

Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека

А.С. Будихина, Б.В. Пинегин

ГНЦ «Институт иммунологии ФМБА России», Москва, Россия

Defensins – multifunctional cations peptides of human

A.S. Budikhina, B.V. Pinegin

National Research Center Institute of Immunology, FMBA, Moscow, Russia

Аннотация

Продукция природных катионных пептидов – важный механизм врожденного иммунитета человека. Дефензины человека принадлежат семейству катионных трисульфидсодержащих микробицидных пептидов. Кроме прямых антимикробных функций, дефензины играют множественную роль как медиаторы воспаления, влияют на хемотаксис, обладают иммуномодулирующей, цитотоксической и другими активностями. Дефензины рассматриваются как лекарства нового поколения, которые можно будет использовать как антибактериальные средства, как модуляторы воспаления и при терапии рака.

Ключевые слова

α -дефензины, β -дефензины, иммунопатологии, лекарства нового поколения

Summary

The production of natural cationic antimicrobial peptides is an important mechanism of human innate immunity. Human Defensins belong to the family of cationic trisulfide-containing microbicidal peptides. Beside their direct antimicrobial function, defensins have multiple roles as mediators of inflammation, exert chemotactic, immunomodulating and cytotoxic activity and other. Further, defensins qualify as innovative drugs that might be used as antibacterial drugs, as modulators of inflammation drugs and in cancer therapy.

Key words

α -defensins, β -defensins, immunopathology, innovative drugs

Катионные антимикробные пептиды являются важными компонентами иммунной системы широкого круга организмов. Играют ключевую роль в обеспечении первой линии защиты макроорганизма от инфекции.

Дефензины составляют большое семейство низкомолекулярных (4-kd), цистеин богатых катионных пептидов, которые способны к киллингу широкого спектра патогенов, включающих разнообразные бактерии, грибы и так же оболочечные вирусы. У человека это семейство представлено α - и β -субсемействами дефензинов.

Первые α -дефензины были найдены в азурофильных гранулах нейтрофилов в 1980 году. Они являются основным депо четырех α -дефензинов. Поэтому их назвали пептидами нейтрофилов человека (human neutrophils

peptides – HNP) и присвоили каждому порядковые номера [1]. В 1992 и 1993 были обнаружены в клетках Пеннета еще два дефензина (Human defensin 5 и 6 – HD5 и HD6).

Первый β -дефензин человека был выделен в 1995 году Vensch и сотрудниками при изучении почки человека из диализата гемофильтра. Это был пептид из 36 аминокислотных остатков. Его обозначили hBD-1 (human Beta Defensin-1). Был клонирован фрагмент сДНК из РНК почки человека, кодирующий hBD-1 [2]. В моче hBD-1 был обнаружен в нескольких изоформах (длина их аминокислотных цепочек варьировала от 36 до 47 аминокислотных остатков). Последующие найденные β -дефензины принято обозначать, добавляя к аббревиатуре hBD их порядковый номер по мере их открытия. В 1997 hBD-2 (41 аминокис-

лотых остатков) был выделен из кожи больных псориазом методом аффинной хроматографии [3]. На данный момент у человека известно 6 β -дефензинов: hBD-1, hBD-2, hBD-3 и hBD-4, hBD-5 и hBD-6 [4, 5].

Молекулярное строение дефензинов

Для молекул дефензинов характерно высокое содержание основных аминокислот (аргинина, лизина, гистидина), что придает их молекуле положительный заряд. Дефензины являются амфипатичными молекулами, то есть гидрофильные и гидрофобные участки молекулы четко отделены друг от друга. Это свойство облегчает связывание и встраивание их в фосфолипидный бислой микроорганизмов.

Молекулы дефензинов представляют собой полипептиды, содержащие 29-47 аминокислотных остатков. HNP-1 и HNP-3 содержат в своем составе всего 30 аминокислотных остатков, эти пептиды идентичны друг другу за исключением замены аланина на аспарагин в положении 1. HNP-2 – протеолитический продукт HNP-1 и HNP-3, содержит 29 аминокислотных остатков (отсутствует первая аминокислота с N-конца). В молекуле HNP-4 имеются дополнительные аминокислотные остатки с C-конца.

Молекулы hBD – более варибельные пептиды, они менее консервативны в аминокислотной последовательности. Кроме того, hBD найдены в различных изоформах.

Вторичная структура дефензинов представлена β -складчатой антипаралельной структурой, стабилизированной тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками между остатками цистеина. У HNP и hBD дисульфидные связи располагаются между 1-5, 2-4, 3-6 и 1-6, 2-4, 3-5 остатками цистеинов соответственно. Наличие дисульфидных связей обеспечивает сохранение устойчивости молекул дефензинов к многочисленным лейкоцитарным и микробным протеиназам и сохранение антибиотических свойств в очаге воспаления и тканевой деструкции [6].

