** Multivalent ligand binding by serum mannose—binding protein // *Arch. Biochem. Biophys*. 1992. Vol. 299 (1). P. 129—136.
- 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 S. J., Evers S., Roeder D. et al.** Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis // *Science*. 2002. Vol. 295 (5561). P. 1898—1901.

- Lee Y. M., Leiby K. R., Allar J. et al.** Primary structure of bovine conglutinin, a member of the C-type animal lectin family // *J. Biol. Chem.* **1991**. Vol. 266 (5). P. 2715—2723.
- Lehrer R. I.** Antifungal effects of peroxidase systems // *J. Bacteriol.* **1969**. Vol. 99, N 2. P. 361—365.
- 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.* **1989**. Vol. 84, N 2. P. 553—561.
- 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., 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., Ganz T.** Antimicrobial polypeptides of human neutrophils // *Blood*. **1990**. Vol. 76, N 11. P. 2169—2181.
- 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*. **1991**. Vol. 64. P. 229—230.
- 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.* **1988**. Vol. 81. P. 1829—1835.
- 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.
- Lemaitre B.** The road to Toll // *Nat. Rev. Immunol.* **2004**. Vol. 4 (7). P. 521—527.
- Lenschow D. J., Walunas T. L., Bluestone J. A. et al.** CD28/B7 system of T cell costimulation // *Annu. Rev. Immunol.* **1996**. Vol. 14. P. 233—258.
- Leonard C., Ratcliffe N. A., Rowley A. F.** The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells // *J. Insect Physiol.* **1985**. Vol. 31. P. 789—799.
- Leong S. R., Camerata T.** Nucleotide sequence of the bovine bactericidal permeability increasing protein (BPI) // *Nucleic Acids Res.* **1990**. Vol. 18. P. 3052.
- Leonova L., Kokryakov V. N., Aleshina G. et al.** Circular minidefensins and posttranslational generation of molecular diversity // *J. Leukocyte Biol.* **2001**. Vol. 70. P. 461—464.
- Leto T. L.** The respiratory burst oxidase // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*, 3<sup>rd</sup> ed. / Eds J. I. Gallin, R. Shydermann. Lippincott Philadelphia, **1999**. P. 769—786.
- Levashina E. A., Langley E., Green C. et al.** Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila* // *Science*. **1999**. Vol. 285. P. 1917—1919.
- Levy D. E., Marie I., Prakash A.** Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity // *Curr. Opin. Immunol.* **2003**. Vol. 15 (1). P. 52—58.
- 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., Weiss J., Zarembek K. et al.** Antibacterial 15-kDa protein isoforms (p15s) are members of a novel family of leukocyte proteins // *J. Biol. Chem.* **1993**. Vol. 268. P. 6058—6063.
- Li J., Post M., Volk R. et al.** PR39, a peptide regulator of angiogenesis // *Nat. Med.* **2000**. Vol. 6. P. 49—55.

- 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.
- Lillard J. W. Jr., Boyaka P. N., Chertov O.** et al. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. Vol. 96. P. 651—656.
- Lindaht G., Sjobring U., Johnsson E.** Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms // *Curr. Opin. Immunol.* 2000. Vol. 12 (1). P. 44—51.
- Liu T. Y., Minetti C. A., Fortes-Dias C. L.** et al. C-reactive proteins, limunectin, lipopolysaccharide-binding protein, and coagulin. Molecules with lectin and agglutinin activities from *Limulus polyphemus* // *Ann. NY Acad. Sci.* 1994. Vol. 712. P. 146—154.
- Lomas D. A., Stone S. R., Llewellyn-Jones C.** et al. The control of neutrophil chemotaxis by inhibitors of cathepsin G and chymotrypsin // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 23 437—23 443.
- Loveless R. W., Feizi T., Childs R. A.** et al. Bovine serum conglutinin is a lectin which binds non-reducing terminal N-acetylglucosamine, mannose and fucose residues // *Biochem. J.* 1989. Vol. 258 (1). P. 109—113.
- Lowenberger C., Bulet P., Charlet M.** et al. Insect immunity: isolation of three novel inducible antibacterial defensins from the vector *Aedes aegypti* // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 1995. Vol. 25. P. 867—873.
- Mac Lead R., Hamilton J., Bateman A.** et al. Corticostatic peptides cause nifedipine-sensitive volume reduction in jejunal villus enterocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. Vol. 88. P. 552—556.
- Madsen H. O., Garred P., Thiel S.** et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein // *J. Immunol.* 1995. Vol. 155. P. 3013—3020.
- Mak P., Wojcik K., Thogersen I. B., Dubin A.** Isolation, antimicrobial activities and primary structure of hamster neutrophil defensins // *Infect. Immunol.* 1996. Vol. 64. P. 4444—4449.
- Malhotra R., Haurum J., Thiel S., Sim R. B.** Interaction of C1q receptor with lung surfactant protein A // *Eur. J. Immunol.* 1992. Vol. 22 (6). P. 1437—1445.
- Maloy W. L., Kari U. P.** Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides // *Biopolymers*. 1995. Vol. 37, N 2. P. 105—122.
- Mandell G. L.** Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils // *Infect. Immunol.* 1974. Vol. 9. P. 337—341.
- Mannion B. A., Kalatzis E. S., Weiss J., Elsbach P.** Preferential binding of the neutrophil granule-derived bactericidal permeability increasing protein to target bacteria // *J. Immunol.* 1989. Vol. 142. P. 2807—2812.
- Mannion B. A., Weiss J., Elsbach P.** Separation of sublethal and lethal effects of polymorphonuclear leukocytes on *Escherichia coli* // *J. Clin. Invest.* 1990a. Vol. 86. P. 631—641.
- Mannion B. A., Weiss J., Elsbach P.** Separation of sublethal and lethal effects of the bactericidal permeability increasing protein on *Escherichia coli* // *J. Clin. Invest.* 1990b. Vol. 85. P. 853—860.
- Mantel Ch., Miyazawa K., Broxmeyer H. L.** Physical characterization and polymerization during iron saturation of lactoferrin, a myelopoietic regulation of lactoferrin, a myelopoietic regulatory molecules with suppressor activity // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1994. Vol. 357. P. 121—132.
- Marmaras V. J., Bournazos S. N., Katsoris P. G., Lambropoulou M.** Defense mechanisms in insects, P. certain integumental proteins and tyrosinase are re-

- sponsible for nonself-recognition and immobilization of *Escherichia coli* in the cuticle of developing *Ceratitis capitata* // Arch. Insect. Biochem. Physiol. 1993. Vol. 23 (4). P. 169—180.
- Masson P. L.** La lactoferrine. Proteine des secretions externes et des leucocyte neutrophiles. Bruxelles, 1970. 232 p.
- Masson P. L., Heremans J. F.** Metal-combining properties of human lactoferrin (red milk protein). I. The involvement of bicarbonate in the reaction // Eur. J. Biochem. 1968. Vol. 6, N 4. P. 579—584.
- Masson P. L., Heremans J. F., Schonke E.** Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes // J. Exp. Med. 1969. Vol. 130, N 3. P. 643—658.
- Matheson N. R., Travis J.** Differential effects of oxidizing agents on human plasma alpha-1-proteinase inhibitor and human neutrophil myeloperoxidase // Biochemistry. 1985. Vol. 24. P. 1941—1945.
- Matheson N. R., Wong D. S., Travis J.** Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. Vol. 88. P. 402—409.
- Matsumoto N., Okada M., Takahashi H.** et al. Molecular cloning of a cDNA assignment of the C-terminal of sarcotoxin IA, a potent antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* // Biochem. J. 1986. Vol. 239. P. 717—722.
- Matsushita M., Fujita T.** Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease // J. Exp. Med. 1992. Vol. 176. P. 1497—1502.
- Matsushita M., Fujita T.** Ficolins and the lectin complement pathway // Immunol Rev. 2001. Vol. 180. P. 78—85.
- Matsushita M., Thiel S., Jensenius J. C.** et al. Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease // J. Immunol. 2000. Vol. 165 (5). P. 2637—2642.
- Matsuyama K., Natori S.** Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* // J. Biol. Chem. 1988. Vol. 263. P. 17 112—17 116.
- Matsuzaki K.** Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1462. P. 1—10.
- Matsuzaki K., Harada M., Handa T.** et al. Magainin I-induced leakage of entrapped calcein out of negatively charged lipid vesicles // Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 1981. P. 130—134.
- Matsuzaki K., Nakamura A., Murase O.** et al. Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge // Biochemistry. 1997. Vol. 36 (8). P. 2104—2111.
- Matsuzaki K., Sugishita K., Fujii N.** Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2 // Biochemistry. 1995. Vol. 34 (10). P. 3423—3429.
- Matzinger P.** Tolerance, danger, and the extended family // Annu Rev. Immunol. 1994. Vol. 12. P. 991—1045.
- Matzinger P.** Introduction to the series. Danger model of immunity // Scand. J. Immunol. 2001. Vol. 54 (1—2). P. 2—3.
- Matzinger P.** The danger model: a renewed sense of self // Science. 2002. Vol. 296 (5566). P. 301—305.
- McCray P. B., Jr., Bentley L.** Human airway epithelia express a beta—defensin // Amer. J. Respirat. Cell Mol. Biol. 1997. Vol. 16. N 3. P. 343—349.
- McKenzie E. J., Su Y.-P., Martinez-Pomares L.** // Trends in Glycoscience and Glycotechnology. 2002. Vol. 14. P. 269—279.
- McPhail L. C., Snyderman R.** Mechanisms of regulating the respiratory burst in leukocytes // Contemp. Top. Immunobiol. 1984. Vol. 14. P. 247—281.

