

ЭНДОГЕННЫЕ АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ И ИХ КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ КИШЕЧНИКА

Ильяшенко М.Г.¹, Тарасова Г.Н.², Гусева А.И.¹

¹МБУЗ Клинико-диагностический центр «Здоровье»(344011, г.Ростов-на-Дону, пер. Доломановский, 70/3),

²ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития РФ» (344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29), maha-03@mail.ru

Проведено обобщение сведений о функциональном назначении эндогенных антимикробных пептидов. Эндогенные антимикробные пептиды являются важной составляющей врожденной иммунной системы, обеспечивающей защиту против патогенных возбудителей. Действие антимикробных пептидов приводит к нарушению структуры и функций цитоплазматической мембраны микроорганизмов, что ведет к их гибели. Эндогенные антимикробные пептиды представлены дефензинами, кателицидинами и гистатинами (пептидами ротовой жидкости). В статье отражены закономерности в антимикробном механизме действия семейств эндогенных пептидов. Кроме того, отражена роль эндогенных антимикробных пептидов как медиаторов воспаления, субстанций с иммуномодулирующей, цитотоксической активностью при воспалительных заболеваниях кишечника. Эндогенные антимикробные пептиды рассматриваются как потенциальные лекарства нового поколения, которые можно будет использовать как антимикробные средства, модуляторы воспаления.

Ключевые слова: антимикробные пептиды, иммунитет, дефензины, кателицидины, кальпротектин.

ENDOGENOUS ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND THEIR CLINICAL AND PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

Plyashenko M.G.¹, Tarasova G.N.², Guseva A.I.¹

¹Clinic-diagnostic center "Health", Rostov-on-Don., Russia (344011, Rostov-on-Don, str. Dolomanovsky, 70/3)

²The Rostov state medical university, Rostov-on-Don, Russia (344718, Rostov-on-Don, str. Nakhichevan, 29) maha-03@mail.ru

A synthesis of functional assignment of endogenous antimicrobial peptides. Endogenous antimicrobial peptides are an important component of the innate immune system that protects against pathogens. Effect of antimicrobial peptide violates the structure and function of the cytoplasmic membrane of microorganisms, which leads to their death. Endogenous antimicrobial peptides are defensins, cathelicidins and histatins (peptides oral liquid). The article reflected patterns in antimicrob mechanism of action site of endogenous peptides. In addition, reflect the role of endogenous antimicrobial peptides as mediators of inflammation, immunomodulating substances, cytotoxic activity in inflammatory diseases of the intestine. Endogenous antimicrobial peptides are seen as potential next-generation drugs that could be used as antimicrobials, modulators of inflammation and cancer therapy.

Keywords: antimicrobial peptides, immune system, defensins, cathelicidins, calprotectin.

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) носят упорный рецидивирующий хронический характер с чередованием эпизодов обострений и периодов ремиссии, что объясняет постоянный интерес исследователей к изучению патогенетических механизмов трансформации клинического благополучия в обострение симптоматики заболевания. Местные и системные воспалительные реакции стенки кишки провоцируются рядом факторов, в том числе продуктами бактериальной жизнедеятельности. Контакт с патогенными бактериями активизирует «врожденную кишечную защиту» путем экспрессии провоспалительных генов и секреции цитокинов ихемокинов. Сохранность слизистой

оболочки, наличие обострения или ремиссии ВЗК зависят от установления паритета между патогенными факторами и компонентами системы защиты. Эндогенные антимикробные пептиды (АМП) относятся к неспецифическим факторам гуморальной врожденной иммунной системы и обеспечивают защиту против широкого спектра бактерий, грибов и оболочечных вирусов [1]. Секреция АМП клетками кишечной стенки направлена на активацию врожденных иммунных механизмов, однако их значимость для течения ВЗК неясна, что обеспечивает актуальность работ в этом направлении.

Установлено, что АМП представляют собой небольшие молекулы, построенные из нескольких десятков аминокислот [6]. Из-за небольшого размера они действуют путем нарушения структуры или функции клеточной мембраны микроорганизмов благодаря хемотаксической и опсонизирующей активности, способности дегранулировать тучные клетки, а также опосредованно участвуют в регуляции защитно-приспособительных реакций организма при инфекции, стрессе и воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды, проявляя антиэндотоксиновую и иммунопротективную активности. Это отличает эндогенные пептиды от эндогенных белков, содержащих более 100 аминокислот, которые представляют собой литические ферменты, а также белки, связывающие питательные вещества и направленные против специфических микробных макромолекул. В настоящее время дана характеристика около сотни АМП, которые выявляются в барьерных эпителиальных тканях, фагоцитирующих клетках и биологических жидкостях человека [3].