Генетика дефензинов

Гены, кодирующие дефензины образуют кластер в локусе p22-23 на 8 хромосоме. Кроме того, гены, кодирующие hBD, найдены еще на 6 и 8 хромосомах. HNP 1-3 кодируются двумя генами HDEFA1 и HDEFA3. Число генов, кодирующих HNP, может также изменяться, но менее интенсивно. Причина этого еще пока не ясна на данный момент. Установлено, что уро-

вень HNP в нейтрофилах пропорционален числу генных копий (HDEFA1 и HDEFA3) [7]. Этот генетический компонент обуславливает индивидуальную устойчивость организма к инфекции. При сравнении разных популяционных групп людей было выявлено у них достоверное отличие числа генных копий, кодирующих HNP1-3. Это объясняется, прежде всего, тем, что люди из различных историко-географических районов мира подвергаются различному действию окружающих их инфекционных агентов. Кроме того, в популяциях существуют индивидуумы, у которых наблюдается полное отсутствие HDEFA3 аллели. Процент таких людей в различных регионах колеблется от 10-37%. Это может частично объяснить различия частоты инфекционных и/или аутоиммунных заболеваний, в которых DEFA3 играет важную роль [8].

Было показано разнообразие числа копий генов дефензинов, что указывает на дупликацию генов в β -дефензиновом кластере на хромосоме 8p23. Они показали, что индивидуумы могут иметь от 2 до 12 копий в регионах: DEFB4, DEFB103 и DEFB104, кодирующих hBD-2, hBD-3 и hBD-4, соответственно, в диплоидном геноме. Эти повторы регионов не включают гены, кодирующие HNP или hBD-1 [8, 9].

Синтез дефензинов

Каждый ген дефензинов содержит несколько экзонов, которые кодируют препропептид. Вначале дефензины синтезируются в виде предшественников, как препропептиды, длина которых составляет 94 аминокислотных остатка. Препропептиды содержат сигнальный участок (в среднем 19 аминокислотных остатков), анионный участок (в среднем 45 аминокислотных остатков) и собственно «зрелый» пептид. В результате протеолитического отщепления в эндоплазматическом ретикулуме от препропептида происходит удаление сигнального участка и образование продефензина (в среднем 75 аминокислотных остатков). Последующее созревание (отщепление 45 аминокислотных) остатков занимает много часов и происходит в зрелых гранулах (Рис.1).

Продукция HNP нейтрофилами начинается еще в миелопоэзе на стадии промиелоцитов. Большое количество проHNP синтезируется в промиелоцитах, миелоцитах и метамиелоцитах, в то время как палочкоядерные и зрелые нейтрофилы продуцируют малое количество проHNP [10].

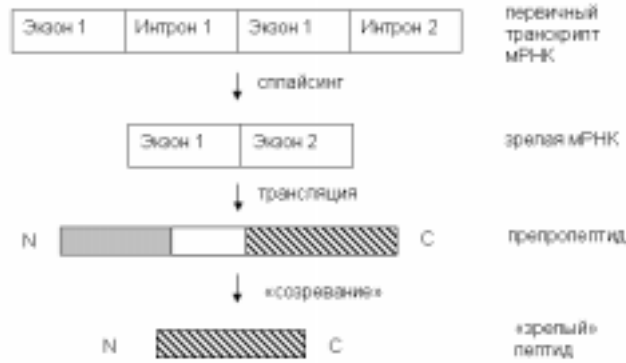


Рис. 1. Этапы синтеза дефензинов

hBD продуцируются клетками организма человека постоянно.

Экспрессия дефензинов

HNP составляют 30-50% от общего содержания белка азурофильных гранул нейтрофилов. HNP-4 содержится в меньшей концентрации по сравнению с HNP-1, -2, -3. α-Дефензины обнаружены также в NK клетках, В-лимфоцитах, γδ Т-лимфоцитах, моноцитах/макрофагах и эпителиальных клетках.

hBD продуцируются эпителиальными клетками почки, урогенитального, респираторного, желудочно-кишечного трактов, кератиноцитами и др. (табл.1). Исследователями установлено, что эпителиальные ткани организма человека содержат значительное количество hBD (оно существенно больше в сайтах воспаления и инфекции).

Регуляция экспрессии дефензинов

Экспрессия дефензинов человека может быть конститутивной и/или индуцибельной. Все HNP (синтез HNP происходит до созревания и дифференцировки нейтрофилов) и hBD-1 экспрессируются конститутивно. Напротив, для hBD 2-4 характерна индуцибельная регуляция экспрессии. Причем для каждого члена семейства характерен преимущественно свой активатор экспрессии (Табл. 1).

Регуляция экспрессии hBD отличается в различных типах клеток. Кроме того, на экспрессию hBD могут влиять различные лекарственные препараты. Знание этого будет полезно при разработке лекарств и терапии заболеваний. Так например, IL-1 и 12-форбол 13-миристат

ацетат являются мощными индукторами hBD в кератиноцитах, в то время как в эпителиальных клетках кишечника (HT-29) и в перевиваемой моноцитарной линии (U937) эффект был не так выражен. И наоборот, TNF-α, экстракт Streptococcus группы А, бутират индуцировал hBD-2 в перевиваемой макрофагальной линии (U937). В эпителиальных клетках кишечника (HT-29) только бутират увеличивал индукцию hBD-2. Перечисленные агенты в данных условиях не влияли на индукцию hBD-1 [11]. Было показано, что дексаметазон снижает экспрессию DEFB-3 и не подавляет экспрессию DEFB-1 и DEFB-2. Дексаметазон ингибирует AP-1.