- Medzhitov R., Janeway C.** Innate immunity // *N. Engl. J. Med.* **2000.** Vol. 343. P. 338—344.
- Medzhitov R., Janeway C. A., jr.** Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system // *Science.* **2002.** Vol. 296 (5566). P. 298—300.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C. A., jr.** A human homologue of the *Drosophila* toll protein signals activation of adaptive immunity // *Nature.* **1997.** Vol. 388. P. 394—397.
- Meister M., Braun A., Kappler C. et al.** Insect immunity. A transgenic analysis in *Drosophila* defines several functional domains in the dipterin promoter // *EMBO J.* **1994.** Vol. 13. P. 5958—5966.
- Merrifield R. B., Merrifield E. L., Juvvadi P. et al.** Design and synthesis of antibacterial peptides // *Antimicrobial Peptides. Ciba Foundation Symposium N 186 / Ed. J. Goode. Chichester, 1994.* P. 5—26.
- Merrifield R. B., Vizioli L. D., Boman H. G.** Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A (1—33) // *Biochemistry.* **1982.** Vol. 21 (20). P. 5020—5031.
- Metz-Boutigue M. N., Jolles J., Mazurier J. et al.** Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins // *Eur. J. Biochem.* **1984.** Vol. 145, 3. P. 659—666.
- Michaelson D., Rayner J., Couto M., Ganz T.** Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? // *J. Leuk. Biol.* **1992.** Vol. 51. P. 634—639.
- Miyakawa Y., Ratnakar P., Rao A. et al.** In vitro activity of the antimicrobial peptides human and rabbit defensins and porcine leukocyte protegrin against *Mycobacterium tuberculosis* // *Infect. Immunol.* **1996.** Vol. 64, N 3. P. 926—932.
- Miyasaki K. T., Bodeau A. L.** Human neutrophil azurocidin synergizes with leukocyte elastase and Cathepsin G in the killing of *Capnocytophaga sputigena* // *Infect. Immunol.* **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.
- Miyauchi J., Watanabe Y.** Immunocytochemical localisation of lactoferrin in human neutrophils // *Cell Tissue Res.* **1987.** Vol. 247. P. 249—258.
- Moestrup S. K., Holtet T. L., Etzerodt M. et al.** Alpha 2-macroglobulin-proteinase complexes, plasminogen activator inhibitor type-1-plasminogen activator complexes, and receptor-associated protein bind to a region of the alpha 2-macroglobulin receptor containing a cluster of eight complement-type repeats // *J. Biol. Chem.* **1993.** Vol. 268 (18). P. 13 691—13 696.
- Moguilovsky N., Retegui L. A., Masson P. L.** Comparison of human lactoferrins from milk and neutrophilic leucocytes // *Biochem. J.* **1985.** Vol. 229. P. 353—359.
- Mollinedo F., Schneider D. L.** Subcellular localization of cytochrome b and ubiquinone in a tertiary granules of resting human neutrophils and evidence for a proton pump ATPase // *J. Biol. Chem.* **1984.** Vol. 259. P. 7143—7150.
- Montreuil J., Tonnelat J., Mullet S.** Preparation et proprietes de la lactosiderophiline (lactotransferrine) du lait de femme. *Biochim. Biophys. Acta.* **1960.** 45. 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, N 1. 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., Bevins C. L., Tomassini N. et al.** A novel peptide-producing cell in *Xenopus*: multinucleated gastric mucosal cell strikingly similar to the granular gland of the skin // *J. Histochem. Cytochem.* **1992.** Vol. 40 (3). P. 367—378.

- 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, N 9. P. 3210—3214.
- Morishima I., Suginaka S., Ueno T., Hirano H.** Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides from the silkworm *Bombyx mori* // *Comp. Biochem. Physiol.* 1990. Vol. 95B. P. 551—554.
- Morishita K., Kubota N., Asano S. et al.** Molecular cloning and characterisation 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, N 9. P. 479—484.
- Morrison D. C., Jacobs A.** Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides // *Immunochem.* 1976. Vol. 13. P. 813—818.
- Morrison D. C., Kirikae T., Kirikae F. et al.** The receptor(s) for endotoxin on mammalian cells // *Prog. Clin. Biol. Res.* 1994. Vol. 388. P. 3—15.
- Moser B., Loetscher P.** Lymphocyte traffic control by chemokines // *Nat. Immunol.* 2001. Vol. 2 (2). P. 123—128.
- Muller-Eberhard H. J.** Molecular organization and function of the complement system // *Annu Rev. Biochem.* 1988. Vol. 57. P. 321—347.
- Muller-Eberhard H. J.** Channel-forming proteins of man and amoebae // *Behring Inst. Mitt.* 1992. Vol. 91. P. 138—144.
- Muta T., Iwanaga S.** The role of hemolymph coagulation in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* 1996. Vol. 8. P. 41—47.
- Nair S. V., Pearce S., Green P. L. et al.** A collectin-like protein from tunicates // *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol. Biol.* 2000. Vol. 125 (2). P. 279—289.
- Naito H., Ikeda A., Hasegawa K. et al.** Characterization of human serum mannan-binding protein promoter // *J. Biochem. (Tokyo)*. 1999. Vol. 126 (6). P. 1004—1012.
- Nakagawa R., Naka T., Tsutsui H. et al.** SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses // *Immunity*. 2002. Vol. 17 (5). P. 677—687.
- Nakamura T., Furunaka H., Miyata T. et al.** Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachyplesus tridentatus*) // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263. P. 16 709—16 713.
- Nakamura K., Funakoshi H., Tokunaga F., Nakamura T.** Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. Vol. 1522 (1). P. 53—58.
- 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.
- Nellaiappan K., Sugumaran M.** On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus* // *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 1996. Vol. 113 (1). P. 163—168.
- Nelson M. J., Cowling R. A., Seitz S. P.** Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxigenase // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33 (16). P. 4966—4973.
- 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. 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.
- Nonaka M., Azumi K.** et al. Opsonic complement system of the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* // *Dev. Comp. Immunol.* 1999. Vol. 23 (4—5). P. 421—427.
- Nonaka M., Azumi K., Ji X.** et al. Opsonic complement component C3 in the solitary ascidian, *Halocynthia roretzi* // *J. Immunol.* 1999. Vol. 162 (1). P. 387—391.
- Ochiai M., Ashida M.** Purification of a beta-1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Biol. Chem.* 1988. Vol. 263 (24). P. 12 056—12 062.
- Ochiai M., Ashida M.** A pattern recognition protein for peptidoglycan. Cloning the cDNA and the gene of the silkworm, *Bombyx mori* // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274 (17). P. 11 854—11 858.
- Ochman H., Soncini F. C., Solomon F., Groisman E. A.** Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93 (15). P. 7800—7804.
- Odeberg H., Olofsson T., Olsson I.** Primary and secondary granule contents and bactericidal capability of neutrophils in acute leukemia // *Blood Cells.* 1976. Vol. 2. P. 553—556.
- Odeberg H., Olsson I.** Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes // *Infect. Immunol.* 1976a. Vol. 14. P. 1269—1275.
- Odeberg H., Olsson I.** Microbicidal mechanisms of human granulocyte: synergistic effects of granulocyte elastase and myeloperoxidase on chymotrypsin-like cationic protein // *Infect. Immunol.* 1976b. Vol. 14, N 6. P. 1276—1283.
- Ohl M. E., Miller S. I.** *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis // *Annu Rev. Med.* 2001. Vol. 52. P. 259—274.
- Okrent D. G., Lichtenstein A., Ganz T.** Direct cytotoxicity of PMN granule proteins to human lung-derived cell and endothelial cells // *Am. Rev. Respir. Dis.* 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.
- Olsson I.** Biochemical properties of neutral proteases of human neutrophils // *Movement, metabolism and bactericidal mechanisms of phagocytes* / Eds F. Rossi, P. L. Patriarca, D. Romeo. 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* / Eds K. Havemann, A. Janoff. Baltimore-Munich, 1978. P. 18—32.
- 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.* 1991. Vol. 174. P. 649—655.
- Ooi C. E., Weiss J., Elsbach P.** et al. A 25 kDa NH<sub>2</sub>-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.
- Oram J. D., Reiter B.** Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents // *Biochim. Biophys. Acta.* 1968. Vol. 170, N 3. P. 351—365.
- Ouellette A. J., Greco R. M., James M.** et al. Development regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor in RNA in mouse small intestinal crypt epithelium // *J. Cell. Biol.* 1989. Vol. 108. P. 1687—1695.

