

ФИЗИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА

УДК 577.112

Е. Г. Богомолова, М. Н. Берлов, Я. А. Дубровский, Е. С. Кораблева, В. Н. Кокряков

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИМИКРОБНЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БЕЛКОВ ИЗ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ГОЛУБОГО ПЕСЦА *ALOPEX LAGOPUS*

Введение

Антимикробные белки и пептиды являются частью механизмов врожденного иммунитета, который обеспечивает немедленную реакцию организма на проникшую инфекцию [1, 2]. Уже не вызывает сомнений ведущая роль в инактивации микроорганизмов и оболочечных вирусов группы разнообразных по химической структуре пептидов (дефенсины, кателицидины, цекропины, магейнины и др.) и белков (лизоцим, серпроцидины, бактерицидный белок, увеличивающий проницаемость, лактоферрин, пероксидазы и др.), продуцируемых фагоцитами и эпителиальными клетками человека и животных [2–7]. Данные агенты действуют посредством нарушения целостности клеточной мембраны и ингибирования метаболических процессов микроорганизмов. Многие антимикробные белки и пептиды способны ингибировать провоспалительную активность липополисахаридов грамотрицательных бактерий [2, 4–6].

Изучение антимикробных катионных белков и пептидов как молекулярных факторов врожденного иммунитета имеет, в частности, большое практическое значение в плане их потенциального применения в медицине как нового класса антибиотиков, препаратов для борьбы с сепсисом. Также интересны фундаментальные исследования по выявлению спектров антимикробных агентов, содержащихся в лейкоцитах крови различных животных, их сравнения у эволюционно близких видов [2, 3, 7].

Голубой песец составляет основу пушного промысла в северных регионах, а также является объектом клеточного разведения. В условиях интенсификации звероводства усиливается негативное влияние стресс-факторов различной природы, сопровождающееся заболеваниями животных и снижением их продуктивности. В последнее время получают популярность работы, связанные с исследованием влияния гуморального звена иммунной системы при заболеваниях пушных зверей. В частности, Л. В. Аникиева и соавторы [8] в своей работе показали важную роль факторов врожденного иммунитета при токкаскаридозе песцов на примере лизоцима, бета-лизинов, и компонентов комплемента. Известен также ряд других работ, косвенно свидетельствующих о наличии лизоцима в сыворотке крови голубого песца, показанного по ферментативной

активности [9–11]. Выделение белка и его характеристика в этих работах не проводились. В различных базах данных белков (UniProt, Protein Data Bank) сведения о лизоциме песка также отсутствуют. Кроме того, не удалось найти в литературе работ, описывающих другие антимикробные белки и пептиды из лейкоцитов этого вида. В связи с этим было особенно интересно изучить спектр антимикробных белков, присущих голубому песцу. В настоящей работе впервые выделен в гомогенном виде лизоцим, а также выделен и охарактеризован антимикробный белок, предположительно принадлежащий к группе НК-лизинов.

Методы исследования

Выделение белков. Белки выделяли из лейкоцитарной фракции крови голубого песка *Alorex lagopus* путем двух последовательных экстракций 10%-ной уксусной кислотой. Лейкоциты были получены из крови песка путем гемолиза эритроцитов 0,85% NH_4Cl с последующим центрифугированием при 400 g 10 мин. Суспензия лейкоцитов в дистиллированной воде хранилась при температуре -20°C . Для получения экстрактов материал разморозили и центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 g. Затем к осадку добавили 10%-ную уксусную кислоту (из расчета 4 мл на 1 г клеток), гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера (стекло-тефлон) и инкубировали 90 мин при температуре 4°C , после чего центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 g. Отобранный супернатант представляет собой первый экстракт.

К осадку прибавили то же количество 10%-ной уксусной кислоты, гомогенизировали с помощью гомогенизатора Поттера и инкубировали 12 ч при температуре 4°C , после чего центрифугировали в течение 40 мин при 10 000 g. Отобранный после этого супернатант представляет собой второй экстракт.

Очистка белков. Для выделения индивидуальных фракций антимикробных белков использовали следующие хроматографические методы. *Гель-фильтрация* применялась для разделения белкового материала экстрактов. Использовали колонку длиной 83 см, диаметром 2,2 см, заполненную биогеом P-10, уравновешенным 5%-ной уксусной кислотой. *Обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография* (офВЭЖХ) проводилась на колонке C18 (Agilent Technologies Zorbax SB) длиной 15 см, диаметром 0,46 см, с диаметром гранул 5 мкм. Разделение проводили на хроматографической системе Beckman System Gold. Использовали следующую систему растворителей: А — 0,1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) в высокоочищенной воде, В — 0,1%-ная ТФУ в ацетонитриле; они подавались градиентно, как описано в таблице.

Схема постановки градиента растворителя

Время разделения, мин	А, %	В, %
0	100	0
10	80	20
60	30	70
75	0	100

Ионообменная хроматография использовалась на заключительных стадиях очистки лизоцима песка. Пробу наносили на колонку длиной 4 см, диаметром 1,3 см, за-

полненную карбоксиметилцеллюлозой и уравновешенную 0,02 М натрий-ацетатным буфером (рН 4,65). Для элюции белков применяли линейный градиент концентрации NaCl 0,2–0,8 М в 0,02 М натрий-ацетатном буфере (рН 4,65).