Антибактериальный и противогрибковый спектры действия дефензинов

Свои микробицидные свойства дефензины проявляют в микромолярных концентрациях. Каждый представитель HNP имеет свою характерную антимикробную специфичность, даже, несмотря на практическую идентичность этих пептидов друг другу [12]. hBD-2 и hBD-3 обладают большим спектром действия, чем hBD-1. hBD-2 и hBD-3 показывают большое разнообразие своего действия в отношении различных микроорганизмов, причем аэробы являются более чувствительными, по сравнению с анаэробами. Однако hBD-3 активен в отношении большего спектра бактерий, грибов и, кроме того, действует в меньших концентрациях по сравнению с другими членами семейства hBD. При анализе бактерицидного действия hBD-2 и hBD-3 Joly S. соотр. показали, что микробицидность этих пептидов проявлялась при концентрациях 3,9 – 250мкг/мл для hBD-2 и 1,4 –

Таблица 1
Экспрессия дефензинов

Пептид	Экспрессия дефензинов			
	Сайт	Тип	Индуктор	Ингибитор
HNP 1-3, 4	Нейтрофилы, Вл, Тл, НК, эпит. клетки	К	—	—
hBD-1	Кожа, Р, ЖКТ, У	К	IFN γ (исключение)	—
hBD-2	Кожа, Р, ЖКТ	И	IL-17, IL-1 β , TNF- α , ЛПС	—
hBD-3	Кожа, Р, ЖКТ	И	IL-17, TNF- α , ЛПС, IFN γ	дексаметазон
hBD-4	Кожа ЖКТ, У	К И	IL-1 и IL-6- дополнительные 12-форбол 13-миристан	—
hBD-5	У	К		
hBD-6	У	К		

Примечание: Р- респираторный тракт, ЖКТ- желудочно-кишечный тракт, У- урогенитальный тракт, И- индуцибельный, К- конститутивный

250мкг/мл hBD-3. Наименьшую противобактериальную активность проявляет hBD-4, однако он наиболее активен в отношении *P. aeruginosa* [13]. Кроме того, для некоторых дефензинов характерен взаимоусиливающий эффект противомикробного действия. В экспериментах *in vitro* было показано, что комбинация из hBD-2 и hBD-4 в отношении *Pseudomonas aeruginosa* значительно снижала их MIC₅₀ (минимальную концентрацию ингибирующую рост 50% культуры бактерий). Использование других комбинаций hBD не влияло на их бактерицидное действие [41]. В таблице 2 приведены некоторые дефензин-чувствительные микроорганизмы.

Противовирусная активность дефензинов

Дефензины обладают способностью ингибировать вирусную инфекцию. Они эффективны в отношении ДНК- и РНК-вирусов. Дефензины ингибируют репликацию вируса иммунодефицита человека, обладают высокой активностью в отношении вируса герпеса. Также эти пептиды ингибируют вирус везикулярного стоматита, цитомегало-вирус человека, вирус гриппа, аденовирус, папилломавируса и др. [14].

Механизм антимикробного действия дефензинов

Микробицидные свойства дефензинов обусловлены их электростатическим взаимодействием с бактериями [15]. Пептиды аккумулируются и ориентируются параллельно поверх-

ности мембраны-мишени, затем электростатически взаимодействуют с анионными группировками фосфолипидных головок во многих участках, покрывая мембрану ковро-подобным образом. По достижении определенной критической концентрации, происходит образование сквозных дыр в мембране-мишени, что приводит к лизису бактерии. Хотя образование ионных каналов, трансмембранных пор и обширных мембранных прорывов, в конечном счете, приводит к лизису микробных клеток, этого еще не достаточно для достижения микробицидности. Существуют еще и внутриклеточные мишени для дефензинов. Так, например, HNP ингибируют синтез нуклеиновых кислот и синтез протеинов.

Кроме того, HNP препятствуют распространению инфекции, по средствам ингибирования фибринолиза, из-за сосредоточения инфекции в фибриновых сгустках. HNP, связываясь с плазминогеном, ингибирует его взаимодействие с фибрином. Связанные молекулы плазминогена теряют свою фибринолитическую активность. Важно, что плазминоген становится менее чувствительным к активации тканевым активатором плазминогена в присутствии HNP [16].

Факторы влияющие на антибактериальное действие дефензинов

В организме существует несколько механизмов предотвращения цитотоксического дей-

Таблица 2
Некоторые дефензин-чувствительные бактерии

Виды дефензинов	Микроорганизм-мишень
HNP	St.aureus, E.coli, E.aerogenes, B.cereus, Paeruginosa C. albicans, Mycobacteria
hBD	St.aureus, Streptococcus pyogenos, E.coli, Streptococcus pyogenos, F.nucleatum, S. mutans, A. actinomycetemcomitans, Paeruginosa

ствия дефензинов. Это особенно важно при воспалении. Ранее отмечалось, что при воспалительных процессах происходит значительное увеличение концентрации дефензинов.