Известно, что некоторые АМП синтезируются постоянно, синтез других индуцируется в ответ на инфекцию или воспаление. В настоящее время выявлены определенные закономерности в механизме действия эндогенных пептидов. Доказано, что большинство таких пептидов взаимодействуют с двойным липидным слоем мембраны бактерий. АМП несут на себе положительный заряд, а на поверхности липидного бислоя бактериальной мембраны – заряд отрицательный. Ввиду электростатического взаимодействия происходит образование комплекса положительно заряженных пептидов и отрицательно заряженной оболочки бактерий. Электростатическое притяжение между пептидами и бактериями усиливает такое свойство пептидов, как амфифильность. Это означает, что заряженные и незаряженные группы аминокислот расположены по разные стороны молекулы, то есть заряд распределен не равномерно, а сконцентрирован на одном участке пептида для облегчения взаимодействия с клеточной мембраной бактерий. Пространственная трансформация эндогенных пептидов играет не последнюю роль в обеспечении взаимодействия пептидов и микробов. Молекулы большинства известных АМП при попадании в окружение липидов клеточной мембраны превращаются из

неупорядоченных линейных в правосторонние спиральные. Видимо, спиральная структура необходима для того, чтобы пронизывать мембрану микробной клетки [3].

Следующим этапом механизма действия пептидов на микробные клетки является проникновение пептида через мембрану. Для отображения этого процесса были предложены несколько моделей. Наиболее популярной является так называемая "порообразующая" модель, согласно которой пептиды при взаимодействии с липидным бислоем встраиваются в мембрану, пронизывая ее насквозь, причем структура поры может быть различной. Иногда молекулы пептидов встраиваются перпендикулярно плоскости мембраны, плотно прилегая друг к другу и образуя цилиндрическую бочку. Поэтому такой способ разрушения мембраны и называется "бочковым". В некоторых случаях стенки поры состоят как из пептидных, так и из липидных молекул. Тогда пора имеет форму тора ("тороидальный" механизм). Когда поры изрешечивают всю мембрану, она теряет устойчивость, и содержимое микробной клетки выходит наружу, в результате чего болезнетворная бактерия погибает. Другая модель называется "ковровой", в соответствии с которой положительно заряженные молекулы пептидов как бы выстилают отрицательно заряженную мембрану бактерии, образуя молекулярный "ковер". Когда вся поверхность бактерии занята пептидами, ее мембрана разрывается на фрагменты [5].

На сегодняшний день у человека обнаружено три семейства эндогенных АМП – дефензины, кателицидины и гистатины (пептиды ротовой жидкости).

Дефензины – это катионные амфипатические пептиды длиной 30–42 аминокислот и трехнитевой β -пластинчатой структурой, содержащей три дисульфидные связи [17]. На основе способа дисульфидного связывания дефензины разделяют на три семейства – α -, β - и реже встречающиеся θ -дефензины. В организме человека присутствуют два вида – α - и β -дефензины. У человека идентифицировано шесть α -дефензинов. Основным депо четырех α -дефензинов в организме являются нейтрофилы, поэтому им присвоена аббревиатура HNP (humaneutrophilspeptides) и каждому – порядковые номера. Нейтрофильные α -дефензины участвуют в кислороднезависимом уничтожении фагоцитированных микробов. Два других представителя семейства α -дефензинов (HD) экспрессируются кишечными клетками Пейера, а также некоторыми эпителиальными клетками в нормальной (невоспаленной) двенадцатиперстной кишке. Экспрессия α -дефензина HD-5 усиливается при любом воспалении кишки, а HD-6 – только при инфекционных ВЗК [21].

β -дефензины производятся в эпителии слизистых во всех отделах ЖКТ, поджелудочной и слюнных железах, коже и в некоторых лейкоцитах. Также, возможно,

что некоторые пробиотические бактерии продуцируют β -дефензины. Бета-дефензин 1 (hBD - 1) в организме человека экспрессируется конститутивно, в то время как бета-дефензин 2 (hBD-2) и 3 (hBD-3) являются индуцибельными пептидами в ответ на действие провоспалительных цитокинов, микроорганизмов (например, *Escherichiacoli*, *Helicobacterpylori* или *Pseudomonasaeruginosa*). Θ -дефензины – это циклические пептиды с высокой анти-ВИЧ активностью, которые не синтезируются у человека и пока были выявлены только у обезьян [20]. В норме в плазме обнаруживается очень низкий уровень дефензинов (от неопределяемых величин до 50–100 нг/мл), однако, в условиях сепсиса, например, содержание дефензинов может возрасти до 10 мг/мл и выше [17].

