

М. С. Жаркова, Д. С. Орлов, В. Н. Кокряков, О. В. Шамова

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ: КЛАССИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ (обзорная статья)*

Антимикробные пептиды (АМП) фагоцитов и клеток барьерных эпителиев являются одними из ключевых молекул врожденного иммунитета, обеспечивающих противоифекционную защиту организма. Кроме антимикробного действия, АМП проявляют широкий спектр других биологических эффектов. Это дает основание рассматривать данные пептиды не только как антимикробные, но и как возможные биомодуляторные соединения. В обзоре рассматриваются основные принципы классификации и различные виды биологической активности АМП млекопитающих, принадлежащих к разным структурным классам. Обсуждаются структурные особенности крупнейших семейств АМП млекопитающих и основные этапы их взаимодействия с бактериальными клетками согласно современным представлениям о механизмах их антимикробного действия. Рассматриваются свойства АМП как иммуномодуляторных молекул, возможность их участия в процессах ранозаживления, способность связывать эндотоксины, проявлять противоопухолевое действие. Так как АМП рассматриваются в качестве перспективных молекул-прототипов для создания новых лекарственных препаратов, освещаются вопросы взаимосвязи их структуры с антимикробной активностью и механизмы бактериальной резистентности к действию данного рода соединений. Обсуждаются проблемы и перспективы практического применения АМП. Библиогр. 44 назв. Ил. 6. Табл. 1.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, антимикробные пептиды, дефенсины, кателицидины, протегрины, бактенецины.

MAMMALIAN ANTIMICROBIAL PEPTIDES: CLASSIFICATION, BIOLOGICAL ROLE, PERSPECTIVES OF PRACTICAL USE

M. S. Zharkova¹, D. S. Orlov^{1,2}, V. N. Kokryakov^{1,2}, O. V. Shamova^{1,2}

¹ Institute of Experimental Medicine of the North West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376, Russian Federation; manyvel@mail.ru, ds-orlov@yandex.ru, kokryakov@yandex.ru, oshamova@yandex.ru

² St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034, Russian Federation; ds-orlov@yandex.ru, kokryakov@yandex.ru, oshamova@yandex.ru

Antimicrobial peptides (AMPs) of phagocytes and epithelial cells are the key effector molecules of the innate immune system, providing the anti-infective host defense. Besides the antimicrobial action AMPs exert a broad spectrum of other biological activities, including various effects towards host cells. Thus, these peptides can be considered not only as antimicrobial agents, but also as potential biomodulators. The review outlines main principles of classification and different types of the biological activity of structurally diverse mammalian AMPs. It discusses specific structure patterns of the largest families of mammalian AMPs and key phases of AMPs interaction with bacterial cells according to the nowadays concept of a mode of their antimicrobial action. AMPs potential in immunomodulation and wound

М. С. Жаркова (manyvel@mail.ru): ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург; Д. С. Орлов (ds-orlov@yandex.ru): ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; В. Н. Кокряков (kokryakov@yandex.ru): ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9; О. В. Шамова (oshamova@yandex.ru): ФГБУ «НИИ ЭМ» СЗО РАМН, Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург; Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9.

* Работа поддержана РФФИ (гранты № 13-04-02102а; 12-04-01573а; 12-04-01498а).

healing, their endotoxin-binding and anticancer capabilities are reviewed. Since AMPs are considered as promising templates for a design of novel therapeutic agents, questions of their structure-activity relationship and mechanisms of bacterial resistance towards such compounds are considered. Problems and perspectives of practical use of AMPs are discussed. Refs 44. Figs 6. Tables 1.

Keywords: innate immunity, antimicrobial peptides, defensins, cathelicidins, protegrins, bactencins.

Место антимикробных пептидов (АМП) в иммунной системе организма

Традиционно систему иммунной защиты млекопитающих подразделяют на приобретенный (специфический, адаптивный) и врожденный (конституционный) иммунитет.

Отличительной особенностью приобретенного иммунитета является процесс цитогенетической перестройки лимфоцитов, приводящий в конечном итоге к антиген-специфическому ответу и формированию иммунологической памяти [1]. Другая характерная особенность приобретенного иммунитета — индуцибельность [2].

Благодаря специфичности ответа и формированию иммунологической памяти приобретенный иммунитет обеспечивает быструю и эффективную защиту от повторного инфицирования. Однако при первом контакте с возбудителем скорость адаптивного ответа оказывается недостаточной, чтобы контролировать острую инфекцию (рис. 1) [2].

Боле простая и менее специфическая система врожденного иммунитета возникла около 2,6 млрд лет назад, задолго до того, как у высших позвоночных в процессе эволюции сформировалась система приобретенного иммунитета. Этот механизм в достаточной степени быстр и мультифункционален [4].

Система врожденного иммунитета включает механические барьеры и физиологические факторы, препятствующие проникновению инфекционных агентов в организм. К ним относятся неповрежденная кожа и слизистые, различные секреты (слюна, слезы, моча, мокрота и др.), способствующие выведению или предотвращающие контакт разнообразных патогенов с организмом, а также, например, кислое значение рН желу-

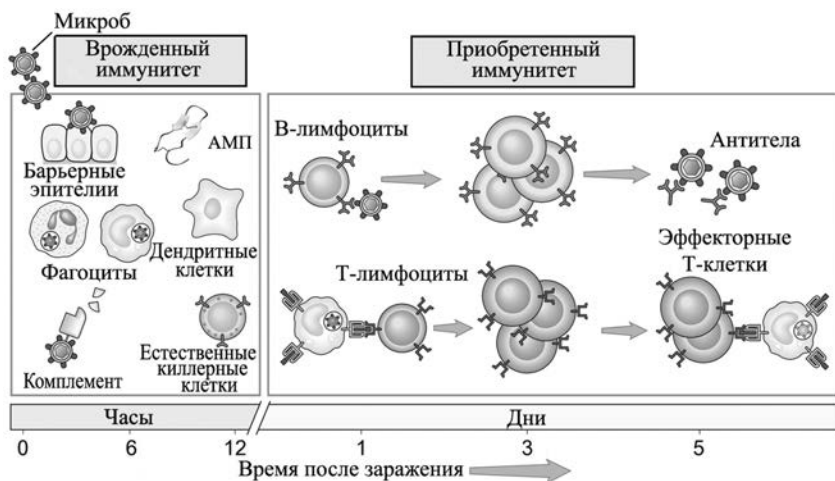


Рис. 1. Врожденный и приобретенный иммунитет [3]

дочного сока, мочи, влагалищного секрета, создающее неблагоприятные условия для роста и развития микроорганизмов [5, 6].

В системе врожденного иммунитета можно выделить клеточный и гуморальный компоненты. Клеточными факторами врожденного иммунитета являются мононуклеарные фагоциты (моноциты, тканевые макрофаги, нейтрофильные гранулоциты, эозинофилы, базофилы, тучные клетки) и естественные киллерные клетки [6, 7].