Активность дефензинов может ингибироваться некоторыми компонентами плазмы/сыворотки крови. Так, HNP образуют комплексы с α_1 -антитрипсином, α_2 -антихимотрипсином и α_2 -макроглобулином, альбуминами, в результате чего происходит ингибирование HNP [17]. Клиническим подтверждением этого являются пациенты с дефицитом альфа1-антитрипсина. У них были обнаружены деструктивные процессы в нижних отделах респираторного тракта, что было следствием токсического действия HNP.

Другим вариантом изменения активности HNP является аденин динуклеотид фосфат-рибозилирование (ADP-рибозилирование) пептида. В опытах *in vitro* было показано, что ADP-рибозилирование, снижает цитотоксичность и антимикробную активность HNP, сохраняя при этом их хемоаттрактивные свойства и IL-8 стимулирующую активность [18].

Снижение антимикробной активности отмечена при концентрации NaCl 150mM. Вероятно, моно- и ди-валентные катионы влияют на связывание с отрицательно заряженной стенкой бактерий. Прямое антимикробное действие дефензинов *in vivo* наблюдается в вакуолях фагоцитов или на поверхности кожи и эпителии слизистых, где ионная сила не так велика [19].

Хемотаксическая функция дефензинов

Действие дефензинов не ограничивается только противомикробными свойствами. HNP могут обеспечивать эффекторную фазу адаптивного иммунитета, посредством рекрутирования Т лимфоцитов. HNP являются хемоаттрактантами для CD4⁺/CD45RA⁺ и CD8⁺ Тл, не-

зрелых дендритных клеток [19]. Напротив, hBD являются хемоаттрактантами для CD4⁺/CD45RO⁺-Т лимфоциты и дендритных клеток. Кроме того, hBD-2 – потенциальный хемоаттрактант для нейтрофилов, таким образом, осуществляется рекрутирование нейтрофилов в очаги воспаления/инфекции. Это важное проявление связи между антибактериальными пептидами и нейтрофилами во время инфекции или воспаления.

Хемотаксическое действие дефензины демонстрируют в меньших концентрациях (в 10-100 раз), требуемых для киллинга микробов. Хемотаксический эффект не ингибируется присутствием 5-10% сыворотки (которая блокирует микробицидный эффект).

Влияние дефензинов на продукцию биологически активных веществ клетками организма

Дефензины вызывают индукцию продукции цитокинов, участвуют в регуляции генов множества цитокинов и хемокиновых рецепторов. Так, обработка культуры эпителиальных клеток бронхов человека HNP-1 дозозависимо приводит к увеличению экспрессий мРНК IL-8 и IL-1 α , к увеличению секреции IL-8 и увеличивает NF- κ B ДНК-связывающую активность [20]. Стимулирование HNP CD4⁺ Т-клеток увеличивает ими продукцию ИФН- γ и IL-2, IL-6, IL-10, IL-8 [21]. HNP стимулирует продукцию ФНО- α и IL-1 β моноцитами.

Было показано, что hBD-2, -3, и -4, но не hBD-1 оказывают стимулирующее действие на кератиноциты человека, что приводит к увеличению генной экспрессии и увеличению продукции IL-6, IL-10, IP-10, моноцитарный хемоаттрактант-1, макрофагальный воспалительный протеин-3 β и регулируют активацию экспрессии и секреции Тл, вызывают мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺, а также hBD

увеличивают миграцию и пролиферацию кератиноцитов (за счет индукции фосфорилирования EGFR, STAT1 и STAT3). Ингибирование hBD в значительной степени снижает миграцию и пролиферацию кератиноцитов. Таким образом, hBD вовлечены в иммунную защиту кожи, посредством стимулирования продукции цитокинов и хемокинов и участия в ранозаживлении, обеспечивая миграцию и пролиферацию кератиноцитов [22, 23].

Дефензины вызывают дегрануляцию тучных клеток, в результате чего происходит высвобождение из них гистамина, увеличение продукции простагландина D₂. Кроме того, hBD-2 вызывают мобилизацию внутриклеточного Ca²⁺ G-протеин-фосфолипаза C зависимым путем, что так же имеет роль при аллергических реакциях [24].

Дефензины участвуют в инициации гуморального ответа против микробных антигенов. На модели мышей было показано, что интраназальная иммунизация овальбумином с HNP увеличивала выработку овальбумин специфических IgG антител [24].

Известно, что наномолярные концентрации некоторых дефензинов могут ингибировать продукцию иммуносупрессивных адреналовых стероидных гормонов. Во время системной инфекции, уровень дефензинов в плазме может превышать 100 мкг/мл. Этой концентрации достаточно для ингибирования продукции адрено-глюкокортикоидов. Ингибирование продукции глюкокортикоидов может являться другим путем, по средствам которого дефензины увеличивают адаптивный иммунный ответ, так же как и участвовать в реакциях врожденного иммунитета.