- Ourth D. D., Renis H. E.** Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* hemolymph against DNA and RNA viruses in vitro // *Comp. Biochem. Physiol.* **1993**. Vol. 105 (3—4). P. 719—723.
- Ovchinnikova T. V., Aleshina G. M., Balandin S. V.** et al. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina* // *FEBS Lett.* **2004**. Vol. 577. P. 209—214.
- 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.
- Ozinsky A., Smith K. D., Hume D., Underhill D. M.** Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors // *J. Endotoxin Res.* **2000a**. Vol. 6 (5). P. 393—396.
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D.** et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000b**. Vol. 97. P. 13 766—13 771.
- Panyutich A. V., Ganz T.** Activated alpha 2-Macroglobulin is a principal defensin-binding protein // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **1991**. N 5. P. 101—106.
- 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. Clin. Med.* **1993**. Vol. 122, N 2. P. 202—207.
- Panyutich A. V., Voitenok N. N., Lehrer R. I., Ganz T.** An Enzyme immunoassay for human defensins // *J. Immunol. Methods.* **1991**. Vol. 141. P. 149—155.
- Pardi A., Hare D. R., Selsted M. E.** et al. Solution structures of the rabbit neutrophil defensin NP-5 // *J. Mol. Biol.* **1988**. Vol. 201. P. 625—636.
- Parry M. F., Root R. K., Metcalf J. A.** et al. Myeloperoxidase deficiency: Prevalence and clinical significance // *Am. Intern. Med.* **1981**. Vol. 95, N 3. P. 293—301.
- Peiser L., De Winther M. P., Makepeace K.** et al. The class A macrophage scavenger receptor is a major pattern recognition receptor for *Neisseria meningitidis* which is independent of lipopolysaccharide and not required for secretory responses // *Infect Immunol.* **2002**. Vol. 70 (10). P. 5346—5354.
- Peiser L., Mukhopadhyay S., Gordon S.** Scavenger receptors in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* **2002**. Vol. 14 (1). P. 123—128.
- Peppin G. J., Weiss S. J.** Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**. Vol. 83 (12). P. 4322—4326.
- Pepys M. B., Baltz M. L.** Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein // *Adv. Immunol.* **1983**. Vol. 34. P. 141—212.
- Pepys M. B., Butler P. J.** Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**. Vol. 148 (1). P. 308—313.
- Pereira H. A.** CAP37, a neutrophil-derived multifunctional inflammatory mediator // *J. Leuk. Biol.* **1995**. Vol. 57. P. 805—812.
- Pereira H. A., Shafer W. M., Pohl J.** et al. CAP 37, a human neutrophil derived chemotactic factor with monocyte specific activity // *J. Clin. Invest.* **1990**. Vol. 85, N 4. P. 1468—1476.
- Perregaux D. G., Bhavsar K., Contillo L.** et al. Antimicrobial Peptides initiate IL-1beta posttranslational processing: A novel role beyond innate immunity // *J. Immunol.* **2002**. Vol. 168. P. 3024—3032.

- Peschel A. How do bacteria resist human antimicrobial peptides? // *Trends Microbiol.* 2002. Vol. 10. P. 179—186.
- Peschel A., Jack R. W., Otto M. et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprFis based on modification of membrane lipids with L-lysine // *J. Exp. Med.* 2001. Vol. 193. P. 1067—1076.
- Peschel A., Otto M., Jack R. W. et al. Inactivation of the *dlt* operon in Staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. P. 8405—8410.
- Petterson A. Ueber die bacteriziden leukocyten taffe und ihre Beziehung zur Immunität center. *Bacteriol. Parasitink.* 1905. Vol. 139. P. 423—437.
- Pierce A., Colavizza D., Benaissa M. et al. Molecular cloning and sequence analysis of bovine lactotransferrin // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 196. P. 177—184.
- 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.
- Pujol N., Link E. M., Liu L. X. et al. A reverse genetic analysis of components of the Toll signalling pathway in *Caenorhabditis elegans* // *Curr. Biol.* 2001. Vol. 11. P. 809—821.
- Qu X. D., Harwig S. S., Oren A. et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to protegrins // *Infect. Immunol.* 1996. Vol. 64, N 4. P. 1240—1245.
- 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.
- Quie P. G., White J. G., Holmes B., Dood R. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood // *J. Clin. Invest.* 1967. Vol. 46. P. 668—679.
- Quigley J. P., Armstrong P. B. An endopeptidase inhibitor found in *Limulus* plasma: an ancient form of alpha 2-macroglobulin // *Ann. NY Acad. Sci.* 1983. Vol. 421. P. 119—124.
- Rado T. A., Wei X., Benz E. J., Jr. Isolation of lactoferrin RNA from a human myeloid library and expression of mRNA during normal and leukemic myelopoiesis // *Blood.* 1987. Vol. 70. P. 989—993.
- Raetz Ch. R. H. Biochemistry of endotoxins // *Annu. Rev. Biochem.* 1990. Vol. 59. P. 129—170.
- Ranadive N. S., Cochrane C. G. Isolation and characterization of permeability factors from rabbit neutrophils // *J. Exp. Med.* 1968. Vol. 128. P. 605—622.
- Ranadive N. S., Cochrane C. G. Basic proteins in rat neutrophils that increase vascular permeability // *Clin. Exp. Immunol.* 1970. Vol. 6 (6). P. 905—911.
- Rausch P. G., Moore T. G. Granule enzymes of polymorphonuclear neutrophils. A phylogenetic comparison // *Blood.* 1975. Vol. 46, N 6. 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, N 5. P. 2753—2758.
- Rees J. A., Moniatte M., Bulet P. Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apoidea) // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 1997. Vol. 27, N 5. P. 413—422.
- Reichhart J.-M., Georgel P., Meister M. et al. Expression and nuclear translocation of the *rel/NF- $\kappa$ B*-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila* // *C. R. Acad. Sci. Paris. Life Sci.* 1993. Vol. 316. P. 1218—1224.
- Reiter B. The biological significance of lactoferrin // *Int. J. Tiss. React.* 1983. Vol. 1. P. 87—96.

- Renesto P., Halbwegs-Mecarelli L., Nusbaum P. et al.** Proteinase 3: a neutrophil proteinase with activity on platelets // *J. Immunol.* 1994. Vol. 152. P. 4612—4617.
- Reth M.** Antigen receptor tail clue // *Nature.* 1989. Vol. 338 (6214). P. 383—384.
- Rice W. G., Ganz T., Kinkade J. M. et al.** Defensin-rich dense granules of human neutrophils // *Blood.* 1987. Vol. 70, N 3. P. 757—765.
- Rietschel E. T., Brade H.** Bacterial endotoxins // *Sci. Am.* 1992. Vol. 267 (2). P. 54—61.
- Ritonja A., Kopitar M., Jerala R., Turk V.** Primary structure of a new cysteine proteinase inhibitor from pig leucocytes // *FEBS Lett.* 1989. Vol. 255, N 2. P. 211—214.
- Robey F. A., Liu T. Y.** Limulin: a C-reactive protein from *Limulus polyphemus* // *J. Biol. Chem.* 1981. Vol. 256 (2). P. 969—975.
- Robineaux J., Frederic J.** Contribution a l'etude des granulations neutrophiles des polynucléaires par la microcinématographie en contraste de phase // *Comp. Rendus Seances Soc. Biologie (Paris).* 1955. Vol. 149. P. 486—489.
- Root R. K., Cohen M. S.** The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils // *Rev. Infect. Dis.* 1981. Vol. 3, N 3. P. 565—598.
- Rosen G. M., Britigan B. E., Cohen M. S. et al.** Detection of phagocyte-derived free radicals with spin trapping techniques: effect of temperature and cellular metabolism // *Biochim. Biophys. Acta.* 1988. Vol. 969 (3). P. 236—241.
- Rosqvist R., Forsberg A., Rimpilainen M. et al.** The cytotoxic protein YopE of *Yersinia* obstructs the primary host defence // *Mol. Microbiol.* 1990. Vol. 4 (4). P. 657—667.
- Ross G. D.** Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein // *Crit. Rev. Immunol.* 2000. Vol. 20 (3). P. 197—222.
- Ross T. M., Xu Y., Bright R. A., Robinson H. L.** C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge // *Nat. Immunol.* 2000. Vol. 1 (2). P. 127—131.
- Rossi F., Zatti V.** Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes: NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells // *Experientia.* 1964. Vol. 20. P. 21—23.
- Rotrosen D.** The respiratory burst oxidase // *Inflammation: Basic principles and clinical correlates.* Second edition / Eds J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Snydermann. New York, 1992. P. 589—601.
- Royet J.** *Drosophila melanogaster* innate immunity: an emerging role for peptidoglycan recognition proteins in bacteria detection // *Cell Mol. Life Sci.* 2004. Vol. 61 (5). P. 537—546.
- Ruhland G. J.** Occurrence and structure of lipoteichoic acids in the genus *Staphylococcus* // *Arch. Microbiol.* 1990. Vol. 154 (4). P. 375—379.
- Russell D. G.** *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. Vol. 2 (8). P. 569—577.
- Ryan L. K., Rhodes J., Bhat M., Diamond G.** Expression of  $\beta$ -defensin genes in bovine alveolar macrophages // *Infect. Immunol.* 1998. Vol. 66, N 2. P. 878—881.
- Saito T., Kawabata S., Shigenaga T. et al.** A novel big defensin identified in horseshoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity // *J. Biochem.* 1995. Vol. 117. P. 1131—1137.
- Saito H., Miyakawa H., Tamura Y. et al.** Potent bactericidal activity of bovine lactoferrin hydrolysate produced by heat treatment at acidic pH // *J. Dairy Sci.* 1991. Vol. 74. P. 3724—3730.
- Salvesen S., Farley D., Shuman J. et al.** Molecular cloning of human cathepsin G: structural similarity to mast cell and cytotoxic T-lymphocyte proteinases // *Biochemistry.* 1987. Vol. 26, N 8. P. 2289—2293.