Определение антимикробной активности белков. Для анализа антимикробной активности применяли два вида антимикробных тестов: метод наложения гелей и метод радиальной диффузии [12] против грамположительных и грамотрицательных бактерий — *Listeria monocytogenes* (штамм EGD) и *Escherichia coli* (штамм ML-35p) соответственно и гриба *Candida albicans* (штамм 820). При использовании метода наложения гелей на чашки Петри, залитые агарозой, содержащей клетки микробов, помещали гели после проведения электрофореза в кислой буферной системе (методика приведена ниже). Согласно методу радиальной диффузии, делали в агарозе лунки диаметром 4 мм, куда вносили анализируемые пробы. В качестве положительного контроля использовали ультрафильтрат экстракта из лейкоцитов крови кролика, содержащий дефенсины, а в качестве отрицательного — 0,01%-ную уксусную кислоту. В обоих методах чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 3 ч, после чего добавляли агарозу с питательной средой и инкубировали 18 ч при температуре 37 °С. В результате размножения микробов агароза мутнеет. Зоны ее просветления (зоны ингибирования роста) являются участками, на которых бактерии не выросли, и свидетельствуют о проявлении пробой антимикробной активности.

Для оценки минимальной ингибирующей концентрации использовали результаты четырех независимых экспериментов. Данные приводятся как среднее арифметическое \pm стандартная ошибка.

Электрофорез. Спектр белков в различных фракциях, а также гомогенность полученных препаратов оценивали двумя электрофоретическими методами: электрофорез в кислой буферной системе (5%-ная уксусная кислота) в 12,5%-ном ПААГ в присутствии 6,25 М мочевины по методу С. Паньима и Р. Челкли [13] и в 16%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методу Г. Шаггера и Г. фон Джагова [14].

Выявление углеводного компонента в белковых пробах. Для анализа присутствия углеводного компонента в интересующей пробе использовали окраску гелей реактивом Шиффа после проведения электрофореза в кислой буферной системе и окисления гликопротеинов иодной кислотой [15]. В качестве положительного контроля использовали препарат гликопротеина — лактоферрин человека, а в качестве отрицательного — лизоцим человека.

Выявление дисульфидных связей. Для выявления дисульфидных связей в анализируемом белке проводили окисление пробы надмуравьиной кислотой [16] и алкилирование [17].

В случае окисления надмуравьиной кислотой пробы инкубировались на ледяной бане с реагентом (450 мкл муравьиной кислоты и 50 мкл 30%-ного пероксида водорода, предварительно инкубированных 1 ч при комнатной температуре) в течение 2 ч. Затем избыток надмуравьиной кислоты удаляли двумя промывками дистиллированной водой, пробы сушили с помощью аппарата SpeedVac Savant. Результаты анализировали электрофорезом в кислой буферной системе. В качестве положительного контроля использовали белок, содержащий 4 дисульфидные связи — лизоцим человека.

Алкилирование проводилось с использованием восстанавливающего (0,025 М дитиотреитол, 0,1 М Трис-HCl, рН 7,8) и алкилирующего (0,078 М иодоацетамид, 0,1 М

Трис-НCl, pH 7,8) реагентов. Проба, высушенная с помощью аппарата SpeedVac Savant, перерастворялась в 10 мкл 6 М мочевины в 0,1 М Трис-НCl, pH 7,8. Затем к ней добавляли 5 мкл восстанавливающего раствора и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После этого добавляли 5 мкл алкилирующего раствора и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Далее для инактивации не прореагировавшего иодоцетамида добавляли 20 мкл восстанавливающего раствора и также инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Полученную смесь очищали от реагентов на картридже ZipTip C18 и высушивали с помощью аппарата SpeedVac Savant. Результаты опыта анализировали с помощью масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ. Образцы для проведения анализа растворяли в 10 мкл 0,1%-ной ТФУ в воде. На мишень наносили 0,5 мкл матрицы (синапиновой кислоты) (20 мг/мл в 0,1%-ной ТФУ в 50%-ном ацетонитриле) и 0,5 мкл образца. Затем высушили на воздухе.

Использовали времяпролетный масс-спектрометр Axima Performance с источником MALDI, оснащенном УФ-лазером (337 нм). Детектировали положительные ионы в диапазоне m/z от 4000 до 20 000 Д. Масс-спектры регистрировали при помощи программы MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония). В качестве внешнего стандарта использовали смесь, содержащую пептид LL-37 (кателицидин человека), цитохром с лошади и лизоцим человека (MH^+ 4494,4, 12359,1 и 14701,6 Д соответственно). Обработку спектров, полученных при помощи масс-спектрометра MALDI-TOF Axima, проводили в программе MALDI-MS Shimadzu Biotech (Shimadzu, Япония).

Определение ферментативной активности лизоцима. Ферментативную активность лизоцима определяли по гидролизу клеточной стенки бактерии *Micrococcus lysodeikticus* [18]. В качестве субстрата использовали лиофилизированный препарат бактерий ("Sigma", США). При определении оптимума pH ферментативной активности использовали 0,1 М натрий-цитратный буфер с различными значениями pH (в диапазоне 3,0–6,2).