Дефензины и воспаление

Важной частью воспалительного процесса является адгезия лимфоцитов к эпителиальным клеткам. В экспериментах было показано, что обработка HNP легочных эпителиальных клеток (клеточная линия A 549) дозозависимым образом увеличивало адгезию Т-клеток к эпителиоцитам [25]. Так же, HNP индуцируют экспрессию ко-стимуляторных молекул на эпителиоцитах (CD80, CD86, CD54\ICAM-1) и на CD4⁺ Тл (CD28, CD152\CTLA-4 и CD11a\LFA-1) [20].

Кроме того, при воспалении HNP-1 может обеспечивать защиту организма от тканевого повреждения, ингибируя раннюю фазу активации системы комплемента. HNP-1 ингибирует классический и лектиновый пути активации си-

стемы комплемента. HNP-1 формирует комплексы с C1q и MBL [26]. По достижении концентраций более 50 мкг/мл HNP индуцируют высвобождение IL8 и нейтрофил – активирующего белка-78 из эпителиальных клеток, что приводит к рекрутированию дополнительного числа нейтрофилов в очаг воспаления. Из привлеченных в очаг воспаления нейтрофилов высвобождаются и продукты окислительного взрыва нейтрофилов, а системы каталазы и супероксид-дисмутаза не способны минимизировать их повреждающее действие на собственные ткани организма, что вносит дополнительный вклад в повреждение тканей организма [25]. Прогрессирование этого приводит к подавлению процессов репарации и появлению эрозий и язв на слизистой.

Дефензины и ранозаживление

Целостность эпителия – необходимое условие для обеспечения адекватной защиты организма от патогенов. Ранозаживление включает следующие процессы: пролиферацию, миграцию, дифференциацию и ангиогенез. На эпителиальных клетках было показано, что HNP в концентрациях <10мкг/мл стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток. Также известно, что HNP участвуют в дифференциации эпителиальных клеток. HNP1-3 увеличивают экспрессию мРНК муцинов [27]. Увеличение экспрессии муцинов может обеспечить более эффективный клиренс микроорганизмов. Кроме того, HNP участвуют в увеличении количества внеклеточного матрикса и контроле его деградаци. Установлено, что HNP влияют на экспрессию коллагеназы в кишечнике (matrix metalloproteinase 1, MMP-1), коллагена I и III типов, и ингибируют тканевую металлопротеиназу 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) [28]. А также, hBD стимулируют ангиогенез.

Дефензины и опухолеобразование

HNP играют особую роль в прогрессии опухолей. Известно, что HNP могут вызывать пролиферацию или киллинг опухолевых клеток, в зависимости от локальной концентрации пептидов. Известно, что хроническое воспаление дыхательных путей, которое ассоциировано с высокими концентрациями HNP, является предрасполагающим фактором для развития рака легких. Опухолевая прогрессия может быть следствием митогенной активности HNP. Кроме того, HNP явля-

ются доминантными HLA-DR связывающими пептидами на малигнизированных раковых клетках, что блокирует представление антигена главным комплексом гистосовместимости. Также, исследователями было показано, HNP ингибирует экспрессию CD4⁺ Т лимфоцитами и CD16⁺ CD56⁺ NK клетками. В результате этого происходит ингибирование лизиса опухолевых клеток [29].

В то же время, HNP могут проявлять потенциальную противоопухолевую активность, за счет лизиса опухолевых клеток, а так же за счет ингибирования ангиогенеза. Установлено, что HNP могут регулировать ангиогенез воздействуя на адгезию эндотелиальных клеток и на миграцию фибронектин зависимым образом, так же как и на пролиферацию эндотелиальных клеток [30].

К сожалению, еще не совсем ясно при каких именно концентрациях дефензинов и других дополнительных условиях происходит прогрессия или супрессия опухолей.

Дефензины и иммунопатологии

Эндогенные антимикробные пептиды являются важной составляющей защитной системы эукариотического организма. Уменьшение или отсутствие продукции антимикробных пептидов, а также их модификация после секреции ведет к повышению чувствительности макроорганизма к микроорганизмам и развитию заболевания, что было показано на моделях животных и человека. Изменение количества и активности дефензинов нередко наблюдается при различных заболеваниях (Табл. 3).

Подтверждением особой роли эндогенных пептидов в обеспечении защиты организма являются пациенты с синдромом Костмана (характеризующимся врожденной нейтропенией, дефектом гена, кодирующего эластазу нейтрофилов, и дефицитом HNP). После лечения гранулоцитарным колониестимулирующим фактором риск возникновения инфекции у этих пациентов сохранялся, хотя число нейтрофилов приходило в норму. Функцио-

Таблица 3
Изменение числа и антимикробной активности дефензинов при различных заболеваниях человека

Измененное количество дефензинов	Заболевания
Увеличенная продукция (в связи с инфекцией)	Пневмония (<i>Mycobacterium avium</i>) ВИЧ-инфекция (нет прогрессии) Синузиты Эмпиема Неонатальная пневмония Колонизация <i>St.aureus</i> Бактериальный вагинит Воспалительные заболевания органов малого таза Гастрит (<i>Helicobacter pylori</i>)
Увеличенная продукция (в связи с воспалением)	Острый респираторный дистресс синдром
Идиопатическое увеличение продукции	Идиопатический фиброз легких Диффузный панбронхит Псориаз Красный плоский лишай
Сниженная продукция	ВИЧ-инфекция (при прогрессии) Атопический дерматит Ожоговые раны
Отсутствие	синдромом Костмана
Ослабление функции	Кистозный фиброз легких

нальный анализ нейтрофилов этих пациентов показал, что содержание лактоферрина у них в пределах нормы, кислородный взрыв не нарушен, но отсутствуют кателицидины и очень низкий уровень HNP [5].