- Sandborg R. R., Smolen J. E.** Early biochemical events in leukocyte activation // *Lab. Invest.* 1988. Vol. 59. P. 300—320.
- Sano H., Sohma H., Muta T.** et al. Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14 // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163 (1). P. 387—395.
- Sato S., Masuya H., Numakunai T.** et al. Ascidian tyrosinase gene: its unique structure and expression in the developing brain // *Dev. Dyn.* 1997. Vol. 208 (3). P. 363—374.
- Saul S. J., Sugumaran M.** Protease inhibitor controls prophenoloxidase activation in *Manduca sexta* // *FEBS Lett.* 1986. Vol. 208 (1). P. 113—116.
- Scarnes R. C., Watson D. W.** Characterization of leukin: an antibacterial factor from leucocytes active against gram-positive pathogens // *J. Exp. Med.* 1956. Vol. 104, N 6. P. 829—845.
- Schiffmann E., Corcoran B. A., Wahl S. M.** N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. Vol. 72 (3). P. 1059—1062.
- Schlesinger L. S.** Role of mononuclear phagocytes in *M tuberculosis* pathogenesis // *J. Investig. Med.* 1996. Vol. 44 (6). P. 312—323.
- Schonwetter B. S., Stolzenberg E. D., Zasloff M. A.** Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation // *Science.* 1995. Vol. 267. P. 1645—1648.
- Schroder J. M., Harder J.** Human beta-defensin-2 // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999. Vol. 31. P. 645—651.
- Schultz J., Baker A., Tucker B.** Myeloperoxidase — enzymotherapy of rat mammary tumors // *Cancer enzymology.* 1976. New York, P. 319—333.
- Schultz J., Kaminker K.** Myeloperoxidase of the leucocyte of normal human blood. 1. Content and localization // *Arch. Biochem. Biophys.* 1962. Vol. 96. P. 465—467 (71).
- Schumann R. R.** Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review // *Res. Immunol.* 1992. Vol. 143 (1). P. 11—15.
- Seery L. T., Schoenberg D. R., Barbaux S.** et al. Identification of a novel member of the pentraxin family in *Xenopus laevis* // *Proc. Biol. Sci.* 1993. Vol. 253 (1338). P. 263—270.
- Segal A. W.** Components of the microbicidal oxidase of phagocytes // *Biochem. Soc. Trans.* 1991. Vol. 19, N 1. P. 49—50.
- Segal A. W., Jones O. T. G.** Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles of human granulocytes // *Nature.* 1978. Vol. 276. P. 515—517.
- Segal A. W., West I., Wientjies F.** et al. Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes // *Biochem. J.* 1992. Vol. 284. P. 781—788.
- Segal G. P., Lehrer R. I., Selsted M.** In vitro effect of phagocyte cationic peptides on *Coccidioides immitis* // *J. Infect. Dis.* 1985. Vol. 151. P. 890—894.
- 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., 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., Brown D. M., De Lange R. J., Lehrer R. I.** Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages // *J. Biol. Chem.* 1983. Vol. 258, N 23. P. 14 485—14 489.
- Selsted M. E., Harwig S. S.** Purification, primary structure and antimicrobial activities of a guinea pig neutrophil defensin // *Infect. Immunol.* 1987. Vol. 55, N 9. P. 2281—2286.

- 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., Miller S. I., Henschen A. H., Ouellette A. J. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense // *J. Cell Biol.* 1992. N 118. P. 929—936.
- Selsted M. E., Szklarek D., Ganz T., Lehrer R. I. Activity of rabbit leukocyte peptides against *Candida albicans* // *Infect. Immunol.* 1985c. Vol. 49. P. 202—206.
- Selsted M. E., Szklarek D., Lehrer R. I. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes // *Infect. Immunol.* 1984. Vol. 45. P. 150—154.
- Selsted M. E., Tang Y. Q., Morris W. L. et al. Purification primary structures, and antibacterial activity of  $\beta$ -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N 9. P. 6641—6648.
- Selvaraj R. J., Paul B. B., Strauss R. R. et al. Oxidative peptide cleavage and decarboxylation by the MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl antimicrobial system // *Infect. Immunol.* 1974. Vol. 9. P. 255—260.
- Sen R., Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism // *Cell.* 1986. Vol. 47 (6). P. 921—928.
- Senior R. M., Gresham H. D., Griffin G. L. et al. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin // *J. Clin. Invest.* 1992. Vol. 90 (6). P. 2251—2257.
- Shafer W. M., Qu X., Waring A. J., Lehrer R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance /modulation/ division efflux pump family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. P. 1829—1833.
- Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. Vol. 462. P. 55—70.
- Shamova O., Brodgen K. A., Zhao Ch. et al. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes // *Infect. Immunol.* 1999. Vol. 67. P. 4256—4259.
- 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.
- Shi J., Ross C. R., Leto T. L., Blecha F. PR-39, a proline-rich antibacterial peptide that inhibits phagocyte NADPH oxidase activity by binding to Src homology 3 domains of p47 phox // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. Vol. 93. P. 6014—6018.
- Shinnar A. E. et al. Peptide Chemistry, Structure and Biology / Eds P. T. P. Kaurmaya, R. S. Hodges // *Proceedings of the 12th American Peptide Symposium.* London, 1996. P. 189—191.
- Siebens H., Tevethia S. S., Babior B. Neutrophil-mediated antibody killing of herpes-simplex-infected cells // *Blood.* 1979. Vol. 54. P. 88—97.
- Sinha S., Watorek W., Karr S. et al. Primary structure of human neutrophil elastase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. Vol. 84. P. 2228—2232.
- Smith L. C., Shih C. S., Dachenhausen S. G. Coelomocytes express SpBf, a homologue of factor B, the second component in the sea urchin complement system // *J. Immunol.* 1998. Vol. 161 (12). P. 6784—6793.
- Snyderman R., Gewurz H., Mergenhagen S. E. Interactions of the complement system with endotoxic lipopolysaccharide. Generation of a factor chemotactic

- for polymorphonuclear leukocytes // *J. Exp. Med.* **1968**. Vol. 128 (2). P. 259—275.
- Soderhall K., Cerenius L., Johansson M. W.** The prophenoloxidase activating system in invertebrates // *New directions in invertebrate immunology* / Eds K. Soderhall, L. Cerenius, M. W. Johansson. Fair heaven. SOS Publications. **1996**. P. 229—253.
- Soderhall K., Cerenius L., Johansson M. W.** The prophenoloxidase activating system and its role in invertebrate defence // *Ann. NY Acad. Sci.* **1994**. Vol. 712. P. 155—161.
- Soderhall K., Rogener W., Soderhall I. et al.** The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhances the activation of hemocyte prophenoloxidase by a  $\beta$ -1,3-glucan // *Insect Biochem.* **1988**. Vol. 18. P. 323—330.
- Soderhall K., Smith V. J.** Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution // *Dev. Comp. Immunol.* **1983**. Vol. 7 (2). P. 229—239.
- Soderhall K., Unestam T.** Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity. The specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase // *Can. J. Microbiol.* **1979**. Vol. 25 (3). P. 406—414.
- Soderhall K.** Fungal cell wall beta-1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate // *Dev. Comp. Immunol.* **1981**. Vol. 5 (4). P. 565—573.
- Soderhall K.** Prophenoloxidase activating system and melanization — a recognition mechanism of arthropods? // *Dev. Comp. Immunol.* **1982**. Vol. 6 (4). P. 601—611.
- 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, N 1. P. 55—99.
- Spitznagel J. K.** Non-oxidative antimicrobial actions of leukocytes // *Contemporary topics in immunobiology. Regulation of leukocyte function* / Ed. R. Snyderman. New York, **1984**. Vol. 14. P. 283—343.
- Spitznagel J. K.** Antibiotic proteins of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* **1990**. Vol. 86, N 4. P. 1381—1386.
- Spitznagel J. K., Chi H.-J.** Cationic protein and antibacterial properties of infected tissues and leukocytes // *Am. J. Pathol.* **1963**. Vol. 43, N 4. P. 697—711.
- 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, N 1. 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.
- Spitznagel J. K., Modrzakowski M. C., Pryzwansky K. B., MacRae E. K.** Neutral proteases of human polymorphonuclear granulocytes: putative mediators of pulmonary damage // *Environ. Health. Perspect.* **1980**. Vol. 35. P. 29—38.
- Staats H. F., Ennis F. A., Jr.** IL-1 is an effective adjuvant for mucosal and systemic immune responses when coadministered with protein immunogens // *J. Immunol.* **1999**. Vol. 162 (10). P. 6141—6147.
- Stahl P. B., Ezekowitz R. A.** The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense // *Curr. Opin. Immunol.* **1998**. Vol. 10 (1). P. 50—55.