Результаты исследования

С помощью описанных методов удалось выделить индивидуальные фракции двух антимикробных белков из лейкоцитов крови голубого песка *Alopex lagopus*. Один из выделенных белков — лизоцим был идентифицирован по электрофоретической подвижности и характерной ферментативной активности — способности лизировать клеточную стенку чувствительных бактерий *Micrococcus lysodeikticus*. Второй выделенный белок предположительно является НК-лизином, однако наши данные не позволяют утверждать это с уверенностью, поэтому в дальнейшем он обсуждается как «неизвестный белок». Были охарактеризованы некоторые физико-химические и функциональные свойства выделенных белков.

Лизоцим. Данный белок был выделен из первого экстракта. Для очистки использовали сначала гель-фильтрацию на биогеле P-10, затем высокоэффективную жидкостную хроматографию (рис. 1, а) для выделения лизоцима в гомогенном виде. Мы получили несколько фракций, содержащих лизоцим и незначительное количество примесных белков, для удаления которых использовали ионообменную хроматографию. Для обессоливания полученного препарата осуществляли диализ против дистиллированной воды. Гомогенность лизоцима оценили методами электрофореза в кислой среде и в присутствии SDS (рис. 2, а и 2, б).

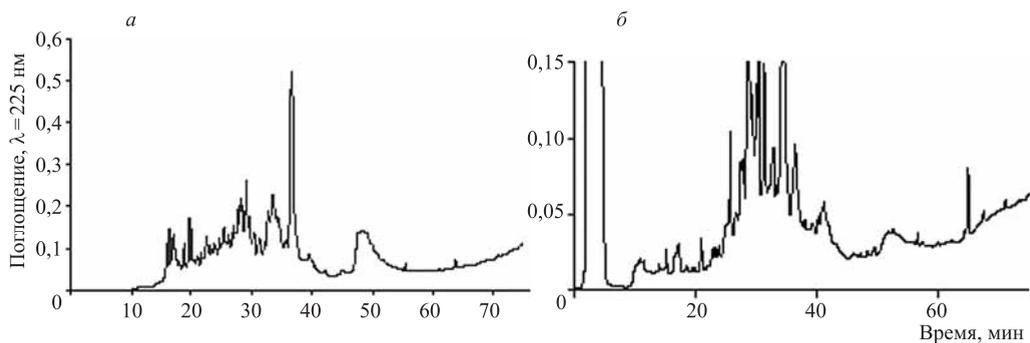


Рис. 1. Хроматограммы разделения проб с помощью офВЭЖХ:

a — проба, полученная из первого экстракта; *б* — проба, полученная из второго экстракта. По оси абсцисс — время разделения в минутах; по оси ординат — значение поглощения проб при длине волны 225 нм.

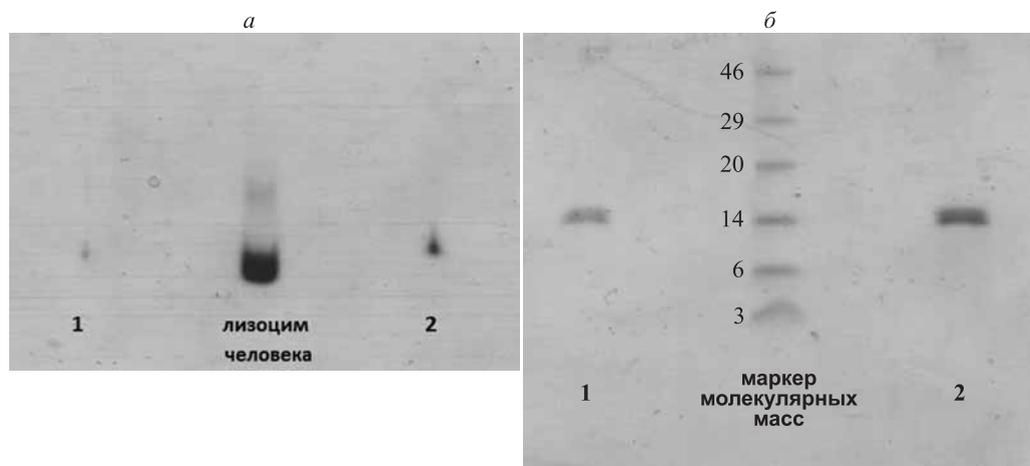


Рис. 2. Электрофореграммы очищенного лизоцима:

a — после проведения электрофореза в кислой буферной системе; *б* — после проведения электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. 1, 2 — порядковые номера фракций лизоцима песка. На рис. 1, *б* приведены значения молекулярных масс стандартных белков в кД.

Был определен оптимум рН ферментативной активности лизоцима песка (рис. 3), равный 5,8. В качестве сравнения использовали лизоцим человека, его рН-оптимум также оказался равным 5,8. Согласно литературным данным, лизоцим человека обладает оптимальной ферментативной активностью при рН 6,0 [19], что близко к полученному нами значению. Известны лизоцимы, содержащиеся в желудочном соке некоторых животных, обладающие оптимальной активностью при существенно меньших значениях рН, что говорит о значительной варибельности рН-оптимума лизоцимов. Полученный результат показывает, что гомологичные белки из лейкоцитов крови голубого песка и человека обладают сходными ферментативными свойствами.

С помощью антимикробного теста методом радиальной диффузии была определена минимальная ингибирующая концентрация данного белка против *L. monocytogenes*, равная $6,0 \pm 1,2$ мкг/мл ($0,42 \pm 0,08$ мкМ); против *E. coli* вплоть до концентрации 2 мг/мл (140 мкМ) лизоцим не активен.