К гуморальным факторам защитной системы врожденного иммунитета относят систему комплемента; ферменты, участвующие в генерации активных форм кислорода и разрушающие клеточные стенки и мембраны; белки, связывающие нутриенты, доступные микроорганизмам в ограниченном количестве; полипептиды, способные формировать поры в мембранах микроорганизмов [2], либо оказывать микробоцидное действие через другие неферментативные механизмы [8]. Вещества последней группы, как правило, и подразумевают под общим названием *антимикробных пептидов* (АМП) [2, 8]. Они были выявлены на протяжении всей эволюционной цепочки от бактерий до высших растений, животных и грибов. Широкая видовая распространенность этих пептидов подтверждает их фундаментальную роль в защитной системе организма [2, 9]. Они участвуют в инактивации микроорганизмов при фагоцитозе и секретируются во внеклеточную среду; вырабатываются клетками эпителиев кожи, кишечника, дыхательных, мочевыводящих и половых путей, роговицей глаза; присутствуют в секретах слюнных, потовых и молочных желез, слезной жидкости [7, 10].

АМП: краткая история, структурные особенности, классификация

Представления о наличии у высших позвоночных антибактериальных соединений, ответственных за инактивацию микроорганизмов в фаголизосомах лейкоцитов, были заложены И. И. Мечниковым в фагоцитарной теории иммунитета (1903) [6, 11]. В 1905 г. А. Петерсон выделил из лейкоцитов гноя человека антимикробные субстанции, которые, по заключению автора, представляли смесь катионных протеинов, родственных по ряду свойств протаминам рыб, для которых к тому времени были показаны антимикробные свойства *in vitro*. В 1922 г. А. Флемингом был открыт бактериолитический фермент лизоцим, который можно считать первым белковым антибиотическим веществом животного происхождения с установленной первичной структурой [см. 1].

Наличие пептидных веществ, обладающих антибактериальной и фунгицидной активностью, вырабатываемых многими прокариотами, было установлено довольно давно, тогда как присутствие подобных соединений у животных и человека, а позднее и в растениях, было выявлено лишь в 1980-х годах с открытием цекропинов насекомых, дефенсинов кролика, морской свинки и человека, и магейнинов из кожи лягушки. Хотя первые исследования, из которых впоследствии выросли данные открытия, относятся еще к 1960-м годам [12]. После первых успехов выделение и описание АМП из различных источников быстро набрало обороты: они были выявлены как в клетках миелоидной линии, так и эпителиальной природы млекопитающих, амфибий, рыб, насекомых, птиц, растений и др. [13].

Несмотря на крайнее разнообразие в аминокислотной последовательности и пространственной организации, большинству АМП присущи следующие общие черты:

- *положительный заряд* (высокое содержание положительно заряженных аминокислотных остатков, в частности, аргинина и лизина);

- *высокое содержание гидрофобных аминокислотных остатков;*
- *амфипатическая структура* (пространственное разобщение заряженной и гидрофобной частей) [1, 14];
- *длина менее 60 аминокислотных остатков;*
- *широкий спектр антимикробной активности при физиологических условиях* [13] (за исключением АМП бактериальной природы — бактериоцинов, — которые, как правило, имеют довольно узкий спектр, ограниченный теми видами микроорганизмов, с которыми вырабатывающая их бактерия конкурирует в естественной среде [15]).

Следует подчеркнуть, что к АМП обычно относят только рибосомально синтезирующиеся полипептидные антимикробные вещества, имеющие соответствующее представительство в геноме [9, 16]. Таким образом, они включают лишь характерные для прочих белков организма аминокислоты и претерпевают только типовые посттрансляционные модификации в отличие от ряда нерибосомальных пептидных антибиотиков, вырабатываемых бактериями и грибами (бацитрацина, грамицидан S и др.) [16].

К настоящему времени открыто более 1500 различных АМП [17]. При всем разнообразии пептидов их классификация представляется довольно сложной задачей [18]. Существует несколько баз данных, в которых собрана информация о структуре и известных функциях открытых АМП (таблица).

Основные базы данных, посвященные АМП [17]

Год*	Название	Вэб-сайт	Содержание
2002	<i>AMSDb</i>	http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html	АМП животных / растений
2002	<i>SAPD</i>	http://oma.terkko.helsinki.fi:8080/~SAPD	Синтетические АМП
2004	<i>Peptaibol</i>	http://www.cryst.bbk.ac.uk/peptaibol/home.shtml	АМП грибов
2004	<i>APD</i>	http://aps.unmc.edu/AP	Природные АМП
2004	<i>ANTIMIC</i>	неактивна	»
2006	<i>PenBase</i>	http://penbase.immunaqua.com	АМП ракообразных
2006	<i>Cybase</i>	http://research1t.imb.uq.edu.au/cybase	Циклотиды
2007	<i>BACTIBASE</i>	http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php	Бактериоцины
2007	<i>Defensins</i>	http://defensins.bii.a-star.edu.sg	Дефенсины
2007	<i>AM Per</i>	http://marray.cmdr.ubc.ca/cgi-bin/amp.pl	АМП животных / растений
2008	<i>RAPD</i>	http://faculty.ist.unomaha.edu/chen/rapd/index.php	Рекомбинантные АМП
2009	<i>PhytAMP</i>	http://phytamp.pfba-lab-tun.org/main.php	АМП растений
2010	<i>CAMP</i>	http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial	Все АМП

* Указан год публикации статьи с описанием базы данных.

Возможна классификация на основании различных принципов:

- по источнику выделения (царству, типу и более мелким таксономическим единицам);
- по способу получения (естественные, синтетические, рекомбинантные), для синтетических также составляют классификацию по механизму модификации (если она есть);
- по принадлежности к определенному семейству или группе пептидов (дефенсины, кателицидины, тионины и др.);

- по физико-химическим свойствам (длине; степени гидрофобности; общему заряду цепи: катионные, анионные (последних значительно меньше и они мало изучены));
- по биологической активности (антибактериальные, противогрибковые, противовирусные, противоопухолевые, противопаразитарные, инсектицидные, гемолитические и т.п.) [17].

Наиболее распространенной является классификация на основании вторичной (пространственной) структуры. Согласно ей АМП подразделяют на:

- линейные α -спиральные (рис. 2, 1);
- содержащие β -слои, стабилизированные дисульфидными связями (рис. 2, 2);
- включающие как α -спиральные, так и β -складчатые участки (рис. 2, 4);
- циклические или образующие петли (рис. 2, 3);
- линейные, не имеющие определенной конформации пептиды, обогащенные определенной аминокислотой: пролином, триптофаном, гистидином, аргинином, глицином или их комбинациями (рис. 2, 5) [9, 14, 19].

Среди АМП высших позвоночных животных, в частности человека, выделяют два наиболее крупных и хорошо изученных семейства: дефенсины и кателицидины [9, 18], среди которых встречаются представители практически всех вышеперечисленных классов.