- 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. N 12. P. 5933—5935.
- Starkey P. M., Barrett A. J.** Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties // *Biochem. J.* 1976. Vol. 155. P. 273—278.
- Starkey P. M., Barrett A. J.**  $\alpha$ 2-Macroglobulin, a physiological regulator of proteinase activity // *Proteinases in mammalian cells and tissues* / Ed. A. J. Barrett. Amsterdam, 1977. P. 663—696.
- Steiner H.** Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity // *Immunol. Rev.* 2004. Vol. 198. P. 83—96.
- 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.
- Stoiber D., Kovarik P., Cohnhey S. et al.** Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163 (5). P. 2640—2647.
- Stollar B. D., Rezuze W.** Separation of anti-histone antibodies from nonimmune histone-precipitating serum proteins, predominantly alpha2-macroglobulin // *Arch. Biochem. Biophys.* 1978. Oct. Vol. 190 (2). P. 398—404.
- Storici P., Zanetti M.** A cDNA derived from pig bone marrow cells predicts a sequence identical to the intestinal antibacterial peptide PR-39 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993a. Vol. 196. P. 1058—1065.
- Storici P., Zanetti M.** A novel cDNA sequence encoding a pig leukocyte antimicrobial peptide with a cathelin-like prosequence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993b. Vol. 196, N 3. P. 1363—1368.
- 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.
- Suchard S. J., Hinkovska-Galcheva V., Mansfield P. J. et al.** Ceramide inhibits IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes // *Blood*. 1997. Vol. 89 (6). P. 2139—2147.
- Sultzzer B. M.** Genetic control of leucocyte responses to endotoxin // *Nature*. 1968. Vol. 219. P. 1253—1254.
- Sun S. C., Faye I.** Affinity purification and characterization of CIF, an insect immunoresponsive factor with NF- $\kappa$ B-like properties // *Comp. Biochem. 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  $\kappa$ B // *Eur. J. Biochem.* 1992b. Vol. 204. P. 885—892.
- Suzuki H., Kurihara Y., Takeya M. et al.** A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection // *Nature*. 1997. Vol. 336. P. 292—296.
- Suzuki T., Saito-Takli T., Sadasivan R., Nitta T.** Biochemical signal transmitted by Fc gamma receptors: phospholipase A2 activity of Fc gamma 2b receptor of murine macrophage cell line P388D1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1982. Vol. 79 (2). P. 591—595.
- Swenson R. P., Howard J. B.** Characterization of alkylamine-sensitive site in alpha 2-macroglobulin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76 (9). P. 4313—4316.

- Szalai A. J., Agrawal A., Greenhough T. J., Volanakis J. E.** C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function // *Immunol. Res.* 1997. Vol. 16 (2). P. 127—136.
- Szalai A. J., Brites D. E., Volanakis J. E.** Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae* // *Infect. Immunol.* 1996. Vol. 64 (11). P. 4850—4853.
- Tamamura H., Murakami T., Horiuchi S. et al.** Synthesis of protegrin-related peptides and their antibacterial and antihuman 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  $\beta$ -defensin peptide from bovine neutrophils // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, N 9. P. 6649—6653.
- Tang Y. Q., Yuan J., Miller C. J., Selsted M. E.** Isolation, characterization, cDNA cloning, and antimicrobial properties of two distinct subfamilies of  $\alpha$ -defensins from rhesus macaque leucocytes // *Infect. Immunol.* 1999a. Vol. 67. P. 6139—6144.
- Tang Y. Q., Yuan J., Osapay G. et al.** A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins // *Science.* 1999b. Vol. 286. P. 498—502.
- Tani K., Murphy W. J., Chertov O. et al.** Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens // *Int. Immunol.* 2000. Vol. 12. P. 691—700.
- Tarver A. P., Clark D. P., Diamond G. et al.** Enteric  $\beta$ -defensins: molecular cloning and characterization of a gene with inducible intestinal epithelial cell expression associated with *Cryptosporidium parvum* infection // *Infect. Immunol.* 1998. Vol. 66, N 3. P. 1045—1056.
- Ten R. M., Pease L. R., McKean D. J. et al.** Molecular cloning of the human eosinophil peroxidase // *J. Exp. Med.* 1989. Vol. 169. P. 1757—1769.
- Tennent G. A., Pepys M. B.** Glycobiology of the pentraxins // *Biochem. Soc. Trans.* 1994. Vol. 22 (1). P. 74—79.
- Territo M. C., Ganz T., Selsted M. E., Lehrer R.** Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1989. Vol. 84. 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.
- Thiel S., Petersen S. V., Vorup-Jensen T. et al.** Interaction of C1q and mannan-binding lectin (MBL) with C1r, C1s, MBL-associated serine proteases 1 and 2, and the MBL-associated protein MAP19 // *J. Immunol.* 2000. Vol. 165 (2). P. 878—887.
- Thiel S., Vorup-Jensen T., Stover C. M. et al.** A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement // *Nature.* 1997. Vol. 386 (6624). P. 506—510.
- Thomas E. L.** Myeloperoxidase, hydrogen peroxide, chloride antimicrobial system: nitrogen-chloride derivatives of bacterial components in bactericidal action against *Escherichia coli* // *Infect. Immunol.* 1979. Vol. 23, N 2. P. 522—531.
- Thomas E. L., Aune T. M.** Peroxidase-catalyzed oxidation of protein sulfhydryls mediated by iodine // *Biochemistry.* 1977. Vol. 16, N 16. 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.

- Thogersen I. B., Salvesen G., Brucato F. H.** et al. Purification and characterization of an alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the mollusc *Octopus vulgaris* // *Biochem. J.* 1992. Vol. 285 (Pt 2). P. 521—527.
- Thorne K. J. I., Oliver R. C., Barrett A. J.** Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases // *Infect. Immunol.* 1976. Vol. 14, N 2. P. 555—563.
- Thornqvist P. O., Johansson M. W., Soderhall K.** Opsonic activity of cell adhesion proteins and beta-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans // *Dev. Comp. Immunol.* 1994. Vol. 18 (1). P. 3—12.
- Tino M. J., Wright J. R.** Surfactant protein A stimulates phagocytosis of specific pulmonary pathogens by alveolar macrophages // *Am. J. Physiol.* 1996. Vol. 270 (4 Pt 1). P. L677—688.
- Tobias P. S., Soldau K., Gegner J. A.** et al. Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14 // *J. Biol. Chem.* 1995. Vol. 270. P. 10 482—10 488.
- Tobias P. S., Soldau K., Ulevitch R. J.** Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein // *J. Biol. Chem.* 1989. Vol. 264. P. 10 867—10 871.
- Tobias P. S., Ulevitch R. J.** Lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in the lipopolysaccharide-dependent activation of cells // *Chest.* 1994. Vol. 105 (3 Suppl.). P. 48S—50S.
- Toh Y., Mizutani A., Tokunaga F.** et al. Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances // *Cell Tiss. Res.* 1991. Vol. 266. P. 137—147.
- Tomita M., Takase M., Wakabayashi H., Bellamy W.** Antibacterial peptides of lactoferrin // *Adv. Exper. Med. Biol.* 1994. Vol. 357. P. 209—218.
- Tonegawa S.** Somatic generation of immune diversity // *Biosci Rep.* 1988. Vol. 8 (1). P. 3—26.
- Tschopp J., Martinon F., Burns K.** NALPs: a novel protein family involved in inflammation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003. Vol. 4 (2). P. 95—104.
- Turner M. W.** Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system // *Immunol. Today.* 1996. Vol. 17 (11). P. 532—540.
- Turner M. W.** Mannose-binding lectin (MBL) in health and disease // *Immunobiology.* 1998. Vol. 199 (2). P. 327—339.
- Tydell C. C., Yount N., Tran D.** et al. Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277 (22). P. 19 658—19 664.
- Ulevitch R. J.** Therapeutics targeting the innate immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2004. Vol. 4 (7). P. 512—520.
- Ulevitch R. J., Mathison J. C., Schumann R. R., Tobias P. S.** A new model of macrophage stimulation by bacterial lipopolysaccharide // *J. Trauma.* 1990. Vol. 30 (12 Suppl). P. S189—192.
- Unanue E. R.** Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance // *Curr. Opin. Immunol.* 1997. Vol. 9 (1). P. 35—43.
- Underhill D. M., Ozinsky A.** Phagocytosis of microbes: complexity in action // *Annu Rev. Immunol.* 2002. Vol. 20. P. 825—852.
- Underhill D. M., Ozinsky A., Smith K. D., Aderem A.** Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. Vol. 96 (25). P. 14 459—14 463.
- Unestam T., Soderhall K.** Soluble fragments from fungal cell walls elicit defence reactions in crayfish // *Nature.* 1977. Vol. 267 (5607). P. 45—46.