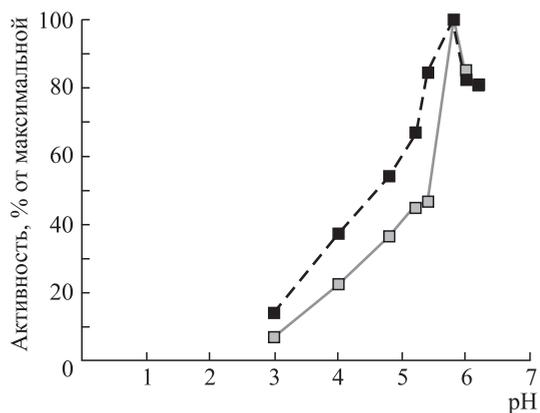


Рис. 3. Результат опытов по определению минимальной ингибирующей концентрации лизоцима против *L. monocytogenes*

За минимальную ингибирующую принималась концентрация, соответствующая точке пересечения экспериментальной кривой с осью абсцисс [8].

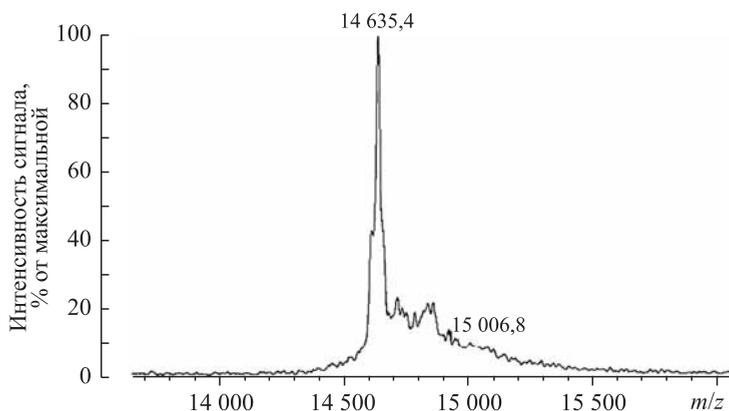


Рис. 4. Масс-спектр лизоцима песка

По оси абсцисс — отношение молекулярной массы (Д) к заряду иона (m/z); по оси ординат — интенсивность сигнала, в процентах от максимальной (то же для рис. 7 и 9). Значение m/z 14635 для однозарядного иона соответствует значению молекулярной массы 14634 Д.

С помощью масс-спектрометрического анализа (рис. 4) удалось определить молекулярную массу выделенного лизоцима песка, оказавшуюся равной 14634 Д.

Выделенный неизвестный антимикробный белок. Данный белок выявлен как в первом, так и во втором экстрактах. Полученные экстракты были последовательно подвергнуты гель-фильтрации и офВЭЖХ. Ниже представлены результаты разделения с помощью офВЭЖХ проб из первого и второго экстрактов (см. рис. 1, а и 1, б). На первой хроматограмме (см. рис. 1, а) следует отметить пики, соответствующие лизоциму и исследуемому в дальнейшем белку. Лизоцим элюировался на 35–37 мин, что соответствует 45–47% ацетонитрила, а исследуемый белок — на 46–53 мин при разделении проб из пер-