Дефенсины состоят в среднем из 30 аминокислотных остатков, и имеют молекулярную массу от 3,5 до 4,5 кДа. Содержат 6 высококонсервативных остатков цистеина, формирующих дисульфидные мосты, стабилизирующие их пространственную структуру, включающую тройной антипараллельный β -слой [10, 18] (некоторые включают и α -спиральные участки). Выделяются отсутствием ацилирования или гликозилирования по боковым цепям, высоким содержанием аргинина [10, 22]. Проявляют активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, грибов и вирусов [22].

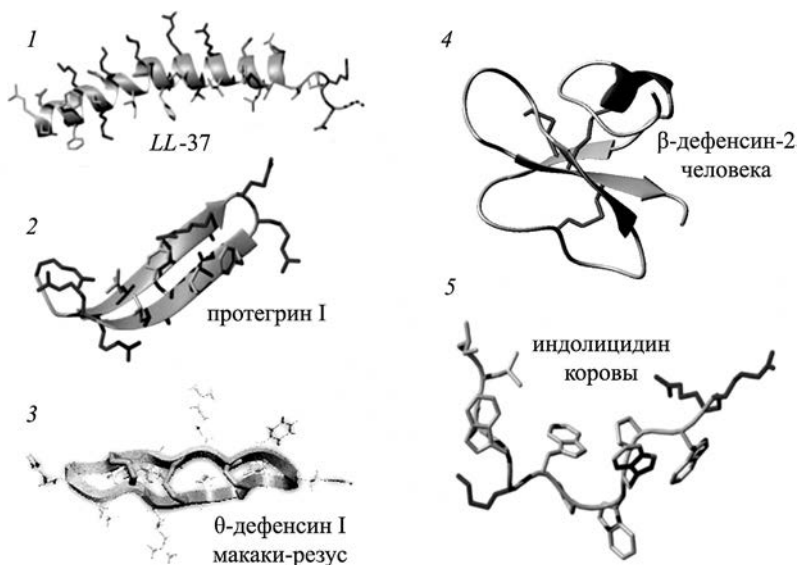


Рис. 2. Разнообразие пространственных структур АМП [19–21]

По характеру расположения дисульфидных связей дефенсины подразделяются на три подсемейства: α , β и θ -дефенсины [10, 18].

Для α -дефенсинов характерно образование дисульфидных мостов между 1–6, 2–4 и 3–5 цистеинами. Они обнаружены в секреторных гранулах нейтрофилов и других лейкоцитов. У большинства млекопитающих, исключая крупный рогатый скот, ряд α -дефенсинов продуцируется также клетками Панета в криптах тонкого кишечника (известны как криптидины), эпителиями кожи и уrogenитального тракта.

β -дефенсины характеризуются наличием дисульфидных мостов между 1–5, 2–4 и 3–6 цистеинами. Они синтезируются в большинстве эпителиальных клеток. Их продукция, как правило, индуцибельна; ее стимулируют провоспалительные стимулы и инфекции. Эти пептиды присутствуют в секретах слизистых респираторного, желудочно-кишечного и уrogenитального трактов, потовых желез, а также в коже при воспалении. β -дефенсины также вырабатываются в моноцитах, макрофагах и дендритных клетках человека, являются важными компонентами азурофильных гранул нейтрофилов коровы [18, 22, 23].

θ -дефенсины менее распространены в природе (экспрессируются у некоторых приматов Старого Света, первоначально открыты в гранулах нейтрофилов макак-резусов). Они являются циклическими молекулами, состоящими из двух фрагментов, содержащих по 8 аминокислот каждый, сходных с половиной α -дефенсина, в каждом фрагменте по 3 цистеиновых остатка. Благодаря циклической структуре микробоцидная активность θ -дефенсинов в отличие от таковой α -дефенсинов не зависит от концентрации солей. РНК-транскрипты генов гомологов θ -дефенсинов обнаружены в клетках красного костного мозга человека, однако они содержат стоп-кодон в вышележащей (upstream) сигнальной последовательности, препятствующий их трансляции [18, 23].

Дефенсины, как и большинство АМП, синтезируются в виде более длинных молекул-предшественников. Зрелые пептиды высвобождаются путем ограниченного протеолиза [10].

Другое крупное семейство природных АМП — *кателицидины* — выделено в большей степени из-за сходного механизма продукции [23]. Все кателицидины синтезируются в виде неактивных предшественников, содержащих консервативную N-концевую последовательность [24] (N-концевой сигнальный пептид из 30 аминокислотных остатков), высоко консервативную последовательность, называемую кателиновым доменом (99–114 аминокислотных остатка) [25] и C-концевой антимикробный домен, длина и аминокислотная последовательность которого варьирует в широких пределах (рис. 3) [24]. Кателиновый домен имеет высокую степень гомологии с белком кателином, впервые выделенным из нейтрофилов свиньи, который содержит 96 аминокислотных остатков и является ингибитором катепсина L (откуда название кат-эЛ-ин) [25]. Термин «кателицидины» был предложен в 1995 г. М. Занетти с соавторами [11], чтобы подчеркнуть эволюционную связь нового семейства белков с кателином.

Белок-предшественник расщепляется путем ограниченного протеолиза с высвобождением кателин-подобного белка и антимикробного пептида [23]. Предполагается, что кателин-подобный фрагмент наряду с C-концевым пептидом также проявляют ряд биологических свойств, связанных с защитной системой организма [24]. Кателицидины продуцируются главным образом в нейтрофилах циркулирующей крови и клетках красного костного мозга; вторым по важности источником кателицидинов в организме являются эпителиальные клетки [25].

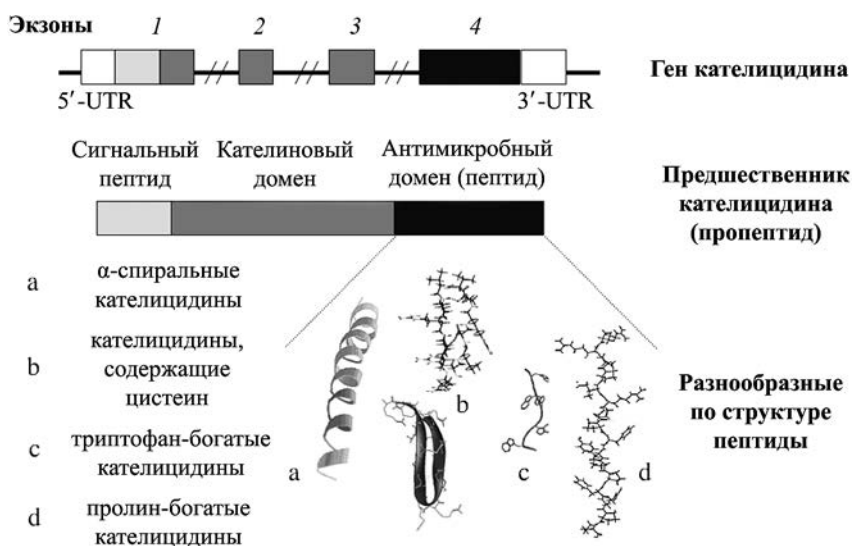


Рис. 3. Схема строения кателицидина, его гена и предшественника

Гены кателицидинов имеют размер около 2 кб и обладают консервативной четырехэкзонной/трехинтронной организацией. Экзоны с 1 по 3 кодируют 5'UTR (5' нетранслируемую область), сигнальный пептид и кателиновый профрагмент, а экзон 4 — антимикробный домен и 3'UTR [24].