У больных хронической гранулематозной болезнью отмечено увеличение количества HNP1-3 в циркулирующей крови с параллельным снижением содержания внутриклеточных дефензинов в нейтрофилах по сравнению со здоровыми донорами. Это явление обусловлено повышенной дегрануляцией азурофильных гранул нейтрофилов, одним из маркеров которых являются HNP1-3. Содержимое этих гранул в норме лишь в незначительных количествах может поступать в окружающее клетки пространство, а основная часть их поступает в фагосому и обеспечивает кислород-независимый киллинг микробов нейтрофилами. У пациентов отмечена высокая бактерицидность сыворотки крови, вероятно, это является компенсаторной реакцией организма. Возможно, это попытка макроорганизма противостоять укрытию микроорганизмов в несостоятельных к киллингу фагоцитах и распространению бактерий в организме [31].

Благоприятное течение инфекционных заболеваний зависит от концентрации HNP. Так, высокий уровень HNP у ВИЧ-положительных пациентов предотвращал прогрессирование СПИДа, а при снижении HNP плазме крови заболевание у них прогрессировало [32].

При воспалительных заболеваниях ротовой полости продукция HNP1-3 адаптивно увеличивается в ответ на различные инфекции и на острое повреждение эпителиальных барьеров. Но в то же время увеличенная продукция может быть ассоциирована с хроническими воспалительными процессами, что отражает двойственность функционирования HNP1-3 в иммунной активации и связано с процессами дисрегуляции.

Больные атопическим дерматитом (хроническим воспалительным заболеванием кожи) страдают от частых рекуррентных бактериальных инфекций, что связано с уменьшенным содержанием hBD и кателицидинов в коже [33, 34]. В коже больных атопическим дерматитом отмечена оверэкспрессия IL-4, IL-10 и IL-13 [11]. Известно, что IL-4 и IL-13 снижают выработку hBD-3 кератиноцитами. Эти интерлейкины инду-

цируют активацию STAT-6, ингибирующего TNF- α /NF- κ B систему. С другой стороны, IL-10 снижает выработку провоспалительных цитокинов Т и NK клетками, что также приводит к сниженной выработке hBD. Howell M.D. и сотрудники показали, что сниженная экспрессия hBD конститутивна и является результатом увеличения экспрессии Th2-цитокинов. Поэтому исследователи предполагают возможность использования антител к IL-4, IL-10 и IL-13 для лечения атопического дерматита, с целью нейтрализации их эффекта и увеличения продукции hBD [34].

Однако не у всех пациентов с воспалительными заболеваниями кожи наблюдается сниженная экспрессия антимикробных пептидов. Так, у пациентов с псориазом отмечено увеличение hBD-2 и hBD-3, кроме того, оно коррелирует с низкой частотой вторичных инфекций.

hBD участвуют в реализации врожденного иммунитета в легких. Было обнаружено, что в неонатальном периоде в легких преобладает hBD-2, hBD-1 в меньшем количестве, hBD-3 вообще не определяется. Таким образом, низкий уровень hBD-2 может являться одним из факторов, обеспечивающих повышение восприимчивости недоношенных детей к легочным инфекциям [35].

β -Дефензины восприимчивы к деградации и инактивации цистеиновыми протеазами катепсинами В, L и S, что несомненно важно для регуляции уровня β -дефензинов в организме. При увеличенной экспрессии катепсинов усиливается деградация hBD-2, -3 [36], что в свою очередь способствует бактериальной инфекции и колонизации. Это явление наблюдается при хронических легочных заболеваниях, ассоциированных с инфекцией. Надо отметить, что в здоровых легких катепсинов нет, но они могут синтезироваться при действии определенных стимулов, например INF- γ и IL-13.

В кишечнике hBD-1 конститутивно экспрессируется клетками кишечника, в то время как синтез hBD-2 индуцируется при воспалительных заболеваниях кишечника [37]. Уменьшение уровня β -дефензинов в кишечнике приводит к ослаблению защиты от кишечных микробов. Так, был выявлен ряд заболеваний, ассоциированных со сниженной экспрессией β -дефензинов клетками кишечника (болезнь Крона (мутация в NOD2), язвенный колит)[38].