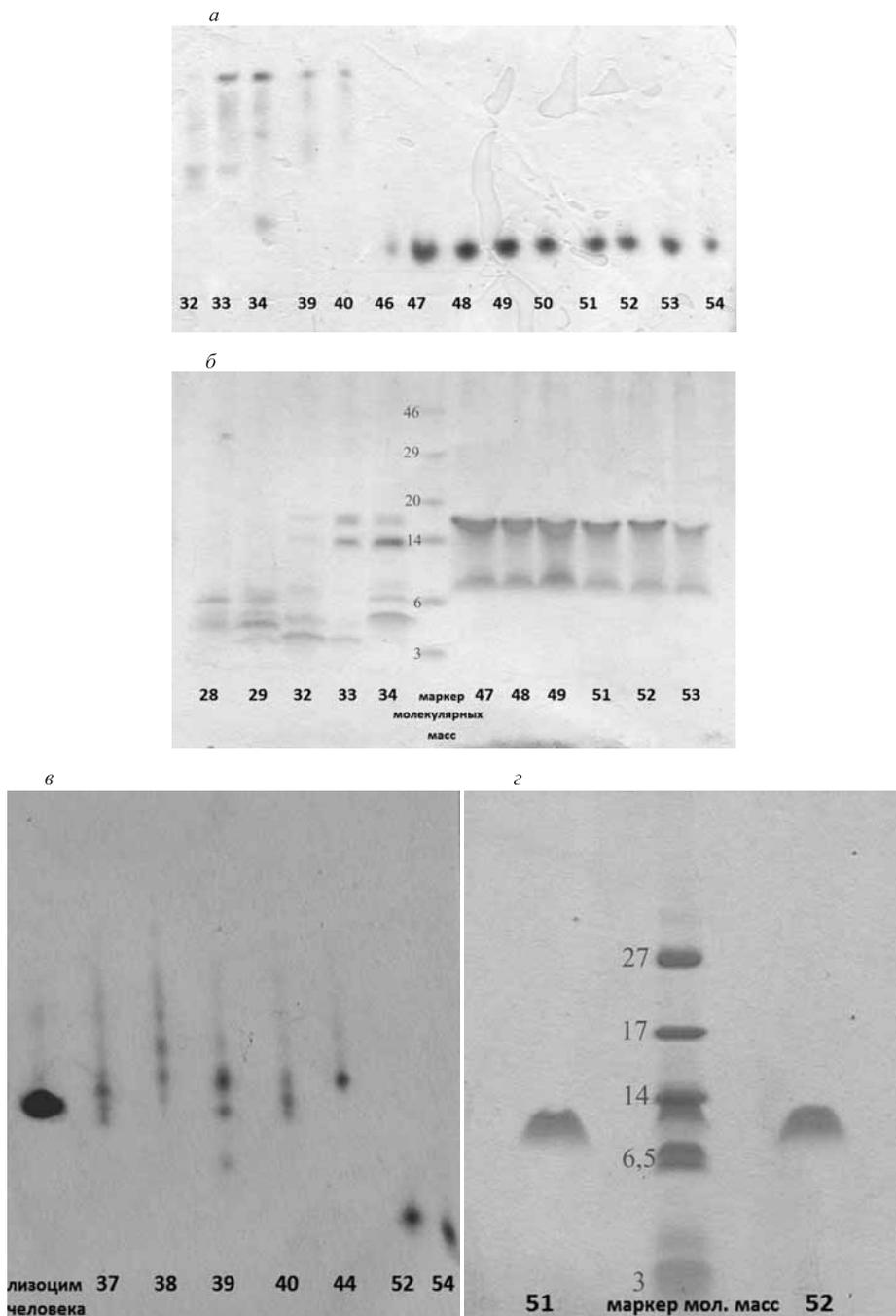


Рис. 5. Электрофореграммы фракций, полученных с помощью офВЭЖХ:

a и *б* — пробы, полученные из первого экстракта; *в* и *г* — пробы, полученные из второго экстракта; *a* и *в* — после проведения электрофореза в кислой буферной системе; *б* и *г* — после проведения электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия. Числами обозначены номера проб в порядке их выхода с хроматографической колонки (46–54 — порядковые номера фракций антимикробного белка). На рис. 5, *б* и 5 *г* приведены значения молекулярных масс стандартных белков в кД.

вого экстракта (57–63% ацетонитрила) и 51–54 мин при разделении проб из второго экстрактов (61–64% ацетонитрила) (см. рис. 1, а и 1, б). Поскольку время задержания белков на колонке при данном способе разделения коррелирует со степенью гидрофобности, можно сделать вывод о высокой гидрофобности выделенного нами белка.

Результаты разделений оценивали методами электрофореза в кислой буферной системе и в присутствии SDS (рис. 5), а затем проводили антимикробный тест методом радиальной диффузии против *E. coli* и *L. monocytogenes* (рис. 6). Согласно этому эксперименту наибольшую антимикробную активность проявляют пробы выделенного неизвестного белка, причем как против грамотрицательной, так и против грамположительной бактерий.

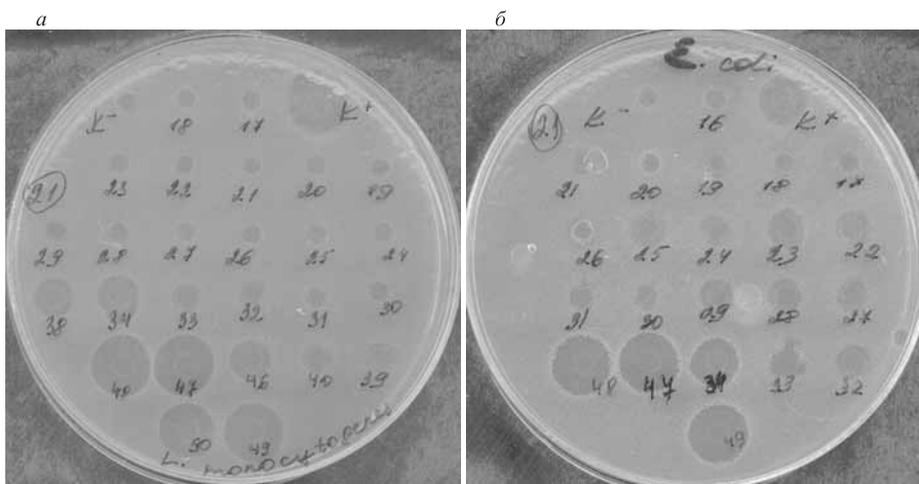


Рис. 6. Результаты антимикробного теста фракций, полученных с помощью офВЭЖХ, методом радиальной диффузии против *E. coli* (а) и *L. monocytogenes* (б):

Числами обозначены номера проб в порядке их выхода с хроматографической колонки (46–50 — порядковые номера фракций белка).

На геле после электрофореза в кислой среде в присутствии мочевины выделенный из обоих экстрактов белок выглядит в виде одной полосы, существенно опережающей лизоцим человека по подвижности к катоду. Поскольку разделение белков данным методом происходит не только по их молекулярной массе, но и в зависимости от величины их положительного заряда, можно сделать вывод, что данный белок представляет собой высококатионную молекулу. Интересно, что после электрофореза в присутствии SDS белок, выявленный в первом экстракте, разделяется на две полосы на уровне около 18 и 9 кД с заметной зоной между ними, что не наблюдается в случае белка из второго экстракта. Такая картина может иметь место вследствие того, что белки из первого и второго экстрактов являются изоформами, одна из которых (выделенная из первого экстракта) склонна к димеризации.