Зрелые кателицидины крайне разнообразны по длине, аминокислотной последовательности и пространственной структуре [2]. Пептиды этой группы, содержащие амфипатическую α-спираль, были обнаружены у человека, обезьяны, мыши, кролика, морской свинки, овцы, крупного рогатого скота, свиньи и лошади [26]. Один из наиболее полно изученных α-спиральных кателицидинов — богатый аргинином и лизином пептид LL-37, вырабатываемый многими клетками организма человека. Помимо микробицидной, он обладает широким спектром других биологических функций: иммуномодулирующей, хемоаттрактантной, противоопухолевой, ранозаживляющей активностью [10, 22, 27].

Примером триптофан-богатого кателицидина является *индолицидин*, выделенный из нейтрофилов крупного рогатого скота [13]. Он содержит 13 аминокислотных остатков, включая 3 регулярно расположенных остатка пролина и 5 остатков триптофана. В пространстве принимает конформацию вытянутой спирали [24].

Все известные на данный момент *пролин-богатые пептиды* млекопитающих также относятся к кателицидинам. Пептиды этой группы обнаружены только у парнокопытных; их отличительной особенностью является высокое содержание пролина (от 33 до 49%) и наличие тандемных повторяющихся последовательностей. Также они содержат большое количество аргинина (от 13 до 33%), некоторые богаты фенилаланином [28, 29]. Анализ структуры отдельных представителей данной группы позволяет предположить, что биологически активной конформацией таких пептидов является полипролиновая спираль II типа [24, 28]. Она стабилизируется главным образом гидрофобными ван-дер-ваальсовыми силами, что оставляет боковые водородные связи свободными для межмолекулярных взаимодействий. Первые представители этой группы были вы-

делены из нейтрофилов циркулирующей крови коровы и названы *бактенецинами*. Позднее сходные с ними по структуре пептиды были выявлены у коз и овец. Пептид с высоким содержанием пролина (P) и аргинина (R) *PR-39* и другой пептид, дополнительно обогащенный фенилаланином, — *профенин* — были выделены из слизистой кишечника свиньи [28].

Среди кателицидинов есть и пептиды, содержащие цистеин (*протегрины*, образующие β -слои; *додекапептид*, обладающий петлеобразной структурой и др.) [25]. Додекапептид, найденный у крупного рогатого скота, содержит два остатка цистеина и образует петлю из 12 аминокислотных остатков, стабилизированную дисульфидным мостиком. Протегрины — группа пептидов, выделенных из лейкоцитов свиньи [26], содержат от 16 до 18 аминокислотных остатков и характеризуются наличием двух внутримолекулярных дисульфидных связей, а также амидированием по С-концевому аргинину. ЯМР спектроскопия PG-1 показала, что он принимает конформацию двойного антипараллельного β -слоя с гидрофобным центральным участком и двумя гидрофильными участками на концах [24].

На сегодняшний день кателицидины найдены только у млекопитающих [25], тогда как дефенсины в природе представлены более широко — например, обширную группу составляют дефенсины растений [17].

Множество других АМП не относят ни к дефенсинам, ни к кателицидинам. Важными примерами являются гистатины и дермицидин. *Гистатины* — богатые гистицином катионные пептиды, секретируемые слюнными железами, — обладают противогрибковой активностью [23] и способствуют ранозаживлению. Они способны связывать ионы металлов (цинка, никеля, меди), лишая микробные клетки важных для работы ферментов кофакторов. Фунгицидная активность гистатинов обеспечивается другим участком молекулы. Показано, что гистатин не нарушает целостности мембраны микробной клетки, а проникает внутрь за счет транслокации, где связывает ряд важных для жизнедеятельности клетки веществ [16].

Дермицидин — анионный пептид, присутствующий в секрете потовых желез человека, — обладает умеренными, не зависящими от концентрации солей антимикробными свойствами против грамотрицательных и грамположительных бактерий. Анионные пептиды составляют среди АМП весьма немногочисленную группу, поэтому особенности их действия мало изучены [22]. Показано, что дермицидин действует на мембрану по нелитическому механизму, его влияние на клетку в конечном итоге проявляется в снижении синтеза РНК и белков, однако конкретные структуры бактерии, с которыми он взаимодействует, не идентифицированы [16]. По различным предположениям возникновение отрицательно заряженных АМП является эволюционным механизмом борьбы с микроорганизмами, которые приспособились модифицировать поверхностные структуры своих мембран таким образом, чтобы снизить их отрицательный заряд и соответственно электростатическое взаимодействие с катионными АМП [30]. По другим данным более важными для анионных пептидов являются иные биологические свойства [19]. Показано, что дермицидин стимулирует продукцию цитокинов и хемокинов кератиноцитами [9].

Механизм микрообидного действия

Микрообидную активность большинства АМП связывают с их способностью взаимодействовать с липидными мембранами [28], благодаря амфипатической структуре и наличию положительного заряда, обеспечивающим гидрофобное и электростатическое взаимодействие [31]. Описанию механизмов их действия посвящено большое число работ, в которых для выявления особенностей данного процесса использовали широкий набор современных методов, включая создание модельных мембран, изучение формирования отдельных ионных каналов, флуоресцентные методы, круговой дихроизм, ЯМР, рассеяние нейтронов [13] и компьютерное моделирование [32].

Запускаемый пептидами клеточный киллинг может протекать очень быстро для одних пептидов, другим же требуется от 15 до 90 мин. Вне зависимости от конкретного механизма действия для всех АМП предполагают наличие следующих этапов в инактивации бактерий [33].

1. Электростатическое взаимодействие положительно заряженных молекул АМП с отрицательно заряженными компонентами клеточной оболочки микроорганизмов (фосфатные группы тейхоевых и липотейхоевых кислот грамположительных бактерий и липополисахаридов грамотрицательных бактерий, головки кислых фосфолипидов (ФЛ) и др.), и их адсорбция на поверхности микробных клеток [13].

2. Проникновение через капсулу, состоящую из пептидогликана (после проникновения через внешнюю мембрану грамотрицательной бактерии), либо через клеточную стенку грамположительной бактерии, основным компонентом которой также является пептидогликан. Несмотря на большое количество работ, посвященных мембранотропному механизму действия АМП, этот этап остается малоизученным [16, 33].