В кишечнике дефензины контролируют процессы прикрепления и проникновения микробов. β -дефензины соединяются с дендритными кишечными клетками, которые экспрессируют хемокиновый рецептор и регулируют их хемотаксис к микробам наряду с Т-лимфоцитами. Таким образом, дефензины принимают участие в адаптивной фазе иммунного ответа. Кроме того, они стимулируют продукцию интерлейкина-8 и хемотаксис нейтрофилов, вызывая дегрануляцию тучных клеток. Дефензины тормозят фибринолиз, который способствует распространению инфекции. β -дефензин hBD-1 представляет собой основную защиту кишечного эпителия, предупреждая адгезию микроорганизмов в отсутствие воспаления. Экспрессия hBD-2 является реакцией только на воспалительные и инфекционные стимулы [13].

Дефицит β -дефензина-2 наблюдается в слизистой кишечника у пациентов с болезнью Крона. Система дефензинов у таких больных неполноценна и не ограничивает инвазивный бактериальный рост, приводящий к типичным для болезни Крона инфекциям. Повышенный уровень бета-дефензинов наблюдается у пациентов с язвенным колитом [17].

Недавно была открыта антивирусная активность некоторых дефензинов [21]. Считается, что альфа-дефензины вносят серьезный вклад в антиВИЧ-1 активность антивирусного фактора CD8. Это обстоятельство открывает новые возможности в исследовании ВИЧ. Показано, что пациенты у которых отсутствуют α -дефензины (синдромом недостаточности специфических гранул) страдают частыми и тяжелыми бактериальными инфекциями [13].

Кателицидины – это катионные амфипатические пептиды разнообразной линейной, α -спиральной или β -шпилькообразной структуры в пероксидаза-отрицательных гранулах нейтрофилов. Появляются кателицидины как результат протеолиза С-конца предшественника белка, содержащего кателиновый домен [9]. У человека имеется только один предшественник кателицидинов, hCAP18, который производится, в основном, в

лейкоцитах и эпителиальных клетках. Он расщепляется с образованием пептида LL-37 и целого набора более коротких пептидов с измененными свойствами [3]. Помимо нейтрофилов hCAP18 выявлен в лимфоцитах и моноцитах, в сквамозном эпителии (рта, языка, пищевода, шейки матки и вагины), эпителии легочной ткани, кератиноцитах при воспалительных заболеваниях и эпидидимите. Антибактериальный С-концевой фрагмент hCAP18 – LL37 (37 аминокислот) проявляет антимикробную активность как против грамотрицательных, так и против грамположительных бактерий, грибов, некоторых вирусов и простейших. Этот пептид оказывает синергический антибактериальный эффект с дефензинами. LL37 может связывать липополисахарид и нейтрализовать его способность индуцировать эндотоксический шок. LL37 является важным фактором реэпителизации ран, также была показана его ангиогенная активность *in vivo* и *in vitro*. Более того, LL37 функционирует в качестве хемотаксического агента для нейтрофилов, моноцитов и Т-клеток [16]. У человека кателицидин LL-37/hCAP-18 обнаружен в верхней части крипт толстой кишки. Усиление его экспрессии наблюдается при кишечных инфекциях, он обладает бактерицидным действием [1].

Кальпротектин относится к эндогенным АМП и представляет собой цитозольный нейтрофильный кальций-связывающий белок S100, характеризуется низким молекулярным весом (36 кДа). Кальпротектин высвобождается из нейтрофилов и тканевых макрофагов во время их активации или гибели и вовлекается в активный воспалительный процесс. Кроме того, он обнаруживается в моноцитах и в илеальных эозинофилах. Кальпротектин был впервые обнаружен в 1980 году М. К. Fagerhol с соавторами, которые первоначально назвали его "белок L1". Кальпротектин составляет до 60 % от внутриклеточной жидкости в нейтрофилах, ответственных за первичную иммунную реакцию лейкоцитов, а также обладает противомикробными, фунгицидными и антипролиферативными свойствами [10].