По данным масс-спектрометрического анализа (рис. 7) удалось определить молекулярную массу выделенного нами белка, она оказалась равной 9035 Д. Для опыта использовали препарат, полученный после разделения пробы из второго экстракта.

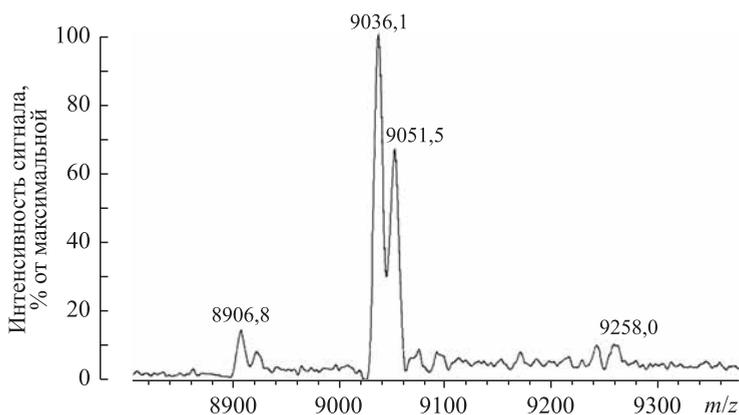


Рис. 7. Масс-спектр изучаемого белка

Значение m/z 9036 для однозарядного иона соответствует значению молекулярной массы 9035 Д.

Этот белок был проанализирован для выявления наличия в его структуре углеводного компонента. Эксперимент показал, что углеводный компонент в выделенном белке отсутствует (данные не приведены).

Выделенный белок проанализировали с целью обнаружения присутствия в нем дисульфидных связей. Результат эксперимента по окислению белка надмуравьиной кислотой анализировали с помощью электрофореза в кислой буферной системе (рис. 8). Как видно на электрофореграмме, после окисления выделенный белок существенно изменил электрофоретическую подвижность и разделился на три полосы. Согласно данному эксперименту, в состав выделенного белка входят серосодержащие

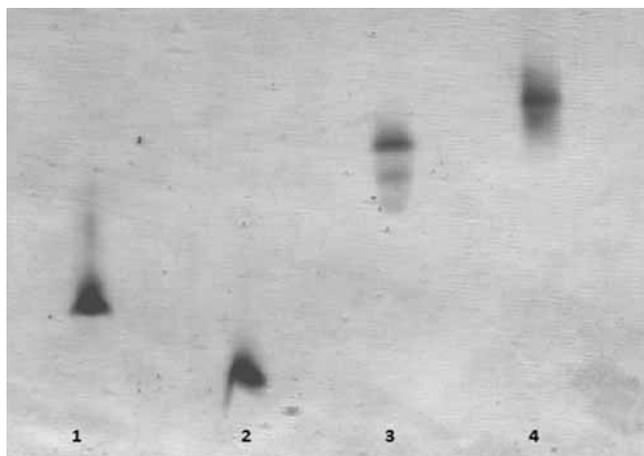


Рис. 8. Электрофореграмма после электрофореза в кислой буферной системе белков, подвергнутых окислению надмуравьиной кислотой:

1 — нативный лизоцим человека; 2 — нативный исследуемый белок; 3 — исследуемый белок после окисления; 4 — лизоцим человека после окисления.

аминокислотные остатки, а наличие нескольких полос может отражать различную степень окислительных модификаций белка.

Для определения количества дисульфидных связей мы провели алкилирование исследуемого белка. Результат оценивали масс-спектрометрически (рис. 9). С помощью этого эксперимента нам удалось определить, что в состав изучаемого белка входят три дисульфидные связи. При восстановлении дисульфидных связей и алкилировании белка иодоацетомидом молекулярная масса возрастает на 58 Д в расчете на один остаток цистеина. Молекулярная масса нативного белка — 9035 Д (см. рис. 7), модифицированного — 9383 Д (см. рис. 9), разница составляет 348 Д, что соответствует

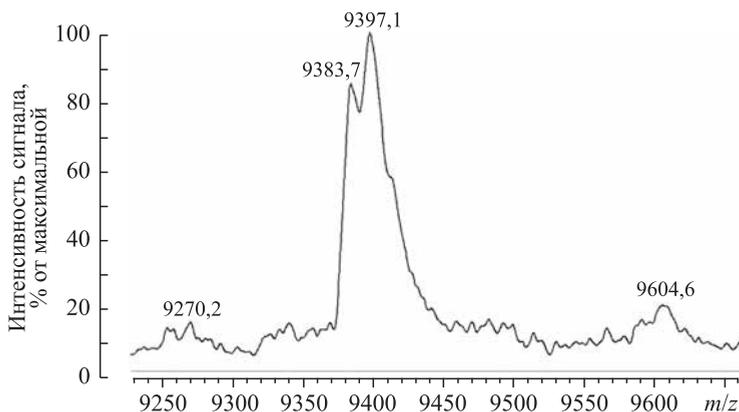


Рис. 9. Масс-спектр алкилированного антимикробного белка

шести остаткам цистеина в молекуле. Можно предположить, что они образуют три дисульфидные связи, так как разница в 348 Д соответствует именно такой ситуации, хотя величина возможной погрешности измерения и не позволяет считать это доказанным. Тем не менее в большинстве секретируемых белков и во всех известных антимикроб-