3. Нарушение структурной целостности мембраны микробной клетки при встраивании АМП. Потеря клеткой жизненно важных компонентов через бреши в мембране, диссипация мембранного потенциала, дезорганизация мембраностроенных мультиферментных комплексов, кластеризация заряженных липидов [19, 34]. Подавление дыхания, окислительного фосфорилирования, репликации, транскрипции, синтеза белка и других метаболических процессов, а также накопление в клетках воды, вызывающее набухание и возможный их разрыв (осмотический лизис), приводят к гибели микроорганизма [1]. В ряде работ показано, что встраивание АМП на начальном этапе приводит к истончению липидной мембраны (рис. 4).

Для описания мембранолитического действия АМП предложено несколько моделей. На данный момент выделяют три основных механизма.

- *Модель бочарной клепки.* Пептиды адсорбируются на мембране и встраиваются в нее так, что их гидрофобные области ориентированы в сторону липидных хвостов мембранных ФЛ, а гидрофильные формируют внутреннюю поверхность поры.

- *Формирование тороидальных пор.* Адсорбированные на мембране пептиды агрегируют и формируют поры так, что их гидрофильные области остаются электростатически связанными с головками ФЛ. В зоне мембранных ФЛ поры оказываются ориентированы не поперек, а вдоль плоскости мембраны.

- *Ковровый механизм.* Адсорбированные на мембране пептиды располагаются параллельно поверхности мембраны, формируя сплошной слой или «ковер». При достижении определенной концентрации отдельные пептиды проникают в мембрану, формируя тороидальные поры. В конечном итоге АМП, подобно детергентам, разрывают мембрану на части, формируя мицеллы [13, 33].

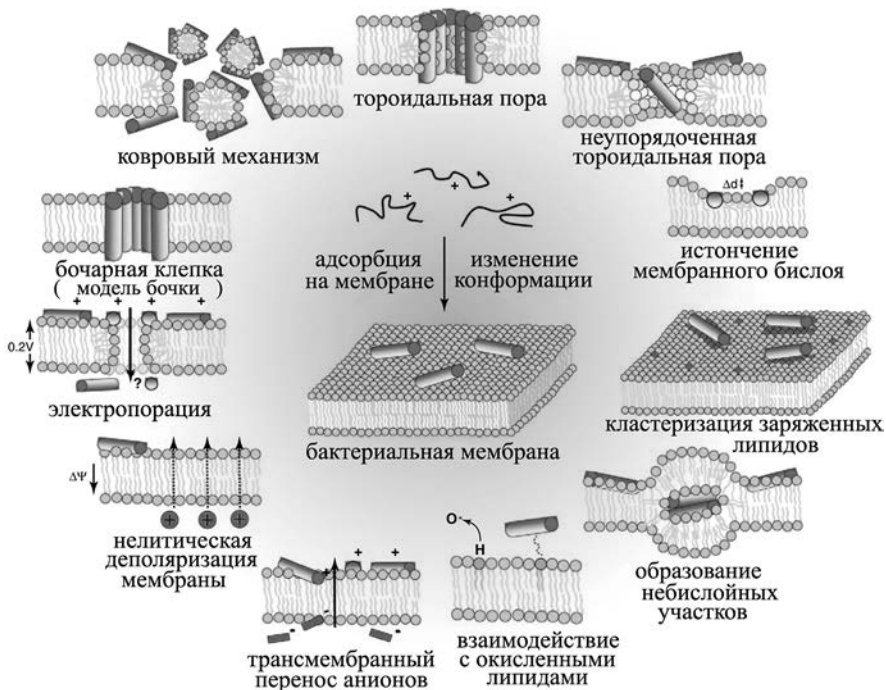


Рис. 4. Разнообразные влияния, предположительно оказываемые АМП на мембраны микроорганизмов [13]



Рис. 5. Внутриклеточные пути микробицидного действия АМП [33]

Один и тот же пептид может действовать в соответствии с той или иной моделью в зависимости от условий эксперимента [31, 34]. Кроме того, для ряда АМП показаны различные внутриклеточные пути бактериального киллинга, не сопровождающиеся существенным увеличением проницаемости цитоплазматической мембраны микроорганизма (рис. 5) [33].

Селективность действия АМП в отношении микробных клеток. Зависимость «структура—активность»

Вне зависимости от механизма действия АМП его первоначальный контакт с поверхностными структурами клетки играет важнейшую роль [35].

Селективность АМП по отношению к бактериальным клеткам (по сравнению с эукариотическими) связывают с различием в липидном составе их мембран. Мембраны бактерий содержат большое количество кислых ФЛ (фосфатидилглицерол, кардиолипин) и других отрицательно заряженных молекул (липополисахариды, тейхоевые кислоты). В мембранах клеток млекопитающих во внешнем слое преобладают нейтральные ФЛ с амбивалентными головками, к которым АМП проявляют меньшее сродство. Кроме того, мембраны животных клеток содержат холестерин, который придает им дополнительную механическую устойчивость к проникновению пептида [31, 35]. Для антибактериальной активности пептидов с немембранолитическим механизмом действия может быть важным взаимодействие с определенными структурами на поверхности бактерии (гепаран сульфатом, прокариотическим шапероном DnaK, определенными рецепторами или белками-переносчиками), участвующими в процессе их транслокации через липидный бислой [14, 35, 36].

Тем не менее АМП в достаточно высоких концентрациях проявляют мембранолитическую активность и в отношении эукариотических клеток [23]. Существует предположение, что одной из причин в различии действующих антимикробной и токсической концентраций является то, что эукариотические клетки обладают куда большей удельной поверхностью мембраны, соответственно, для ее значительного повреждения требуется больше молекул пептида [35].

Выявлены определенные закономерности между такими физико-химическими параметрами молекул АМП, как величина заряда, амфипатичность, гидрофобность, гибкость цепи и наличие остатков ароматических аминокислот с их антимикробной активностью и токсичностью в отношении эукариотических клеток.

Показано, что оптимальная величина заряда АМП лежит в пределах от +4 до +6. При дальнейшем повышении заряда возможно снижение селективности действия, увеличение цитотоксичности и даже снижение антимикробной активности из-за уменьшения амфипатичности структуры.

Амфипатичность характеризуется степенью пространственного разделения заряженных и гидрофобных участков молекулы. Показано, что при ее увеличении растет как антимикробная, так и цитотоксическая активность АМП, причем, например, гемолитическая активность возрастает в большей степени, чем бактерицидная.

Увеличение гидрофобности приводит к снижению специфичности и увеличению токсичности в отношении эукариотических клеток. Предполагается, что при взаимодействии с бактериальными клетками ведущую роль играют электростатические вза-

имодействия, тогда как при контакте с цвиттерионными фосфолипидами животных клеток — гидрофобные.

Наличие гибких, например богатых глицином, участков, нарушающих строгую регулярность вторичной структуры молекулы АМП, важно для обеспечения селективности. Модификация этих участков с уменьшением гибкости приводит к росту токсичности.

Наличие в структуре АМП ароматических аминокислот способствует увеличению их антимикробной активности. Это связывают с π -катионными взаимодействиями, за счет которых положительно заряженные аминокислотные остатки в составе АМП экранируются от гидрофобного липидного окружения, что облегчает встраивание пептида в мембрану. Довольно массивная боковая цепь ароматических аминокислот также способствует большему разрыхлению липидного слоя [37].