При иммунном ответе на воспалительный процесс в кишечнике с участием нейтрофилов, кальпротектин высвобождается и затем выводится с калом в концентрации в 6 раз выше, чем в крови [2]. Кальпротектин является стабильным химическим веществом и медленно разлагается протеазами микроорганизмов. В результате прямое обнаружение кальпротектина в кале проясняет степень воспалительного иммунного ответа в различных регионах ЖКТ. У здоровых людей «нормальные» уровни кальпротектина в стуле ≤ 50 мг/г [7]. Следует отметить, что у детей в возрасте до одного года уровни кальпротектина в кале приблизительно в 10 раз выше, чем пациентов старшего возраста [2,4]. Умеренно повышенные значения кальпротектина отмечаются при поражении слизистой (целиакии, лактозной недостаточности, аутоиммунном гастрите),

значительно повышенные концентрации отмечаются при ВЗК, бактериальных инфекциях ЖКТ, дивертикулитах и онкологических заболеваниях, постоянном приеме нестероидных противовоспалительных средств [8].

А.С.V. Roon было отмечено, что при диагностике ВЗК для предельного уровня кальпротектина 50 мг/г чувствительность составляет 89 %, а специфичность 81 %, но эти значения увеличиваются до 98 % и 91 %, соответственно, при уровне в 100 мг/г [15]. В этом же исследовании А.С.V. Roon установлено, что уровень кальпротектина выше 150 мг/г указывает на наличие ВЗК, отвергает синдром раздраженного кишечника (СРК) с чувствительностью 100 % и специфичностью 97 % [15]. Этот результат позволяет исключать ВЗК и сосредоточиться на неинвазивных методах лечения патологии.

Кальпротектин дает возможность мониторировать течение болезни Крона и язвенного колита, являясь хорошим предиктором рецидива у пациентов с ВЗК [12]. Преимуществом исследования фекального кальпротектина при болезни Крона является то, что повышенные концентрации могут отражать сегментарные поражения тонкой кишки, которая труднодоступна для эндоскопического и гистологического исследования. Сохраняющиеся повышенные уровни фекального кальпротектина могут указывать на неэффективность терапии, кроме того, повышение содержания кальпротектина отмечается при ситуациях, предшествующих обострению заболевания [18]. В современных рандомизированных клинических исследованиях (РКИ) было установлено, что концентрация фекального кальпротектина коррелирует с гистологической и эндоскопической активностью заболевания [12], распространенностью поражения кишечника при болезни Крона [4]. В то же время корреляция с клиническими индексами активности (например, CDAI) менее выражена, что может объясняться большой субъективностью последних [19]. В другом РКИ у пациентов с болезнью Крона установлена тесная взаимосвязь между концентрацией кальпротектина в кале и активностью заболевания по данным эндоскопического исследования (SES-CD > 7 баллов) [14]. При этом не отмечено значимых корреляций между показателями CDAI, SES-CD и концентрацией кальпротектина в кале. Таким образом, было сделано заключение, что концентрация биомаркера в кале коррелирует с эндоскопической, но не с клинической активностью болезни Крона [14].

Новые антимикробные вещества могут стать альтернативой антибиотикам при лечении ВЗК, к большинству которых бактерии приобрели устойчивость. АМП, хотя несколько уступают антибиотикам по эффективности, действуют намного быстрее и, что самое главное, уничтожают бактерии, устойчивые к известным антибиотикам [16]. Однако применять в клинике в качестве антибиотиков и антигрибковых средств можно только те

пептиды, которые не разрушают клетки млекопитающих. К сожалению, большинство природных пептидов наряду с антимикробным обладают некоторым гемолитическим действием, разрушая человеческие эритроциты [11]. В этом плане могут помочь искусственные аналоги природных соединений, обладающих антибактериальной, но не имеющих гемолитической активности. Однако до выяснения всех тонкостей механизма действия пептидов, искусственные аналоги в терапевтической практике применяться не могут.

Таким образом, основные пути антимикробного действия эндогенных пептидов открывают широкие терапевтические и диагностические перспективы при ВЗК, изучение которых является актуальной задачей в медицине.