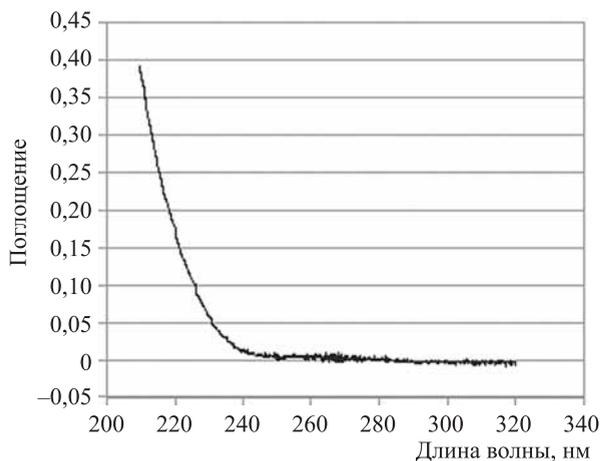


Рис. 10. Спектр поглощения изучаемого белка

ных белках и пептидах лейкоцитов остатки цистеинов замыкаются дисульфидными связями [1–3, 7], что позволяет нам допустить наличие трех дисульфидных связей в молекуле изучаемого белка.

С помощью спектрофотометра Beckman DU 720 был определен спектр поглощения изучаемого белка в диапазоне длин волн от 200 до 320 нм (рис. 10). В диапазоне 200–240 нм наблюдается нисходящее плечо пика, максимум которого находится в области менее 200 нм, что

характерно для молекул белковой природы. Незначительные изменения оптической плотности в интервале 230–300 нм говорят об отсутствии в структуре белка остатков таких ароматических аминокислот, как тирозин и триптофан, а также об отсутствии или незначительном количестве фенилаланина, поскольку боковые группы данных аминокислот обладают максимумами поглощения в указанном диапазоне.

С помощью антимикробного теста методом радиальной диффузии мы определили минимальные ингибирующие концентрации данного белка. Против *E. coli* проба активна, начиная с концентрации $1,7 \pm 0,3$ мкг/мл ($0,19 \pm 0,3$ мкМ), а против *L. monocytogenes* — с $2,4 \pm 0,7$ мкг/мл ($0,27 \pm 0,8$ мкМ). Против гриба *Candida albicans* вплоть до концентрации 300 мкг/мл (33 мкМ) белок не активен.

Обсуждение результатов исследования

В данной работе впервые осуществлено выделение лизоцима и неизвестного антимикробного белка из лейкоцитов крови голубого песка. Полученные препараты охарактеризованы по ряду физико-химических и функциональных свойств.

Выделенный неизвестный белок представляет собой мажорную фракцию в экстракте из лейкоцитов песка, кроме того, он обладает мощной антимикробной активностью как против грамположительных бактерий, так и против грамотрицательных. Эти факты позволяют сделать предположение о его ведущей роли в инактивации патогенных микроорганизмов, способных вызывать различные заболевания животного.

По наличию в составе молекулы трех дисульфидных связей выделенный нами белок сходен с такими антимикробными пептидами лейкоцитарного происхождения, как дефенсины. Однако дефенсины позвоночных в отличие от рассматриваемого белка, имеют значительно меньшую молекулярную массу, в среднем 3–4 кД [1–3, 5–7].

По целому ряду признаков (молекулярная масса около 9 кД, три дисульфидные связи, отсутствие остатков триптофана и тирозина) данный белок напоминает НК-лизин свиньи. НК-лизины и гранулизины млекопитающих локализованы в гранулах лейкоцитов не миелоидного, а лимфоидного ряда (НК-клетки, цитотоксические Т-лимфоциты) и принимают участие как в инактивации микробов, так и в цитотоксическом действии по отношению к опухолевым клеткам. Данные молекулы относятся к семейству сапозино-подобных белков, для представителей которых характерна способность взаимодействовать с липидами, но лишь некоторые группы (НК-лизины, гранулизины, амебопоры) обладают антимикробной активностью [20–22]. К настоящему времени единственным примером НК-лизина, выделенного из природного источника в виде белковой молекулы, является НК-лизин свиньи [23]. Для ряда млекопитающих и представителей других классов позвоночных было показано наличие гена НК-лизина [24–27]. В лимфоцитах человека содержится гомолог НК-лизина — гранулизин, включающий, в отличие от большинства представителей семейства, только 5 остатков цистеина и содержащий две дисульфидные связи [21, 22]. Согласно информации из базы данных Uniprot (URL: <http://www.uniprot.org>) НК-лизины или гранулизины у представителей отряда хищных до сих пор описаны не были.

Фракция, соответствующая данному белку, являлась доминирующей в белковом спектре экстрактов из лейкоцитов голубого песка. Вместе с тем по результатам экспериментов, проведенных в нашей лаборатории, экстракты из лейкоцитарного

материала собаки [28] и лисицы (не опубликовано), полученного тем же методом, не содержат подобного компонента. В то же время наличие лизоцима характерно для экстрактов из лейкоцитов всех трех видов.

В дальнейшем мы планируем определить первичную структуру выделенных нами белков, что в частности, позволит проверить гипотезу о принадлежности неизвестного белка к группе НК-лизинов.

* * *

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант №09-04-01655).

Литература

1. Кокряков В. Н. Очерки о врожденном иммунитете. СПб: Наука, 2006. 261 с.
2. 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. С. 149–160.
3. Voman H. G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. Vol. 13. P. 61–92.
4. Giuliani A., Pirri G., Nicoletto S. F. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics // *CEJB.* 2007. Vol. 2. P. 1–33.
5. Guani-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Teran L. M. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease // *Clin. Immunol.* 2010. Vol. 135. P. 1–11.
6. Kenshi Y., Gallo R. L. Antimicrobial peptides in human skin disease // *Eur. J. Dermatol.* 2008. Vol. 18. P. 11–21.
7. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms // *Nature.* 2002. Vol. 415. P. 389–395.
8. Аникеева Л. В., Тютюнник Н. Н., Аниканова В. С. Роль гуморальных факторов естественной защиты при токскаридозе песцов // Труды Карельского научного центра РАН. № 3. 2009. С. 4–7.
9. Klir J. J., Heath J. E. An infrared thermographic study of surface temperature in relation to external thermal stress in three species of foxes: the red fox (*Vulpes vulpes*), arctic fox (*Alopex lagopus*), and kit fox (*Vulpes macrotis*) // *Physiol. Zool.* 1992. Vol. 65. P. 1011–1021.
10. The influence of air pollution on lysozyme activity in the polar fox (*Alopex lagopus*) / Nowakowicz-Dębek B., Saba L., Ondrašovič M., Bis-Wencel H., Róžański P., Wnuk W., Vargová M. // *Folia Veterinaria.* 2004. Vol. 48. P. 43–45.
11. Oleinik V. M. Distribution of digestive enzyme activities along intestine in blue fox, mink, ferret and rat // *Comp. Biochem. Physiol.* 1995. Vol. 112A. P. 55–58.
12. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides / Lehrer R. I., Rosenman M., Harwing S. S., Jackson R., Eisenhauer P. // *J. Immunol. Meth.* 1991. Vol. 137. P. 167–173.
13. Panyim S., Chalkley R. High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones // *Arch. Biochem. Biophys.* 1969. Vol. 130. P. 337–346.
14. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1–100 kDa // *Anal. Biochem.* 1987. Vol. 166. P. 368–379.
15. Маурер Г. Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. М.: Мир, 1971. 247 с.
16. Торчинский Ю. М. Сера в белках. М.: Наука, 1977. 123 с.
17. Kinter M., Sherman N. E. Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. New York: Wiley-Interscience, 2000. 301 p.
18. Parry R. M., Jr, Chandan R. C., Shahani K. M. A rapid and sensitive assay of muramidase // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965. Vol. 119. P. 384–386.

19. *Effect of N-terminal mutation of human lysozyme on enzymatic activity* / Tsuchiya Y., Morio-ka K., Yoshida K., Shirai J., Kokuto T., Inumaru S. // *Nucleic Acids Symposium Series*. 2007. N 51. P.465–466.
20. *Brunh H., Riekens B., Berninghausen O., Leippe M.* Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis // *Biochem. J*. 2003. Vol. 375. P. 737–744.
21. *Clayberger C., Krensky A. M.* Granulysin // *Curr. Opin. Immunol.* 2003. Vol. 15. P.560–565.
22. *Conserved structure and function in the granulysin and NK-lysin peptide family* / Linde C. M. A., Grundström S., Nordling E., Refai E., Brennan P.J., Andersson M. // *Infect. Immun.* 2005. Vol. 73. P.6332–6339.
23. *NK-lysin, a novel effector peptide of cytotoxic T and NK cells. Structure and cDNA cloning of the porcine form, induction by interleukin 2, antibacterial and antitumour activity* / Andersson M., Gunne H., Agerberth B., Boman A., Bergman T., Sillard R., Jörnvall H., Mutt V., Olsson B., Wigzell H., Dagerlind A., Boman H. G., Gudmundsson G. H. // *EMBO J*. 1995. Vol. 14. P.1615–1625.
24. *Molecular cloning and characterization of equine NK-lysin* / Davis E.G., Sang Y., Rush B., Zhang G., Blecha F. // *Veterinary Immunol. and Immunopathol.* 2005. Vol. 105. P.163–169.
25. *Characterization of Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) NK-lysin, an antimicrobial peptide* / Hirono I., Kondo H., Koyama T., Arma N. R., Hwang J. Y., Nozaki R., Midorikawa N., Aoki T. // *Fish and Shellfish Immunol.* 2007. Vol. 22. P.567–575.
26. *Wang Q., Wang Y., Xu P., Liu Z.* NK-lysin of channel catfish: Gene triplication, sequence variation, and expression analysis // *Mol. Immunol.* 2006 Vol. 43. P.1676–1686.
27. *Molecular cloning and characterization of chicken NK-lysin* / Hong Y.H., Lillehoj H.S., Dal-loul R.A., Min W., Miska K.B., Tuo W., Lee S.H., Han J.Y., Lillehoj E.P. // *Veterinary Immunol. and Immunopathol.* 2006. Vol. 110. P.339–347.
28. *Кораблева Е.С., Берлов М.Н., Андреева Ю.В., Кокряков В.Н.* Антимикробный пептид из лейкоцитов собаки: структурно-функциональные свойства // *Вестн. С.-Петербург. ун-та*. 2007. Сер. 3: Биология. Вып. 3. С. 80–88.

Статья поступила в редакцию 10 октября 2011 г.