Другие химические модификации природных АМП, например циклизация, способны повлиять на их селективность, однако для различных пептидов один и тот же тип модификации может привести к противоположным эффектам и данный вопрос требует дальнейшего изучения [35].

Бактериальная резистентность к АМП

Нельзя сказать, что за всю историю сосуществования микроорганизмов с иммунной системой, в частности с АМП, они не выработали никаких механизмов защиты. Основная стратегия борьбы микробов с катионными АМП состоит в подавлении их экспрессии клетками макроорганизма, выделении в окружающую среду протеаз, способных к их расщеплению, либо в модификации поверхностных компонентов своей мембраны с целью уменьшения ее отрицательного заряда (модификация фосфатидилглицерола остатками лизина, тейхоевых кислот D-аланином, фосфатных групп ЛПС этаноламином и аминокарабинозой и т. п.) [10, 38]. В мембране микроорганизмов также присутствуют белковые помпы с низкой селективностью, способные удалять наравне с другими веществами и АМП, проникшие в бактериальную клетку [38].

Тем не менее АМП остаются надежной защитой от инфекционных заболеваний. Этому можно найти несколько объяснений. Во-первых, АМП в условиях организма способны не только к прямому, но и опосредованному киллингу микроорганизмов через различные иммуномодулирующие эффекты. Во-вторых, их усиленная продукция в очаге воспаления, возможно, приводит к созданию таких высоких локальных концентраций, что микробная клетка не может полностью компенсировать их действие. В-третьих, мишенью АМП является весьма обширный и неспецифический набор клеточных структур, и их тотальная перестройка оказывается для микроба достаточно непростым и затратным делом. И, наконец, не следует забывать, что в условиях *in vivo* АМП различных структурных классов действуют в тесной кооперации друг с другом и с другими антимикробными веществами, одновременно осуществляя различные противомикробные стратегии [10].

Отдельные исследования показывают, что развитие *in vitro* резистентности к АМП у изначально чувствительных к ним бактериальных штаммов маловероятно. Тем не менее подобные работы пока немногочисленны и этот вопрос требует более глубокого и всестороннего рассмотрения [13].

Другие биологические свойства АМП

Исторически интерес к АМП вызван благодаря присущим им антимикробным свойствам, однако в последние годы все больше внимания уделяется другим аспектам их биологического действия [23]. В пользу наличия у АМП альтернативных свойств говорит и то, что прямая микробицидная активность пептидов, демонстрируемая ими *in vitro*, в условиях *in vivo* часто блокируется физиологическими концентрациями солей, моно- и дивалентных ионов (Mg^{2+} , Ca^{2+}), компонентами сыворотки крови [30]. На примере ряда АМП показано, что они могут участвовать в заживлении ран, являться хемоаттрактантами для иммунных клеток в процессе воспаления, стимулировать ангиогенез, связывать компоненты разрушенных бактериальных клеток (рис. 6), оказывать цитотоксические, в частности противоопухолевые, эффекты [13, 29, 39].

Участие в тканевой репарации. Показано влияние PR-39 на продукцию синдекана-1 и -4 — поверхностных клеточных протеогликанов, играющих важную роль в ряде механизмов заживления ран, в частности, во взаимодействии гепарин-связывающих факторов роста (например, фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF), трансформирующий фактор роста- β (TGF- β)) с мембранами. Сходный механизм показан для LL-37. Кроме того, этот пептид оказывает противofiброзный эффект, способствуя нормальному ранозаживлению. Различные дефенсины и кателицидины способны стимулировать миграцию и пролиферацию эпителиальных клеток, что приводит к ускорению закрытия ран [10, 26].

Участие в ангиогенезе. На *in vitro* и *in vivo* моделях показано влияние PR-39 на ангиогенез. Предполагается наличие минимум двух различных механизмов регуляции:

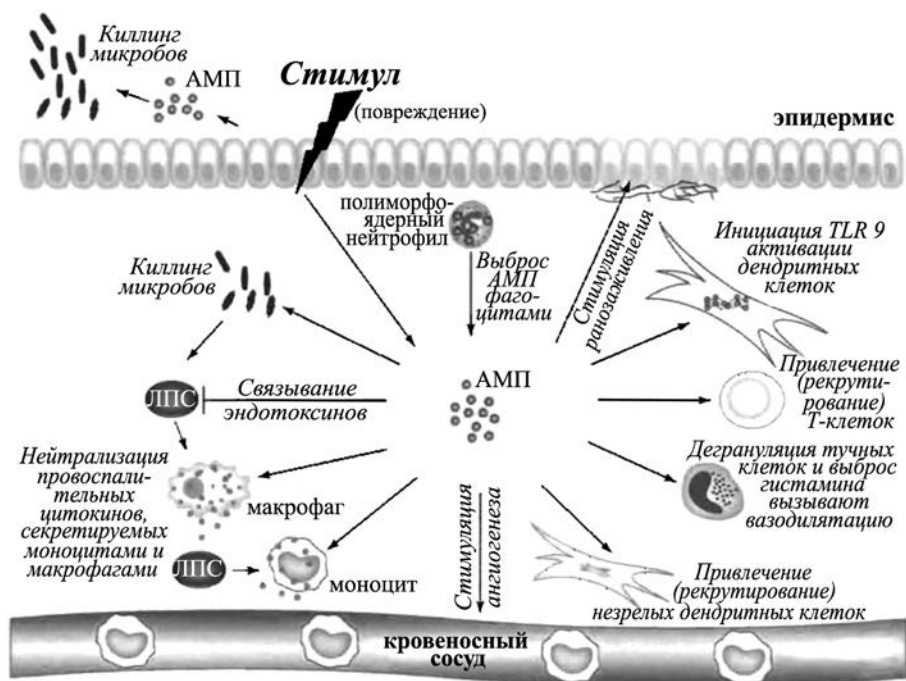


Рис. 6. Многообразие биологических функций АМП [10]

через влияние на продукцию синдекана-1 и -4 и, следовательно, изменение активности гепарин-связывающих факторов роста, либо через регуляцию гипоксия-индуцируемого фактора HIF-1 α за счет ингибирования убиквитинового пути его деградации. HIF-1 α стимулирует синтез ряда факторов ангиогенеза, в том числе VEGF [26]. Различные пути стимуляции деления эндотелиальных клеток и формирования ими трубчатых структур показаны для LL-37 и дефенсинов человека [10].

Привлечение иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления, связь с приобретенным иммунитетом. По данным исследований, PR-39 является хемоаттрактантом для нейтрофилов, причем заметный эффект достигается уже при субантимикробных концентрациях. Аналогичные свойства в отношении нейтрофилов, моноцитов и Т-лимфоцитов проявляет кателицидин человека LL-37 [10]. Показаны сходные эффекты и для дефенсинов. Кроме того, АМП могут привлекать иммунные клетки в очаг воспаления по непрямому механизму, стимулируя продукцию провоспалительных цитокинов, в частности, активируя тучные клетки. В ряде исследований выявлено, что АМП оказывают модулирующее воздействие и на адаптивный иммунитет: способствуют активации лимфоцитов, созреванию дендритных клеток и более эффективной презентации антигенов на их поверхности, стимулируют продукцию иммуноглобулинов [13].