- Valore E., Ganz T.** Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells // *Blood*. 1992. Vol. 79, N 6. P. 1538—1544.
- Van Wetering S., Mannesse-Lazeroms S. P., Dijkman J. H., Hiemstra P. S.** Effect of neutrophil serine proteinases and defensins on lung epithelial cells: Modulation of cytotoxicity and IL-8 production // *J. Leukoc Biol*. 1997. Vol. 62. P. 217—226.
- Vasta G. R., Ahmed H.** Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species // *Prog. Mol. Subcell. Biol*. 1996. Vol. 17. P. 158—182.
- Vella A. T., McCormack J. E., Linsley P. S.** et al. Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death // *Immunity*. 1995. Vol. 2 (3). P. 261—270.
- 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 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. Dis*. 1995a. Vol. 172. P. 144—151.
- Vorup-Jensen T., Petersen S. V., Hansen A. G.** et al. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2 // *J. Immunol*. 2000. Vol. 165 (4). P. 2093—2100.
- Wade D., Boman A., Wahlin B.** et al. All D-amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 4761—4765.
- Walton E.** The preparation, properties and action on *Staphylococcus aureus* of purified fractions from the cationic proteins of rabbit polymorphonuclear leukocytes // *Brit. J. Exp. Path.* 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. Path.* 1976. Vol. 57. P. 560—570.
- Wang W., Cole A. M., Hong T.** et al. Retrocyclin, an antiretroviral  $\theta$ -defensin, is a lectin // *J. Immunol*. 2003. Vol. 170. P. 4708—4716.
- Wang W., Owen Sh., Rudolph D.** et al. // Activity of  $\alpha$ - and  $\theta$ -defensins against primary isolates of HIV-1 // *J. Immunol*. 2004. Vol. 173. P. 515—520.
- Watson J., Kelly K., Largen M., Taylor B. A.** The genetic mapping of a defective LPS response gene in C3H/HeJ mice // *J. Immunol*. 1978. Vol. 120. P. 422—424.
- Watson R. W. G., Redmond H. P., Bouchier-Hayes D.** Role of endotoxin in mononuclear phagocyte — mediated inflammatory responses // *J. Leuk. Biol*. 1994. Vol. 56. P. 95—103.
- Watson J., Riblet R., Taylor B. A.** The response of recombinant inbred strains of mice to bacterial lipopolysaccharides // *J. Immunol*. 1977. Vol. 118. P. 2088—2093.
- Webster J. I., Tonelli L., Sternberg E.** Neuroendocrine regulation of immunity // *Annu. Rev. Immunol*. 2002. Vol. 20. P. 125—163.
- Weinberg E. D.** Iron withholding: a defense against infection and neoplasia // *Phys. Revs*. 1984. Vol. 64, N 1. P. 65—102.
- Weis W. I., Drickamer K.** Structural basis of lectin-carbohydrate recognition // *Annu Rev. Biochem*. 1996. Vol. 65. P. 441—473.

- 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, N 8. P. 2664—2672.
- Weiss J., Elsbach P., Shu C.** et al. Human bactericidal-permeability-increasing protein and a recombinant NH<sub>2</sub>-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., 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 S. J., Peppin G., Ortiz X.** et al. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils // *Science.* 1985. Vol. 227. P. 747—749.
- Werner T., Borge-Renberg K., Mellroth P.** et al. Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278 (29). P. 26 319—26 322.
- Westerhoff H. V., Juretic D., Hendler R. W., Zasloff M.** Magainin and the disruption of membrane-linked free-energy transduction // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. Vol. 86. P. 6597—6601.
- White S. H., Wimley W. C., Selsted M. E.** Structure, function, and membrane integration of defensins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1995. Vol. 5. P. 521—527.
- Wild J., Robinson D., Winchester B.** Isolation of mannose-binding proteins from human and rat liver // *Biochem. J.* 1983. Vol. 210 (1). P. 167—174.
- Williams L. T., Snyderman R., Pike M. C., Lefkowitz R. J.** Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. Vol. 74a(3). P. 1204—1208.
- Williams R. W., Starman R., Taylor K. M.** et al. Raman spectroscopy of synthetic antimicrobial frog peptides magainin 2a and PGLa // *Biochemistry.* 1990. Vol. 29 (18). P. 4490—4496.
- Willment J. A., Gordon S., Brown G. D.** Characterization of the human beta-glucan receptor and its alternatively spliced isoforms // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276 (47). P. 43 818—43 823.
- Wilson M. E., Pearson R. D.** Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes // *Infect. Immunol.* 1988. Vol. 56 (2). P. 363—369.
- Wright C. D., Nelson R. D.** Candidacidal activity of myeloperoxidase: therapeutic influence of the enzyme in vivo // *Infect. Immunol.* 1985. Vol. 47, N 2. P. 363—365.
- 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 S. D., Ramos R. A., Tobias P. S.** et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharides (LPS) and LPS binding protein // *Science.* 1990. Vol. 249. P. 1431—1433.
- Wu N. C., Schultz J.** The prosthetic group of myeloperoxidase // *FEBS Lett.* 1975. Vol. 60, N 1. P. 141—144.
- Yamashita T., Saito K.** Purification, primary structure and biological activity of guinea pig neutrophil cationic peptides // *Infect. Immunol.* 1989. Vol. 57, N 8. P. 2405—2409.

- Yang D., Biragyn A., Kwak L. W., Oppenheim J. J.** Mammalian defensins in immunity: More than just microbicidal // *Trends Immunol.* **2002.** Vol. 23. P. 291—296.
- Yang D., Chen Q., Chertov O., Oppenheim J. J.** Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells // *J. Leukoc. Biol.* **2000b.** Vol. 68. P. 9—14.
- Yang D., Chen Q., Schmidt A. P.** et al. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells // *J. Exp. Med.* **2000.** Vol. 192. P. 1069—1074.
- Yang D., Chertov O., Bykovskaia S. N.** et al. Beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 // *Science.* **1999.** Vol. 286. P. 525—528.
- Yeaman M. R., Yount N. Y.** Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance // *Pharmacol. Rev.* **2003.** Vol. 55. P. 27—55.
- Ying S. C., Gewurz A. T., Jiang H., Gewurz H.** Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14—26 and 76—92 of the A chain collagen-like region of C1q // *J. Immunol.* **1993.** Vol. 150 (1). P. 169—176.
- Yoshida H., Ochiai M., Ashida M.** Beta-1,3-glucan receptor and peptidoglycan receptor are separate entities within insect prophenoloxidase activating system // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986.** Vol. 141 (3). P. 1177—1184.
- Yoshimura A., Lien E., Ingalls R. R.** et al. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2 // *J. Immunol.* **1999.** Vol. 163 (1). P. 1—5.
- Yu B., Hailman E., Wright S. D.** LPS binding protein (LSB) and sCD14 catalyze exchange of phospholipids // *J. Clin. Invest.* **1997.** Vol. 99. P. 315—324.
- Yu B., Wright S. D.** Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: I. Transfer of LPS to soluble CD14 // *J. Biol. Chem.* **1996.** Vol. 271. P. 4100—4105.
- 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. Path.* **1989.** Vol. 70. P. 697—704.
- Zamze S., Martinez-Pomares L., Jones H.** et al. Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor // *J. Biol. Chem.* **2002.** Vol. 277 (44). P. 41 613—41 623.
- 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.
- Zasloff M.** Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms and partial cDNA sequence of a precursor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987.** Vol. 84. P. 5449—5453.
- Zasloff M.** Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature.* **2002.** Vol. 415. P. 389—395.
- Zasloff M., Martin B., Chen H. C.** Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues // *Proc. Natl. 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.** Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities // *J. Bacteriol.* **1966a.** 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.* 1966b. 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.* 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. Med.* 1966. Vol. 121, N 1. P. 250—253.
- Zgliczynski J. M., Stelmaszynska 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.
- Zhang G., Wu H., Shi J.** et al. Molecular cloning and tissue expression of porcine  $\beta$ -defensin-1 // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 424, N 1. P. 37—40.
- Zhao C., Ganz T., Lehrer R. I.** The structure of porcine protegrin genes // *FEBS Lett.* 1995. Vol. 368. P. 197—202.
- 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., Nguyen T., Boo L. M.** et al. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. Vol. 45. P. 2695—2702.
- Zhao C., Nguyen T., Liu L.** et al. Differential expression of caprine beta-defensins in digestive and respiratory tissues // *Infect. Immunol.* 1999. Vol. 67 (11). P. 6221—6224.
- Zhao C., Wang I., Lehrer R. I.** Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells // *FEBS Lett.* 1996. Vol. 396. P. 319—322.
- 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.
- Zhu Q., Hu J., Mulay S.** et al. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. N 85. P. 592—596.
- Zhu Q., Singh A. V., Bateman A.** et al. The corticostatic (anti-ACTH) and cytotoxic activity of peptides isolated from fetal, adult and tumor-bearing lung // *J. Steroid Biochem.* 1987. Vol. 27. P. 1017—1022.
- Zimmer M., Medcalf R. L., Fink T. M.** et al. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19 pter // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. Vol. 89 (17). P. 8215—8219.
- Zimmerman G. R., Legault P., Selsted M. E., Pardi A.** Solution structure of bovine p-defensin-12: the peptide fold of the  $\beta$ -defensins is identical to that of the classical defensins // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. P. 13 663—13 671.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