У пациентов с фиброзом легких уровень HNP значительно выше, чем в группе доноров. В исследованиях *in vitro* на фибробластах легкого человека (NHLEF) был установлен прямой эффект HNP-1 на экспрессию белка теплового шока 47 (heat shock protein 47 – HSP47) и коллагена-1. Ранее сообщалось, что HSP47, коллаген-специфический молекулярный шаперон, и синтез коллаген -1 вовлечены в патогенез фиброза легких. Инкубирование фибробластов легких с HNP-1 (10 - 25 мкг/мл) через 24 часа увеличивало экспрессию мРНК и белка HSP47 и коллагена-1. HNP-1 фиброгенный медиатор, который обеспечивает синтез коллагена через регуляцию HSP47 и коллагена-1 в фибробластах и тем самым участвует в патогенезе нейтрофил-индуцированных фиброзах легких [39].

У пациентов с астмой, с идиопатическим фиброзом легких, курящих так же отмечено повышенное содержание HNP. Но в бронхоальвеолярном лаваже этих пациентов были найдены ADP-рибозилированные HNP, у здоровых доноров они отсутствовали. При анализе HNP, выделенных из гранул нейтрофилов, не рибозилированных форм HNP найдено не было. ADP-рибозилирование HNP у этих пациентов играет регулируемую роль, предотвращая повреждение эпителиальных барьеров [18].

Перспективы применения дефензинов в медицине

В связи с увеличением резистентности бактерий к существующим антибиотикам было предложено создавать новые лекарства на основе дефензинов. В природе существует механизм увеличения экспрессии hBD в ответ на микробную инфекцию или воспаление. Теоретически, такие вещества обладают низкой иммуногенностью, высокой биодоступностью с минимальным токсическим эффектом даже в высоких концентрациях [22]. Лекарственные средства на основе дефензинов (исходя из известных на данный момент их функций) могут использоваться для лечения различных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций.

В экспериментах была показана возможность использования природных пептидов в качестве средств для борьбы с инфекцией. Фармацевтические фирмы ведут работу по созданию этих лекарств. Уже получены синтетические и рекомбинантные дефензины.

На мышцах была показана эффективность применения HNP в комплексе с классическими антитуберкулезными средствами. HNP не только потенцировал эффект антитуберкулезных средств, но и вдвое снижал их терапевтическую дозу [40]. На примере вируса гриппа было показано, что обработка HNP перед инфицированием клеток вирусом ингибировала его репликацию. Этот факт позволит использовать лекарства на основе HNP для предотвращения бактериальных и вирусных инфекций.

При разработке лекарственных средств на основе hBD возможно использование комбинаций различных представителей этого субсемейства. Так, в экспериментах *in vitro* было показано, что комбинация из hBD-2 и hBD-4 в отношении *Pseudomonas aeruginosa* значительно снижало их MIC₅₀ (минимальную концентрацию ингибирующую 50% бактерий). Использование других комбинаций hBD не увеличило бактерицидной силы этого препарата [41].

Кроме того, обсуждаются компоненты лекарственных средств на основе hBD, для предотвращения их ингибирования в организме. Для нивелирования эффекта катепсинов предложено добавлять к hBD цистатины (природные ингибиторы катепсинов).

Существуют наработки по трансфекции генов hBD в соматические клетки. Терапевтическая трансфекция генов hBD в соматические клетки обеспечит новые стратегии генной терапии. Безусловно, эта методика еще требует ряд исследований перед внедрением в широкую клиническую практику.

Заметим, что использование таких препаратов не будет ограничено только антимикробными свойствами этих пептидов. Так, исследователи предлагают использовать hBD для лечения раковых заболеваний. Клеточная мембрана опухолевых клеток имеет большой отрицательный заряд на поверхности, поэтому она является более чувствительной к воздействию катионных пептидов, по сравнению с нормальными клетками организма. hBD (при некоторой модификации аминокислотной последовательности) могут индуцировать гибель раковых клеток. Отметим, что экспрессия hBD в раковых клетках снижена. hBD могут не только «напрямую» убивать раковые клетки, но и активировать гены, вызывающие супрессию рака [25].