Связывание бактериальных эндотоксинов. В результате попадания в кровеносное русло большого количества компонентов клеточных стенок бактерий, стимулирующих иммунный ответ, может развиваться гиперактивация иммунной системы. В случае грамотрицательных бактерий главным эндотоксином является липополисахарид клеточной стенки, в случае грамположительных — тейхоевые и липотейхоевые кислоты. ЛПС связывается ЛПС-связывающим белком (LBP) и в комплексе с ним взаимодействует с рецепторами на поверхности моноцитов, что в конечном итоге приводит к выбросу провоспалительных медиаторов. Похожим образом реализуется эффект и грамположительных эндотоксинов. Было замечено, что АМП могут нейтрализовать подобные эффекты за счет связывания компонентов клеточных стенок микроорганизмов и блокирования дальнейшей стимуляции ими иммунных клеток [30].

Цитотоксичность и противоопухолевое действие. Цитотоксичность в той или иной степени свойственна всем мембранолитическим АМП (в высоких концентрациях практически все АМП действуют на клетки аналогично детергентам). Замечено, что наибольшей токсичностью в отношении эукариотических клеток отличаются пептиды, содержащие гидрофобный фрагмент на N- или C-конце. Особенно чувствительны к АМП активно делящиеся и раковые клетки. Многие опухолевые клетки имеют более высокое содержание анионных ФЛ во внешнем слое цитоплазматической мембраны, что делает их сходными с клетками прокариот. Было показано, что ряд АМП (некоторые дефенсины, LL-37, PR-39, магейнины, цекропины, лактоферрицин и др.) индуцируют гибель раковых клеток, при этом оставаясь низкотоксичными для нормальных клеток (в применяемых концентрациях). Онколитические механизмы действия АМП могут включать запуск некроза за счет литических эффектов в отношении клеточной мембраны, запуск апоптоза через нарушение мембранной организации или немембранолитические эффекты [39, 40, 41].

Проблемы и перспективы практического использования АМП

Потенциально АМП могут быть использованы: 1) как самостоятельные противомикробные или противоопухолевые агенты; 2) в комбинации с другими антибиотиками или противовирусными препаратами для получения аддитивных или синергических эффектов; 3) как иммуностимулирующие агенты; 4) в качестве нейтрализаторов бактериальных эндотоксинов для предотвращения возможных осложнений, таких как септический шок [4, 16, 23]. Подробное изучение различных, в частности немембранных, механизмов действия АМП может выявить новые жизненно-важные молекулы-мишени микробных и раковых клеток, а сами они — послужить моделями для синтеза непептидных аналогов [28].

С терапевтической точки зрения к преимуществам АМП можно отнести их активность против широкого спектра микроорганизмов (бактерий, вирусов, грибов), быстрый киллинг, потенциально низкую вероятность развития резистентности, сопутствующий спектр противовоспалительных свойств. Основными недостатками являются: высокая стоимость синтеза, а следовательно, как исследований, так и полномасштабного производства; системная и местная токсичность; снижение активности под действием солей, компонентов сыворотки крови, рН; подверженность протеолизу; возможные аллергические эффекты; сопутствующие биологические функции (например, ангиогенез) [4]. Необходимо отметить, что в решении проблемы получения пептидов к настоящему времени заметны существенные успехи. Так, например, удалось преодолеть ряд сложностей, возникающих при рекомбинантном синтезе АМП в гетерогенных системах, содержащих бактерии, связанных с антибактериальной активностью конечного продукта [42, 43].

Распространение бактериальных штаммов, резистентных к классическим антибиотикам, вызывает рост интереса к изучению активности АМП, как потенциально нового класса антибиотиков, действенного против мультирезистентных патогенов. Однако, несмотря на большой прогресс в лабораторных исследованиях, лишь несколько производных АМП на сегодняшний день используются в клинике (плектазин — дефенсин, P-113 — производное гистатина, несколько синтетических аналогов индолицидина и др. [18]) или находятся на заключительных стадиях клинических испытаний, причем большинство предназначено для местного, а не системного применения [16, 23].

Несмотря на сравнительно низкую вероятность развития резистентности, подобная перспектива в случае применения природных АМП должна быть тщательно оценена, так как они занимают важное место в системе иммунной защиты, и это может привести к значительному увеличению вирулентности микроорганизмов [8]. В настоящее время появляется все больше работ, посвященных разработке небелковых миметиков, синтетических модификаций, рассмотрению возможности создания комплексных препаратов АМП с другими веществами, так как описанные стратегии позволяют снизить или устранить различные негативные эффекты их применения, а также повысить устойчивость, селективность действия или, например, снизить экономические затраты [18, 43, 44].

Литература

1. Кокряков В. Н. Биология антибиотиков животного происхождения. СПб.: Наука, 1999. 162 с.
2. Bevins C. L. Antimicrobial peptides as effector molecules of mammalian host defense // *Contrib. Microbiol.* 2003. Vol. 10. P. 106–148.