$\alpha_2$ М	— $\alpha_2$ -макроглобулин
$\beta$ -ГСБ	— $\beta$ -1,3-гликансвязывающий белок
АКТГ	— аденокортикотропный гормон
АЛФ	— аполактоферрин
АП	— антибиотический пептид
АПК	— антигенпредставляющая клетка
БПУ белок	— бактерицидный проницаемостьувеличивающий белок
ГДФ	— гуанозиндифосфат
ГТФ	— гуанозинтрифосфат
ИЛ	— интерлейкин
ИФН	— интерферон
КДО	— 2-кето-3-дезоксиктоновая кислота
ЛПВП	— липопротеиды высокой плотности
ЛПНП	— липопротеиды низкой плотности
ЛПС	— липополисахарид
ЛСБ	— липополисахаридсвязывающий белок
ЛТК	— липотейхоевые кислоты
ЛФ	— лактоферрин
МО $\beta$ ДГ	— метил 4,6-О(1-карбоксизетилиден)- $\beta$ Д-галактопиранозид
МПО	— миелопероксидаза
МСЛ	— маннозо(маннан)-связывающий лектин
НАДФН	— восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НГ	— нейтрофильные гранулоциты
ПАМП	— патогенассоциированные молекулярные паттерны
ПРР	— паттернраспознающие рецепторы
ПРР(М)	— паттернраспознающие рецепторы (молекулы)
ПФО	— профенолоксидаза
ПФОАФ	— профенолоксидазоактивирующий фермент
САП	— сывороточный амилоид Р
СР	— сквенджер рецептор
СРБ	— С-реактивный белок
ТПР	— Толл-подобный рецептор
ТР	— Толл-рецептор
УРД	— углеводраспознающий домен
ФАД	— флавинадениндинуклеотид
ФНО $\alpha$	— фактор некроза опухолей $\alpha$
ФО	— фенолоксидаза

ХГБ	— хроническая гранулематозная болезнь
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота
ЭПО	— эозинфильная пероксидаза
ЯМР	— ядерный магнитный резонанс
Вас	— bactenecin (бактенецин)
BCR	— B cell receptors (рецепторы В-лимфоцитов)
СЗ(Н <sub>2</sub> О)	— активированная в водной среде форма СЗ-компонента комплемента
CARD	— caspase recruitment domain (каспазомобилизирующий домен)
Cif	— Cecropia immune-responsiveness factor
СрG	— цитозин-фосфат-гуанин
CR	— complement receptor (рецептор комплемента)
CRD	— carbohydrate-recognition domain
Dif	— dorsal-related immunity factor
Gal	— gallinacin (галлинацин)
GM-CSF	— гранулоцит/моноцит колоннестимулирующий фактор
HBD	— human beta-defensin (β-дефенсин человека)
hCAP18	— human cationic antimicrobial protein 18 kD
HNP	— human neutrophil peptide (дефенсин человека)
hsp	— heat shock proteins (белки теплового шока)
Ig	— иммуноглобулин
IKK	— Inhibitory κB kinase
IL-18R	— рецептор интерлейкина 18
IL-1R	— рецептор интерлейкина 1
IRAK	— IL-1 receptor-associated kinase
ITAM	— immunoreceptor tyrosine activation motif
ITIM	— immunoreceptor tyrosine inhibited motif
IκB	— ингибитор фактора NFκB
Kd	— константа диссоциации
KLH	— keyhole limpet hemocyanin
LAP	— lingual antimicrobial peptide
LRP	— low density lipoprotein receptor-related protein
LRR	— leucine-rich repeat
MARCO	— macrophage receptor with collagenous structure
MAASP	— MBL associated serine proteinase
mBD-1	— mouse beta-defensin 1 (β-дефенсин 1 мыши)
MBL	— mannose-binding lectin
MHC	— major histocompatibility complex (главный комплекс гистосовместимости)
MIP-3α	— macrophage inflammatory protein — 3α
MyD88	— myeloid differentiation factor 88
NACHT	— domain present in neuronal apoptosis inhibitor protein — NALP
NALP	— белки, включающие домены NACHT, LRR и PYD
NBS	— нуклеотид-связывающий сайт (nucleotide-binding site)
NFκB	— ядерный фактор (nuclear factor) транскрипции, ответственный за синтез легкой κ-цепи иммуноглобулинов в В-лимфоцитах
НК-клетки	— natural killers (естественные киллеры)
NOD	— нуклеотид-связывающий олигомеризационный домен (nucleotide-binding oligomerization domain)
PAMPs	— pathogen-associated molecular patterns
PG	— protegrin (протегрин)
pI	— изоэлектрическая точка
PLA2	— фосфолипаза A2

PRRs	— pattern recognition receptors
PYD	— pyrin domain
RTD	— $\theta$ -дефенсин макаки-резуса (rhesus theta-defensin)
RT-PCR	— reversed transcription polymerase chain reaction
SOCS	— супрессоры цитокиновой сигнализации (suppressors of cytokine signaling)
SP-A	— сурфактантный белок A
SP-D	— сурфактантный белок D
SR-AI	— скавенджер рецептор AI
SR-AII	— скавенджер рецептор AII
SR-CL1	— скавенджер рецептор CL1
TAP	— tracheal antimicrobial peptide
TCR	— T cell receptors (рецепторы Т-лимфоцитов)
TIR	— Toll/IL-1 Receptor homologous region
TLR	— Toll-like receptor
TRAF6	— tumor necrosis factor receptor-associated factor 6

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
1. ВВЕДЕНИЕ .....	5
2. РЕКОГНОСЦИРОВОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА .....	7
2. 1. Концепция о патогенассоциированных молекулярных паттернах и распознающих их рецепторах .....	7
2. 2. Молекулы клеточной адгезии в иммунитете животных .....	11
2. 3. Суперсемейство скавенджер рецепторов .....	15
2. 4. Структура и функциональная роль пентраксинов в реализации защитных реакций животных.....	18
2. 5. Лектины как молекулярные факторы рекогносцировочного звена системы врожденного иммунитета животных.....	20
2. 5. 1. История вопроса.....	20
2. 5. 2. Маннозо(маннан)связывающий лектин.....	22
2. 5. 3. Сурфактантные белки SP-A и SP-D.....	28
2. 5. 4. Конглоутинин .....	30
2. 5. 5. Клеточноассоциированные лектины.....	32
2. 6. Система комплемента и $\alpha_2$ -макроглобулин в иммунитете животных.....	33
2. 6. 1. Система комплемента.....	33
2. 6. 2. $\alpha_2$ -Макроглобулин как структурный гомолог C3-компонента комплемента .....	41
2. 7. Липополисахаридсвязывающий белок как звено рекогносцировочной системы врожденного иммунитета .....	45
2. 8. Толл- и Толл-подобные рецепторы как компоненты рекогносцировочного аппарата иммунной системы .....	53
2. 9. Транскрипционный фактор NF $\kappa$ B и родственные ему белки .....	61
2. 10. NOD- и NALP-белки как представители внутриклеточных рецепторов, распознающих патогенассоциированные молекулярные паттерны .....	68
2. 11. Пептидогликанраспознающие белки как молекулярные факторы рекогносцировочной системы животных.....	69
2. 12. Система паттернраспознающих рецепторов .....	70
3. МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ ЭФФЕКТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА .....	76
3. 1. Фагоцитоз в иммунных реакциях организма .....	76
3. 1. 1. Общие положения .....	76
3. 1. 2. Хемотаксис и сопряженные с ним клеточные реакции .....	77
3. 1. 3. Роль рецепторов фагоцитов, ответственных за поглотительную стадию фагоцитоза.....	82