Литература

1. Selsted M.E., Brown D.M., DeLange R.I., Lehrer R.I. Primary structures of MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *J. Cell Biol. Chem.* 1983; 258:14485-14489.
2. Bensch K, Raida M, Magert H-J., et al. hBD-1: a novel β -defensin from human plasma. *FEBS Lett.* 1995; 368: 331-335.
3. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroeder J-M. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 1997; 387: 861.
4. Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R et al. Identification of multiple novel epididymis-specific β -defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol.* 2002; 169: 2516-2523.
5. Kao C.Y., Chen Y., Zhao, Y.H., et al. ORFeome-based search of airway epithelial cell-specific novel human β -defensin genes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29: 71-80.
6. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J. of Leukocyte Biology.* 2004; 76: 909-926.
7. Linzemeier R.M., Ganz T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in α - and β -defensin regions at 8p22-23. *Genomics.* 2005; 86:423-430
8. Kaiser V. and Diamond G. Expression of mammalian defensin genes. *Journal of Leukocyte Biology.* 2000; 68:779-784.
9. Dale B. V., Fredericks L. P. Antimicrobial peptides in oral environment: expression and function in Health and disease. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2005; 7(2):119-133.
10. Mikkel F, Kamp S, Cowland J. B., et al. Prodefensins are matrix proteins of specific granules in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 2005;78:785-793.
11. Ong P.Y., Ohtake T., Brandt C., et al. Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med.* 2002; 347 (15):1151-1160.
12. Ericksen B., Wu Z., Lu W., Lehrer R.I. Antibacterial activity and specificity of the six human α -defensins. 2005; 49(1): 269-75.
13. Joly S., Maze C., McCray P.B., Guthmiller J.M. Human β -Defensin 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(3):1024-1029.
14. Van't Hof W., Veermann E. C. I, Helmerhorst E. J., Nieuw Amerongen A. V. Antimicrobial. Peptides: properties and applicability. *J. Biochem.* 2001; 382: 597-619.
15. Yount N. Y., Yeaman M. R. Immunocoinsilium: Perspectives in Antimicrobial. Peptide Mechanisms of Action and Resistance. *Protein and Peptide Letters.* 2005: 49-67.
16. Higazi A. A.-R., Ganz T., Karikoi K., et al. Modulates Tissue-type Plasminogen Activator and Plasminogen Binding to Fibrin and Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 1996; 271 (30):17650-17655.
17. Panyutich A.V., Hiemstra P.S., van Wetering S. and Ganz T. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1995; 12 (3) :351-357.
18. Paone G., Stevens L. A., Levine R. L. et al. ADP-ribosyltransferase-specific Modification of Human Neutrophil Peptide-1. *J. Biol. Chem.* 2006;281 (25):17054-17060.
19. Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L.W. and Oppenheim, J.J. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* 2002; 23: 291-296.
20. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of α - and β -defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 288 (3): 508-13.
21. Vaschetto R., Grinstein J., Del Sorbo L et al. J. Role of human neutrophil peptides in the initial interaction between lung epithelial cells and CD4⁺ lymphocytes. *Leukoc. Biol.* 2007; 81: 1022-1031.
22. Nishimura M, Abiko Y, Kurashige Y, et al. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. *J Dermatol. Sci.* 2004; 36:87-95.
23. Niyonsaba F, Ushio H, Nakano N, et al. Antimicrobial Peptides Human β -Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines. *J. Investigative Dermatology.* 2007;127:594-604.
24. Yang D, Chertov O, Oppenheim JJ. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(7) : 978-89.
25. Van Wetering S., Tjabringa S., Hiemstra P. S. Interaction between neutrophil-derived antimicrobial peptides and airway epithelial cells. *J. of Leukocyte Biology.* 2005; 77: 444-450.
26. Groeneveld TW, Ramwadhoeby TH, Trouw LA, et al. Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation. *Mol Immunol.* 2007; 44(14):3608-14.
27. Aarbiou J, Verhoosel R. M., van Wetering S. et al. Neutrophil Defensins Enhance Lung Epithelial Wound Closure and Mucin Gene Expression In Vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004; 30:193-201.
28. Oono T., Shirafuji Y., Huh W. K., et al. Effects of human neutrophil peptide-1 on the expression of interstitial collagenase and type I collagen in human dermal fibroblasts. *Archives of Dermatological Research.* 2002; 294 (4): 185-189.
29. Zang K., Lu Q., Zang Q., Hu X. Regulation of activities of NK cells and CD4 expression in T cells by human HNP-1, 2, and -3. *Biochem. Biophys Res Commun.* - 2004;323 (2) : 437-44.
30. Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, et al. Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (α -defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J.* 2004;18(11):1306-8.
31. Пак В.Г., Будихина А.С., Пашенков М.В. и соавт. Особенности функциональной активности нейтрофилов у больных хронической гранулематозной болезнью. *Иммунология.* 2007; 28 (4): 202-205.
32. Zhang L., Yu W., He T. et al.. Contribution of human β -defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* 2002; 298: 995-1000.
33. Howell M D. The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy & Clinical Immunology.* 2007;7(5):413-417.
34. Howell M.D. Boguniewicz M., Pastore S., et al. Mechanism of HBD-3 deficiency in atopic dermatitis. *J. Clinical Immunology.* 2006;121:332-338.
35. Starner T.D., Agerberth B., Gudmundsson G.H., et al. Expression and activity of β -defensins and LL-37 in the developing human lung. *J Immunol.* 2005;174 (3):1608-15.
36. Taggart C. C., Greene C. M., Smith S. G., Levine R. L., McCray P. B., O'neill S., McElvaney N. G. Inactivation of human β -defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J. Immunol.* 2003; 171(2):931-937.
37. Mahida YR, Cunliffe R.N. Defensins and mucosal protection. *Novartis Found Symp.* 2004; 263: 71-7.
38. PuËtsep K, Carlsson G, Boman H, et al. Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet.* 2002; 360: 1144-1149.
39. Sumako Yoshioka , Hiroshi Mukae , Hiroshi Ishii , et al. Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts *Life Sci.* 2007; 20 : 17367817
40. Kalita A., Verma I., and Khuller G. K. Role of Human Neutrophil Peptide-1 as a Possible Adjunct to Antituberculosis Chemotherapy. *J. Infectious Diseases.* 2004;190:1476-80.
41. Yanagi S., Ashitani J., Imai K., et al. Significance of human β -defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 63-69.