3. Abbas A. K., Lichtman A. H. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier, 2009. 312 p.
4. Gordon Y. J., Romanowski E. G., McDermott A. M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs // *Curr. Eye Res.* 2005. Vol. 30, N7. P. 505–515.
5. Галактионов В. Г. Иммунология. М.: Изд-во МГУ, 1998. 480 с.
6. Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб.: Наука, 2006. 261 с.
7. Tosi M. F. Innate immune responses to infection // *J. Allergy. Clin. Immunol.* 2005. Vol. 116, N2. P. 241–249.
8. Maróti G., Kereszt A., Kondorosi E., Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals // *Res. Microbiol.* 2011. Vol. 162, iss. 4. P. 363–374.
9. Steinstraesser L., Kraneburg U., Jacobsen F., Al-Benna S. Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality // *Immunobiology.* 2011. Vol. 216, iss. 3. P. 322–323.
10. Lai Y., Gallo R. L. AMPed Up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense // *Trends Immunol.* 2009. Vol. 30, iss. 3. P. 131–141.
11. Мечников И. И. Лекции о сравнительной патологии воспаления. СПб.: Издание К. Л. Риккера, 1903. 604 с.
12. Antimicrobial peptides: methods and protocols / eds A. Giuliani, A. C. C. Rinaldi // *Series: methods in molecular biology.* Vol. 618. New York: Springer Humana Press, 2010. 424 p.
13. Diamond G., Beckloff N., Weinberg A., Kisich K. O. The roles of antimicrobial peptides in innate host Defense // *Curr. Pharm. Des.* 2009. Vol. 15, iss. 21. P. 2377–2392.
14. Rahnamaeian M. Antimicrobial peptides. Modes of mechanism, modulation of defense responses // *Plant Signal Behav.* 2011. Vol. 6, iss. 9. P. 1325–1332.
15. Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria / Lüders T., Birkemo G. A., Fimland G., Nissen-Meyer J., Nes I. F. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. Vol. 69, iss. 3. P. 1797–1799.
16. Wiesner J., Vilcinskas A. Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system // *Virulence.* 2010. Vol. 1, iss. 5. P. 440–464.
17. Antimicrobial peptides: discovery, design, and novel therapeutic strategies / ed. by G. Wang // *Advances in molecular and cellular microbiology*, 18. CAB International, 2010. 230 p.
18. Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Terán L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease // *Clin. Immunol.* 2010. Vol. 135, iss. 1. P. 1–11.
19. Nguyen L. T., Haney E. F., Vogel H. J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action // *Trends Biotechnol.* 2011. Vol. 29, iss. 9. P. 464–472.
20. Innate immunity: from plants to humans / Borregaard N., Elsbach P., Ganz T., Garred P., Svejgaard A. // *Immunology Today.* 2000. Vol. 21, iss. 2. P. 68–70.
21. Jessen H., Hamill P., Hancock R. E. W. Peptide antimicrobial agents // *Clin. Microbiol. Rev.* 2006. Vol. 19, N3. P. 491–511.
22. Bernard J. J., Gallo R. L. Protecting the boundary: the sentinel role of host defense peptides in the skin // *Cell Mol. Life Sci.* 2011. Vol. 68, iss. 13. P. 2189–2199.
23. Nijnik A., Hancock R. E. W. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections // *Emerging Health Threats J.* 2009. Vol. 2. e1. URL: <http://www.eht-journal.net/index.php/ehj/article/view/7078> (дата обращения: 10.12.2013)
24. Zanetti M. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2005. Vol. 7. P. 179–196.
25. Zaiou M., Gallo R. L. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics // *J. Mol. Med.* 2002. Vol. 80, N9. P. 549–561.
26. Ramanathan B., Davis E. G., Ross C. R., Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity // *Microbes Infect.* 2002. Vol. 4, N3. P. 361–372.
27. Schaubert J., Gallo R. L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008. Vol. 122, N2. P. 261–266.
28. Pro-rich antimicrobial peptides from animals: structure, biological functions and mechanism of action / Gennaro R., Zanetti M., Benincasa M., Podda E., Miani M. // *Curr. Pharm. Des.* 2002. Vol. 8, iss. 9. P. 763–778.
29. Биологическая активность обогащенных пролином защитных пептидов системы врожденно-го иммунитета / Ямщикова Е. В., Орлов Д. С., Колодкин Н. И., Жаркова М. С., Пазина Т. Ю., Саку-та Г. А., Трулев А. С., Кокряков В. Н., Шамова О. В. // *Цитокины и воспаление.* 2012. Т. 11, №1. С. 36–39.

30. Role of host defense peptides of the innate immune response in sepsis / Hirsch T., Metzger M., Niederbichler A., Steinau H. U., Eriksson E., Steinstraesser L. // *Shock*. 2008. Vol. 30, N 2. P. 117–126.
31. *Khandelia H., Ipsen J.H., Mouritsen O. G.* The impact of peptides on lipid membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1778, iss. 7–8. P. 1528–1536.
32. *Wimley W. C.* Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model // *ACS Chem. Biol.* 2010. Vol. 5, N 10. P. 905–917.
33. *Brogden K. A.* Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? // *Nat. Rev. Microbiol.* 2005. Vol. 3, N 3. P. 238–250.
34. *Wimley W. C., Hristova K.* Antimicrobial peptides: successes, challenges and unanswered questions // *J. Membr. Biol.* 2011. Vol. 239, iss. 1–2. P. 27–34.
35. *Matsuzaki K.* Control of cell selectivity of antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta*. 2009. Vol. 1788, iss. 8. P. 1687–1692.
36. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета / Кокряков В. Н., Алешина Г. М., Шамова О. В., Орлов Д. С., Андреева Ю. В. // *Мед. акад. журн.* 2010. Т. 10, № 4. С. 149–160.
37. *Takahashi D., Shukla S. K., Prakash O., Zhang G.* Structural determinants of host defense peptides for antimicrobial activity and target cell selectivity // *Biochimie*. 2010. Vol. 92, iss. 9. P. 1236–1241.
38. *Otto M.* Bacterial sensing of antimicrobial peptides // *Contrib. Microbiol.* 2009. Vol. 16. P. 136–149.
39. Изучение молекулярно-клеточных основ цитотоксического действия антимикробных пептидов на опухолевые клетки / Шамова О. В., Орлов Д. С., Пазина Т. Ю., Ямщикова Е. В., Орлов С. Б., Жаркова М. С., Гринчук Т. М., Арцыбашева И. В., Юхнев В. А., Кокряков В. Н. // *Фундаментальные исследования*. 2012. № 5 (ч. 1). С. 207–212.
40. *Al-Benna S., Shai Y., Jacobsen F., Steinstraesser L.* Oncolytic activities of host defense peptides // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. Vol. 12, iss. 11. P. 8027–8051.
41. *Hoskin D. W., Ramamoorthy A.* Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides // *Biochim. Biophys. Acta*. 2008. Vol. 1778, iss. 2. P. 357–375.
42. Cost-effective expression and purification of antimicrobial and host defense peptides in *Escherichia coli* / Bommarius B., Jenssen H., Elliott M., Kindrachuk M., Pasupuleti J., Gieren H., Jaeger K.-E., Hancock R. E. W., Kalman D. // *Peptides*. 2010. Vol. 31, iss. 11. P. 1957–1965.
43. Exploring the pharmacological potential of promiscuous host-defense peptides: from natural screenings to biotechnological applications / Silva O. N., Mulder K. C. L., Barbosa A. E. A. D., Otero-Gonzalez A. J., Lopez-Abarrategui C., Rezende T. M. B., Dias S. C., Franco O. L. // *Front. Microbiol.* 2011. Vol. 2. a.232. URL: <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb.2011.00232/full> (дата обращения: 10.12.2013).
44. *Held-Kuznetsov V., Rotem S., Assaraf Y. G., Mor A.* Host-defense peptide mimicry for novel antitumor agents // *FASEB J.* 2009. Vol. 23, N 12. P. 4299–4307.

Статья поступила в редакцию 14 октября 2013 г.

Сведения об авторах

Жаркова Мария Сергеевна — аспирант

Орлов Дмитрий Сергеевич — кандидат медицинских наук, доцент

Кокряков Владимир Николаевич — доктор биологических наук, профессор;

Шамова Ольга Валерьевна — доктор биологических наук, доцент

Zharkova Maria S. — Post-graduate student

Orlov Dmitry S. — Ph.D., Associate Professor

Kokryakov Vladimir N. — Doctor of Biology, Professor

Shamova Olga V. — Doctor of Biology, Associate Professor