3. 2. Кислородзависимые механизмы элиминации патогенов при фагоцитозе и воспалении .....	86
3. 2. 1. НАДФН-оксидазная система .....	86
3. 2. 2. Пероксидазные системы инактивации микробов .....	90
3. 2. 3. Фенолоксидаза в иммунитете беспозвоночных .....	100
3. 3. Кислороднезависимые механизмы инактивации микроорганизмов при фагоцитозе и воспалении .....	105
3. 3. 1. Антибиотические пептиды как молекулярные факторы врожденного иммунитета животных .....	107
3. 3. 2. Структура и антимикробные свойства $\alpha$ -дефенсинов .....	109
3. 3. 3. $\beta$ -Дефенсины .....	116
3. 3. 4. $\theta$ -Дефенсины .....	120
3. 3. 5. Дефенсины беспозвоночных животных .....	122
3. 3. 5. 1. Дефенсины насекомых .....	122
3. 3. 5. 2. Дефенсины скорпионов .....	129
3. 3. 5. 3. Дефенсины мечехвостов .....	130
3. 3. 5. 4. Дефенсины моллюсков .....	131
3. 3. 5. 5. Антибиотические пептиды из целоцитов пескожила .....	131
3. 3. 6. Кателицидины .....	133
3. 3. 7. Механизмы антимикробного действия антибиотических пептидов .....	137
3. 3. 8. Лактоферрин .....	146
3. 3. 9. Бактерицидная проникаемость увеличивающий белок ....	152
3. 3. 10. Серпроцидины .....	159
3. 3. 10. 1. Катепсин G .....	159
3. 3. 10. 2. Эластаза .....	162
3. 3. 10. 3. Азуроцидин .....	164
3. 3. 11. Лизоцим .....	166
3. 4. Системы инактивации микроорганизмов, сопряженные со слизистыми, наружными покровами и гуморальными средами организма .....	167
3. 4. 1. Антибиотические пептиды эпителиальных барьеров животных .....	167
3. 4. 2. Цекропины .....	170
3. 4. 3. Магейнины .....	175
3. 5. Защитные механизмы мечехвостов .....	179
4. СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ МЕХАНИЗМОВ ВРОЖДЕННОГО И ПРИОБРЕТЕННОГО ИММУНИТЕТА .....	187
4. 1. Антимикробные пептиды в регуляции иммунных реакций организма .....	187
4. 2. Инструктирующая роль врожденного иммунитета в становлении некоторых реакций приобретенного иммунитета .....	202
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ. НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННОЙ КОНЦЕПЦИИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА .....	206
Литература .....	214
Список сокращений .....	255

# CONTENTS

	Page
1. INTRODUCTION .....	5
2. RECOGNITION MECHANISMS OF INNATE IMMUNITY .....	7
2. 1. Concept of pathogen-associated molecular patterns and pattern recognition receptors .....	7
2. 2. Molecules of cellular adhesion in immunity of animals .....	11
2. 3. Scavenger receptors superfamily .....	15
2. 4. Structure of pentraxins and their functional role in realization of defense reactions in animals .....	18
2. 5. Lectins as molecular factors of recognition part of innate immunity system .....	20
2. 5. 1. Background .....	20
2. 5. 2. Mannose- (mannan-) binding lectin .....	22
2. 5. 3. Surfactant proteins SP-A and SP-D .....	28
2. 5. 4. Conglutinin .....	30
2. 5. 5. Cell-associated lectins .....	32
2. 6. Complement system and $\alpha_2$ -macroglobulin in immunity .....	33
2. 6. 1. Complement system .....	33
2. 6. 2. $\alpha_2$ -Macroglobulin as a structural homolog of C3 complement component .....	41
2. 7. Lipopolysaccharide binding protein as a component of recognition system of innate immunity .....	43
2. 8. Toll and Toll-like receptors as components of recognition apparatus of immune system .....	53
2. 9. Transcriptional factor NF $\kappa$ B and related proteins .....	61
2. 10. NOD and NALP proteins as intracellular receptors for pathogen-associated molecular patterns .....	68
2. 11. Peptidoglycan recognition proteins as molecular factors of recognition system of animals .....	69
2. 12. System of pattern recognition receptors .....	70
3. MOLECULAR AND CELLULAR BASIS OF EFFECTOR MECHANISMS OF INNATE IMMUNITY .....	76
3. 1. Phagocytosis in immune reactions of organism .....	76
3. 1. 1. General remarks .....	76
3. 1. 2. Chemotaxis and associated cellular reactions .....	77
3. 1. 3. Phagocyte receptors participating in ingestion step of phagocytosis .....	82

3. 2. Oxygen-dependent mechanisms of pathogen elimination upon phagocytosis and inflammation.....	86
3. 2. 1. NADPH oxidase system.....	86
3. 2. 2. Peroxidase systems in inactivation of microbes.....	90
3. 2. 3. Phenoloxidase in invertebrate immunity.....	100
3. 3. Oxygen-independent mechanisms of inactivation of microorganisms upon phagocytosis and inflammation.....	105
3. 3. 1. Antibiotic peptides as molecular factors of innate immunity.....	107
3. 3. 2. Structure and antimicrobial properties of $\alpha$ -defensins.....	109
3. 3. 3. $\beta$ -Defensins.....	116
3. 3. 4. $\theta$ -Defensins.....	120
3. 3. 5. Invertebrate defensins.....	122
3. 3. 5. 1. Insect defensins.....	122
3. 3. 5. 2. Scorpion defensins.....	129
3. 3. 5. 3. Horseshoe crab defensins.....	130
3. 3. 5. 4. Mollusk defensins.....	131
3. 3. 5. 5. Antibiotic peptides from lugworm coelomocytes.....	131
3. 3. 6. Cathelicidins.....	133
3. 3. 7. Mechanisms of antimicrobial action of antibiotic peptides.....	137
3. 3. 8. Lactoferrin.....	146
3. 3. 9. Bactericidal-permeability increasing protein.....	152
3. 3. 10. Serprocidins.....	159
3. 3. 10. 1. Cathepsin G.....	159
3. 3. 10. 2. Elastase.....	162
3. 3. 10. 3. Azurocidin.....	164
3. 3. 11. Lysozyme.....	166
3. 4. Systems of inactivation of microorganisms on mucosal surfaces and in the body fluids.....	167
3. 4. 1. Antibiotic peptides from.....	167
3. 4. 2. Cecropins.....	170
3. 4. 3. Magainins.....	175
3. 5. Defense mechanisms in horseshoe crabs.....	179
4. CURRENT VIEWS ABOUT INTERACTIONS OF INNATE AND ACQUIRED IMMUNITY MECHANISMS.....	187
4. 1. Antimicrobial peptides in regulation of immune reactions of organism.....	187
4. 2. Instructive role of innate immunity in realization of some acquired immunity reactions.....	202
5. CONCLUSION. SOME ASPECTS OF MODERN CONCEPT OF INNATE IMMUNITY.....	206
References.....	214
Abbreviations.....	255

*Научное издание*

**Владимир Николаевич Кокряков**  
**ОЧЕРКИ О ВРОЖДЕННОМ ИММУНИТЕТЕ**

*Утверждено к печати  
Институтом экспериментальной медицины  
Российской академии медицинских наук*

Редактор издательства *И. Л. Песенко*  
Художник *А. Г. Кудрявцев*  
Технический редактор *О. В. Новикова*  
Корректоры *О. А. Гусихина, М. В. Капелюшина и Т. С. Павлова*  
Компьютерная верстка *А. Н. Жогоной*

Лицензия ИД № 02980 от 06 октября 2000 г. Сдано в набор 05.09.2005  
Подписано к печати 25.01.2006. Формат 60х90/16. Бумага офсетная  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 16,5. Уч.-изд. л. 18,4  
Тираж 600 экз. Тип. зак. № 700. С 20

Санкт-Петербургская издательская фирма «Наука» РАН  
199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 1  
E-mail: [main@nauka.nw.ru](mailto:main@nauka.nw.ru)  
Internet: [www.nauka.nw.ru](http://www.nauka.nw.ru)

Отпечатано в полном соответствии с качеством  
предоставленных диапозитивов  
в ОАО «ИПК «Ульяновский Дом печати»  
432980, г. Ульяновск, ул. Гончарова, 14

ISBN 5-02-026225-0



9 785020 262256

## **АДРЕСА КНИГОТОРГОВЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ ТОРГОВОЙ ФИРМЫ «АКАДЕМКНИГА»**

### **Магазины «Книга — почтой»**

121009 Москва, Шубинский пер., 6; 241-02-52

197345 Санкт-Петербург, Петрозаводская ул., 7Б; (код 812) 235-05-67

### **Магазины «Академкнига» с указанием отделов «Книга — почтой»**

690088 Владивосток-88, Океанский пр-т, 140 («Книга — почтой»);  
(код 4232) 5-27-91

620151 Екатеринбург, ул. Мамина-Сибиряка, 137 («Книга — почтой»);  
(код 3432) 55-10-03

664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 298 («Книга — почтой»);  
(код 3952) 46-56-20

660049 Красноярск, ул. Сурикова, 45; (код 3912) 27-03-90

220012 Минск, проспект Ф. Скорины, 73; (код 10375-17) 232-00-52,  
232-46-52

117312 Москва, ул. Вавилова, 55/7; 124-55-00

117192 Москва, Мичуринский пр-т, 12; 932-74-79

103054 Москва, Цветной бульвар, 21, строение 2; 921-55-96

103624 Москва, Б. Черкасский пер., 4; 298-33-73

630091 Новосибирск, Красный пр-т, 51; (код 3832) 21-15-60

630090 Новосибирск, Морской пр-т, 22 («Книга — почтой»);  
(код 3832) 30-09-22

142292 Пушкино Московской обл., МКР «В», 1 («Книга — почтой»);  
(13) 3-38-60

443022 Самара, проспект Ленина, 2 («Книга — почтой»);  
(код 8462) 37-10-60

191104 Санкт-Петербург, Литейный пр-т, 57; (код 812) 272-36-65