Список литературы

1. Алешина Г. М., Кокряков В. Н., Шамова О. В., Орлов Д. С. и др. Современная концепция об антимикробных пептидах как молекулярных факторах иммунитета // Медицинский академический журнал. – 2010. – № 4. – С.149-160.
2. Баранов А. А., Потапов А. С., Цимбалова Е. Г. Современные технологии диагностики и лечения воспалительных заболеваний кишечника у детей // Вестник Российской Академии медицинских наук. – 2011. – №6. – С. 36-41.
3. Будихина А. С., Пинегин Б. В. Дефензины – мультифункциональные катионные пептиды человека // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – №2. – С.31-40.
4. Кучеренко А. Г., Потапов А. С., Цимбалова Е. Г., Татьяна О. Ф. и др. Возможности кальпротектина в диагностике воспалительных заболеваний кишечника у детей // Вопросы диагностики в педиатрии. – 2009. – №1. – С.42-48.
5. Полин А. Н., Орлова Т. И., Булгакова В. Г. Биологически активные нерибосомальные пептиды // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. – №3. – С.57-68.
6. Пурьгин П. П., Буряк А. К., Срибная О. С. Изучение пептидного состава антибактериально активных фракций методами жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии // Биомедицинская химия. – 2010. – №3. – С.387-396.
7. Татьяна О. Ф., Потапов А. С., Намазова Л. С., Кучеренко А. Г. и др. Новые возможности неинвазивной диагностики воспалительных заболеваний кишечника у детей // Педиатрическая фармакология. – 2008. – Т. 5, № 3. – С. 20-25.
8. Щукина О. Б. Что изменилось в лечении болезни Крона за 6 лет? // Клиническая фармакология и терапия. – 2011. – №1. – С.16-17.

9. Desai D., Faubion W. A., Sandborn W. J. Review Article: Biological Activity Markers in Inflammatory Bowel Disease // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2007. – Vol.25. – P.247-255.
10. El-Badry A., Sedrak H., Rashed L. Faecal Calprotectin in Differentiating between Functional and Organic Bowel Diseases // *Arab Journal of Gastroenterology.* – 2010. – Vol.11. – P.70-73.
11. Hamill P. Novel anti-infectives: is host defence the answer? // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2008. – Vol.19. – P.628-636.
12. Jennifer Jones J., Loftus Jr. E. V., Panaccione R., Li-Sheng Chen et al. Связь между активностью болезни и сывороточными и фекальными биомаркерами болезни Крона // *Клиническая гастроэнтерология и гепатология. Русское издание.* – 2009. – Т.2, №6. – С.457-464.
13. Keohane J. Irritable Bowel Syndrome–Type Symptoms in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Real Association or Reflection of Occult Inflammation // *The American Journal of Gastroenterology.* – 2010. – Vol.78. – P.98-105.
14. Rheenen P.V., Van-De-Vijve E., Fidler V. Faecal Calprotectin for Screening of Patients with Suspected Inflammatory Bowel Disease: Diagnostic Meta-Analysis // *BMJ.* – 2010. Vol. 341. – P.567-569.
15. Roon A.C.V. Diagnostic Precision of Fecal Calprotectin for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Malignancy // *Am. J. Gastroenterol.* – 2007. – Vol.102. – P. 803-813.
16. Spellberg B. The epidemic of antibiotic resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America // *Clin. Infect. Dis.* – 2008. Vol.46. – P.155-164.
17. Sumako Yoshioka , Hiroshi Mukae , Hiroshi Ishii Alpha-defensin enhances expression of HSP47 and collagen-1 in human lung fibroblasts // *Life Sci.* – 2007. – Vol.20. – P.1736-7817.
18. Tibble J. A., Sigthorsson G., Bridger S. et al., Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease // *Gastroenterology.* – 2000. – Vol.119. – P.15–22.
19. Van Rheine P.F., Van de Vijver E., Fidler V. Fecal Calprotectin a Sign of Inflammatory Bowel Disease // *BMJ.* — 2010. Vol.341. — P.3359.
20. Vucelic B. Inflammatory Bowel Diseases: Controversies in the Use of Diagnostic Procedures // *Dig Dis.* – 2009. – Vol.27. – P. 269-277.
21. Yanagi S., Ashitani J., Imai K. Significance of human b-defensins in the epithelial lining fluid of patients with chronic lower respiratory tract infections // *Clin Microbiol Infect.* – 2007. – Vol.13. – P. 63-69.

Рецензенты:

Абоян И. А., д.м.н., профессор, главный врач МБУЗ Клинико-диагностический центр «Здоровье», г. Ростов-на-Дону.

Яковлев А. А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой гастроэнтерологии и эндоскопии с курсом клинической фармакологии ФПК ППС ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону.