

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования

«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

*На правах рукописи*

**ГУРЬЯНОВА СВЕТЛАНА ВЛАДИМИРОВНА**

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА  
БИОРЕГУЛЯТОРАМИ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

3.2.7. Иммунология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени доктора биологических наук

**Научный консультант:**

***Колесникова Наталья Владиславовна***

доктор биологических наук, профессор

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	15
1.1 Развитие механизмов врожденного иммунитета.....	15
1.1.1 Nod -подобные рецепторы .....	16
1.1.2 Toll -подобные рецепторы .....	20
1.1.3 RIG-I-подобные рецепторы .....	25
1.1.4 Рецепторы лектина С-типа .....	27
1.1.5 Клеточные факторы врожденного иммунитета .....	30
1.1.6 Белки эпителия.....	31
1.1.7 Антимикробные пептиды .....	32
1.1.7.1. Антимикробная активность антимикробных пептидов.....	38
1.1.7.2 Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов	42
1.1.7.3 Влияние антимикробных пептидов на гуморальный иммунитет.....	44
1.1.7.3.1 Адьювантная активность антимикробных пептидов .....	44
1.1.7.3.2 Влияние антимикробных пептидов на продукцию цитокинов и хемокинов .....	46
1.1.7.3.3 Действие антимикробных пептидов на систему комплемента	48
1.1.7.4 Влияние антимикробных пептидов на иммунокомпетентные клетки .....	49
1.1.7.5 Аллергенные свойства антимикробных пептидов .....	57
1.2 Биорегуляторы бактериального происхождения.....	64
1.3 Клиническая эффективность биорегуляторов бактериального происхождения .....	70
1.3.1 Лекарственные средства на основе мурамилпептидов .....	70
1.3.1.1 Источники мурамилпептидов в организме человека.....	70
1.3.1.2 Влияние мурамилпептидов на микроорганизмы .....	72
1.3.1.3 Структура мурамилпептидов и лекарственные средства на их	

основе.....	75
1.3.1.4 Моносахаридсодержащие мурамилпептиды .....	78
1.3.1.5 Дисахаридсодержащие мурамилпептиды .....	84
1.3.2 Лекарственные средства на основе липополисахаридов.....	98
1.4 Биорегуляторы бактериального происхождения на основе антимикробных пептидов .....	101
1.4.1 Источники, организация генов и биосинтез бактериоцинов .....	103
1.4.2 Механизм действия на микроорганизмы .....	105
1.4.3 Биодоступность и безопасность бактериоцинов .....	108
1.4.4 Иммуномодулирующая активность бактериоцинов .....	112
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	124
2.1 Дизайн исследования с использованием лабораторных животных	126
2.1.1 Экспериментальная модель аллергического воспаления .....	126
2.1.1.1 Получение бронхоальвеолярного лаважа.....	128
2.1.1.2 Получение сыворотки крови в модели астмы .....	128
2.1.1.3 Получение образцов легких .....	128
2.1.1.4 Количественный и качественный анализ клеток в бронхоальвеолярном лаваже.....	128
2.1.1.5 Анализ содержания иммуноглобулинов .....	128
2.1.1.6 Гистологические исследования легких животных.....	129
2.1.1.7 Выделение крови животных для ПЦР анализа .....	129
2.1.2 Исследование влияния биорегуляторов бактериального происхождения на экспрессию генов TNF- $\alpha$ , рецепторов TLR4 и NOD2, регуляторных факторов A20 и ATF3.....	129
2.1.2.1 Выделение РНК и реакция обратной транскрипции .....	130
2.1.2.2 Исследование экспрессии генов.....	130
2.2 Дизайн исследований с использованием биоматериалов человека	131
2.2.1 Выделение моноклеарных клеток человека и подготовка их к культивированию .....	133

2.2.2 Определение цитокинов в мононуклеарных клетках человека .....	133
2.2.3 Выделение НК-клеток из мононуклеарных клеток человека методом магнитной сепарации .....	133
2.2.4 Оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на НК- клетки .....	134
2.2.5 Регистрация выделения оксида азота под действием мурамилпептидов и липополисахарида .....	136
2.2.6 Фенотипирование дендритных клеток человека .....	136
2.2.7 Исследование влияния адреналина и норадреналина на изменение фенотипа дендритных клеток .....	137
2.2.8 Характеристика пациентов с псориазом .....	137
2.2.9 Определение цитокиновых биомаркеров в сыворотке крови пациентов с псориазом .....	139
2.2.10 Характеристика пациентов, принимавших участие в исследовании ротовой жидкости .....	139
2.2.11 Лабораторные исследования ротовой жидкости .....	140
2.2.12 Выделение ДНК, РНК и реакция обратной транскрипции .....	141
2.2.13 Оценка эффективности глюкозаминилмурамилдипептида в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период .....	141
2.3 Статистическая обработка результатов .....	142
ГЛАВА 3 Исследование иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения в экспериментальной модели аллергического воспаления .....	143
ГЛАВА 4 Исследование клинико-иммунологической эффективности глюкозаминилмурамилдипептида при вирусных и бактериальных инфекциях .....	149
4.1 Оценка эффективности глюкозаминилмурамилдипептида в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный	

эпидемиологический период .....	149
4.2 Исследование эффектов глюкозаминилмурамилдипептида на локальный иммунитет у пациентов с кариесом .....	151
4.3 Исследование модулирующих эффектов глюкозаминилмурамилдипептида в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе.....	152
4.4 Клинико-иммунологическая эффективность глюкозаминилмурамилдипептида при псориазе .....	155
ГЛАВА 5 Исследование механизмов иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения .....	162
5.1 Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на экспрессию генов регуляторных факторов на уровне сигнальных путей .	162
5.2 Влияние глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на внутриклеточные сигнальные пути НК-клеток <i>in vitro</i> .....	168
5.3 Роль мурамилпептидов и липополисахарида в регуляции экспрессии оксида азота .....	173
5. 4 Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов .....	174
5.4.1 Влияние дисахаридсодержащих мурамилпептидов на продукцию цитокинов .....	174
5.4.2 Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и бактериоцина низина на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.....	177
5.5 Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида, катехоламинов и низина на фенотипические изменения дендритных клеток человека в системе <i>in vivo</i> и <i>ex vivo</i> .....	180

5.6 Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и катехоламинов на нейтрофильные гранулоциты человека .....	186
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	195
ВЫВОДЫ.....	209
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	212
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	213
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	216

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Появление и распространение инфекционных и аллергических заболеваний представляют угрозу современному здравоохранению. Вакцинация и антибиотики позволили победить неизлечимые ранее инфекции, но оказались не способны предотвратить новые, не известные ранее инфекции и антибиотикорезистентность уже известных бактерий [677]. За последние десятилетия возросло количество аллергических заболеваний, около 40 % населения в настоящее время страдают аллергическим ринитом, астмой или атопическим дерматитом [639, 678].

Обеспечение неспецифической резистентности было провозглашено ВОЗ генеральной стратегией сохранения здоровья, которая стимулировала исследования в области врожденного иммунитета [682].

Врожденный иммунитет многоклеточного организма распознает микроорганизмы с помощью поверхностных и внутриклеточных рецепторов нескольких семейств (TLR, NLR, RLR, CLR и др.). Гомологичные гены (ортологи) рецепторов врожденного иммунитета появились у первых многоклеточных более 600 миллионов лет назад и сохранились до наших дней у низших морских беспозвоночных. Консервативность химической структуры ортологов рецепторов врожденного иммунитета говорит об их эффективности, универсальности и требует тщательного исследования.

Известно, что человек и микроорганизмы, населяющие его кожные слизистые покровы, в течение многих миллионов лет коэволюции выработали способы поддержания взаимного сосуществования. Комменсальные микроорганизмы снабжают человека короткоцепочечными жирными кислотами, витаминами, перерабатывают клетчатку, синтезируют вещества, защищающие от патогенов. Сформировалась концепция «метаорганизма» - сообщества микрофлоры и человека; определено влияние микроорганизмов на работу всех

систем и органов человека [42, 43, 100, 312]. В частности, в процессе роста и деления бактерии постоянно ремоделируют свою клеточную стенку - с помощью ферментов локально разрушают её. При этом компоненты клеточных стенок и мембран бактерий – мурамилпептиды (МП), липополисахариды (ЛПС) – могут использоваться бактериями вторично, но частично попадают во внешнюю среду. Производное от МП - глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) образуется также при воздействии гидролаз микроорганизмов и хозяина, например, лизоцима на пептидогликан бактерий [672]. Образующиеся фрагменты клеточных стенок комменсальных бактерий взаимодействуют с рецепторами врожденного иммунитета хозяина и запускают многочисленные сигнальные пути, поддерживают сбалансированные иммунные реакции.

Если фрагменты бактериальных клеточных стенок воздействуют через специфические рецепторы врожденного иммунитета, то бактериоцины – антимикробные пептиды, производимые бактериями, – не имеют специфических рецепторов и взаимодействуют с клетками хозяина за счет электростатического взаимодействия и их амфифильности. За последние несколько лет обнаружено несколько сотен бактериальных антимикробных пептидов, которые считаются базой для создания новых эффективных антимикробных лекарственных средств [135].

Диссертация является актуальным исследованием, связанным с теоретическим обоснованием и практической разработкой одной из нерешенных проблем современной иммунологии – определением механизмов регуляции воспалительных процессов. Диссертационная работа посвящена определению иммунологических и молекулярно-биологических факторов в регуляции иммунного гомеостаза биорегуляторами бактериального происхождения для профилактики, терапии и реабилитации аллергических и инфекционных заболеваний. Понимание сформировавшихся системных взаимосвязей между микроорганизмами и макроорганизмом на уровне слизистых, иммунокомпетентных клеток, а также органов и тканей имеет как фундаментальное (для выявления способов реагирования с целью поддержания

гомеостаза), так и прикладное (для разработки способов профилактики и терапии социально значимых заболеваний) значение для решения проблемы контроля воспаления.

В связи с этим сегодня сохраняет актуальность комплексное изучение микробиома, генома, транскриптома, метаболома здоровых доноров и пациентов с различными заболеваниями и выявление особенностей влияния биорегуляторов бактериального происхождения (ББП) на иммунный гомеостаз, чему и посвящено данное исследование.

**Цель исследования:** определить механизмы регуляции иммунной системы биорегуляторами бактериального происхождения (липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептид, низин) в норме и в патогенезе воспалительных заболеваний.

**Задачи исследования:**

1. Исследовать иммуностропные эффекты биорегуляторов бактериального происхождения (липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида) в экспериментальной модели аллергического воспаления.

2. Проанализировать профилактическую и клинико-иммунологическую эффективность глюкозаминилмурамилдипептида при вирусных и бактериальных инфекциях.

3. Оценить модулирующие эффекты глюкозаминилмурамилдипептида в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе.

4. Исследовать иммуностропные эффекты биорегулятора бактериального происхождения глюкозаминилмурамилдипептида при аутоиммунном воспалительном процессе.

5. Определить влияние глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида на экспрессию генов *TLR4* и *NOD2* рецепторов, транскрипционных факторов (*A20*, *ATF3*) и провоспалительного цитокина *TNF- $\alpha$*  в клетках врожденного иммунитета.

6. Исследовать влияние глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на экспрессию генов цитокинов, мембранных рецепторов и адаптерных белков,

регулирующих клеточный метаболизм в NK-клетках в условиях *in vitro*.

7. Выявить роли мурамилпептидов и липополисахарида в регуляции экспрессии оксида азота макрофагами линии RAW264.7 в системе *in vitro*, а также в продукции цитокинов, хемокинов и ростовых факторов *ex vivo*.

8. Проанализировать влияние биорегуляторов бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептида, липополисахарида и низина), катехоламинов на фенотипические изменения дендритных клеток и продукцию альфа-дефенсинов HNP1-3 нейтрофильных гранулоцитов.

**Методология и методы исследования.** Методологической основой работы стал комплексный анализ провоспалительных и противовоспалительных факторов при воздействии биорегуляторов бактериального происхождения в исследованиях *in vivo*, в том числе на моделях лабораторных животных, *ex vivo* и *in vitro*. Для достижения цели исследования и решения поставленных задач на основе теоретического анализа литературы был выбран дизайн в форме проспективного и экспериментального исследования с использованием современных иммунологических, биохимических, гистологических, молекулярно-генетических, а также методов молекулярной и клеточной биологии, биоинформатики и системной биологии. Исследование одобрено Этическим комитетом медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) (г. Москва, Россия).

**Степень достоверности, апробация результатов, личное участие автора.** Степень достоверности результатов основана на достаточном числе наблюдений, использовании современных методов исследования, адекватной статистической обработке полученных данных.

Статистический анализ данных осуществляли с использованием прикладных программ GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) и Microsoft Office Excel 2010.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на конгрессах и конференциях различного уровня: Конгресс Европейской академии аллергии и клинической иммунологии (ЕААСИ) в 2018 - 2023 гг.; «Биотехнологии: состояние и

перспективы развития» (Москва, 2022), «Иммунология – основа медицины XXI века» (Ташкент, Самарканд, Узбекистан, 2021), IX-XII конференции «Ресурсы конкурентоспособности спортсменов: теория и практика реализации» (Краснодар, 2019-2022), «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (2018), Конференция Американской академии аллергии, астмы и иммунологии (США, 2019), 5th European Congress of Immunology (Amsterdam, Netherlands, 2018), 17th Congress of Immunology (Beijing, China, 2019), 1st Moscow Molecular Allergology Meeting; 1-й Калининградский научный иммунологический форум (2016), SBV Improver System Biology Verification Conference (Barcelona, Spain, 2015), 3d Biological Network Verification (Montreux, Switzerland, 2014).

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах выполнения диссертационного исследования: формирование основной идеи, формулировка рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, дизайн исследования, тщательный анализ современной зарубежной и отечественной литературы по изучаемой проблеме, проведение всех экспериментальных методов исследования, подготовка публикаций по теме выполненной работы, оформление текста диссертации и автореферата.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Биорегуляторы бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептид и липополисахарид) оказывают иммуотропные эффекты при аллергическом, инфекционном и аутоиммунном воспалительном процессе.

2. Глюкозаминилмурамилдипептид модулирует микробный пейзаж и увеличивает разнообразие представителей микробиологического сообщества слизистых полости рта в норме и при кариесе.

3. Механизмы иммуотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения, исследованные в системе *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro*, обусловлены их влиянием на фенотип и экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета, цитокинов, хемокинов, молекул адгезии, а также регуляторных факторов внутриклеточных сигнальных путей клеток врожденного иммунитета.

**Научная новизна.** На модели аллергического воспаления впервые показано, что продолжительное воздействие низких доз биорегуляторов бактериального происхождения (глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида) до воздействия аллергена (овальбумина - OVA) проявляет защитный эффект, а совместное воздействие аллергена с липополисахаридом или мурамилпептидом увеличивает степень тяжести аллергического воспаления.

Впервые показана возможность смещения баланса субпопуляций дендритных клеток с помощью липополисахарида, мурамилпептида и норадреналина и охарактеризованы фенотипические изменения дендритных клеток под действием липополисахарида и мурамилпептида, а также бактериоцина низина.

Впервые обнаружено влияние глюкозаминилмурамилдипептида на увеличение разнообразия представителей микробиологического сообщества слизистых полости рта в норме и при кариесе.

Впервые определен механизм эффективности глюкозаминилмурамилдипептида для профилактики обострений псориаза.

Впервые установлено, что механизм действия глюкозаминилмурамилдипептида в предотвращении тяжелого течения острого респираторного заболевания заключается в увеличении функциональной активности эффекторных клеток врожденного иммунитета.

Впервые обнаружена способность норадреналина уменьшать индуцированный липополисахаридом или мурамилпептидом повышенный уровень нейтрофильных пептидов человека.

Впервые предложен комплексный подход к контролю иммунного гомеостаза биорегуляторами бактериального происхождения посредством модулирования интенсивности экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета *TLR4* и *NOD2* с отложенной по времени негативной регуляцией на основе увеличения экспрессии генов *A20* и *ATF3*, продукты которых ограничивают воспаление.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** В результате проведенных иммунологических, молекулярно-генетических, гистологических, биохимических и микробиологических исследований получены новые знания о

механизмах врожденного и адаптивного иммунитета, ответственных за усиление и подавление воспалительного ответа, о способности биорегуляторов бактериального происхождения влиять на иммунный гомеостаз в норме и при патологии.

Важное фундаментальное значение работы заключается в описании и обосновании механизмов биологической активности ББП, определении механизма отрицательной обратной связи в воспалительном процессе, при котором на начальном этапе последовательно активируются транскрипционные факторы, индуцирующие воспаление, а на последующих этапах запускаются транскрипционные факторы, инициирующие каскады реакций, приводящих в норме к ограничению воспаления.

Таким образом, научно-практической ценностью работы является то, что показана способность липополисахарида, МП и норадреналина изменять фенотипические характеристики дендритных клеток и естественных киллеров, теоретически обоснована эффективность ББП в коррекции иммунопатологических состояний. Применение МП способствует повышению разнообразия представителей микробиологического сообщества в ротовой полости, а также коррекции уровня sIgA и дефенсинов НМР 1-3. Предложено объяснение механизма увеличения длительности ремиссии в случае применения ГМДП при псориазе с различной степенью тяжести.

Предложена гипотеза о возможности контроля биорегуляторами бактериального происхождения характера и интенсивности воспалительного процесса. Характер влияния ББП зависит от концентраций и длительности применения, при этом изменяется состав субпопуляций иммунокомпетентных клеток, хемокинов, ростовых факторов и цитокинов, а также экспрессия генов рецепторов врожденного иммунитета и транскрипционных факторов, участвующих в ослаблении воспалительного реагирования. Полученные знания позволили существенно приблизиться к пониманию и обоснованию механизма ряда биологических эффектов мурамилпептидов, липополисахарида и низина, в том числе противовоспалительного, что может послужить фундаментальной основой разработки способов контроля воспаления и иммунопрофилактики.

**Внедрение результатов исследования в практику.** Результаты исследования используются в учебном процессе кафедры биологии и общей генетики при подготовке студентов медико-биологических специальностей по предмету «биология» Медицинского института РУДН, кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС и Центральной научно-исследовательской лаборатории (ЦНИЛ) ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, а также внедрены в научно-исследовательскую деятельность кафедры биологии и общей генетики Медицинского института РУДН.

**Публикации.** По материалам диссертационного исследования опубликована 41 научная работа, в том числе 25 статей индексируются в международных базах данных Web of Science или Scopus; 3 статьи опубликованы в журналах, включенных в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ; 13 публикаций - в материалах научных конференций.

**Соответствие темы диссертации научной специальности.** Диссертация соответствует паспорту специальности 3.2.7. Иммунология (пп. 2, 3, 6).

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа изложена на 291 странице текста, состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, глав с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Библиографический указатель включает 708 источников, в том числе 80 отечественный и 628 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 44 рисунками и 16 таблицами.

## ГЛАВА 1 – ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 – Развитие механизмов врожденного иммунитета

Система врожденного иммунитета обеспечивает адекватный ответ на стрессорные факторы и патогены через рецепторы образа патогенности (pattern recognition receptors, PRR), расположенные на поверхности мембран клеток и в цитоплазме. Структура белков PRR образована несколькими доменами, эволюционно консервативными, с достаточно большой степенью гомологии у представителей различных видов. Ортологи TLR (Toll-подобные рецепторы), NLR (NOD-подобные рецепторы), RLR (RIG-I-подобные рецепторы), CLR (лектиновые рецепторы) и RLR (the retinoic acid-induced gene I (RIG-I)-like receptors) широко представлены не только у хордовых, но и у беспозвоночных. Исследование способов взаимодействия древнейших многоклеточных с микроорганизмами дает представление об эволюции современных способов защиты от патогенов и раскрывает новые функции уже известных белков в обеспечении гомеостаза организма. В связи с тем, что слизистые оболочки впервые возникли у морских беспозвоночных, которые существуют сотни миллионов лет, исследование механизмов врожденного иммунитета имеет как фундаментальное значение в аспекте понимания особенностей иммунной системы, так и прикладное – определение новых стратегий для последующего применения в медицине и биотехнологии.

Первые многоклеточные организмы возникли в мировом океане, и те из них, которые смогли выработать механизмы поддержания гомеостаза и передать их последующим поколениям, сохранились до наших дней [277]. Многим из них, например, кишечнополостным и оболочникам, более пятисот миллионов лет, и все они существуют благодаря защитным реакциям, называемым врожденным иммунитетом. Врожденный иммунитет реагирует немедленно на стрессорные сигналы и патогены и отражает значительную часть инфекционных агентов в

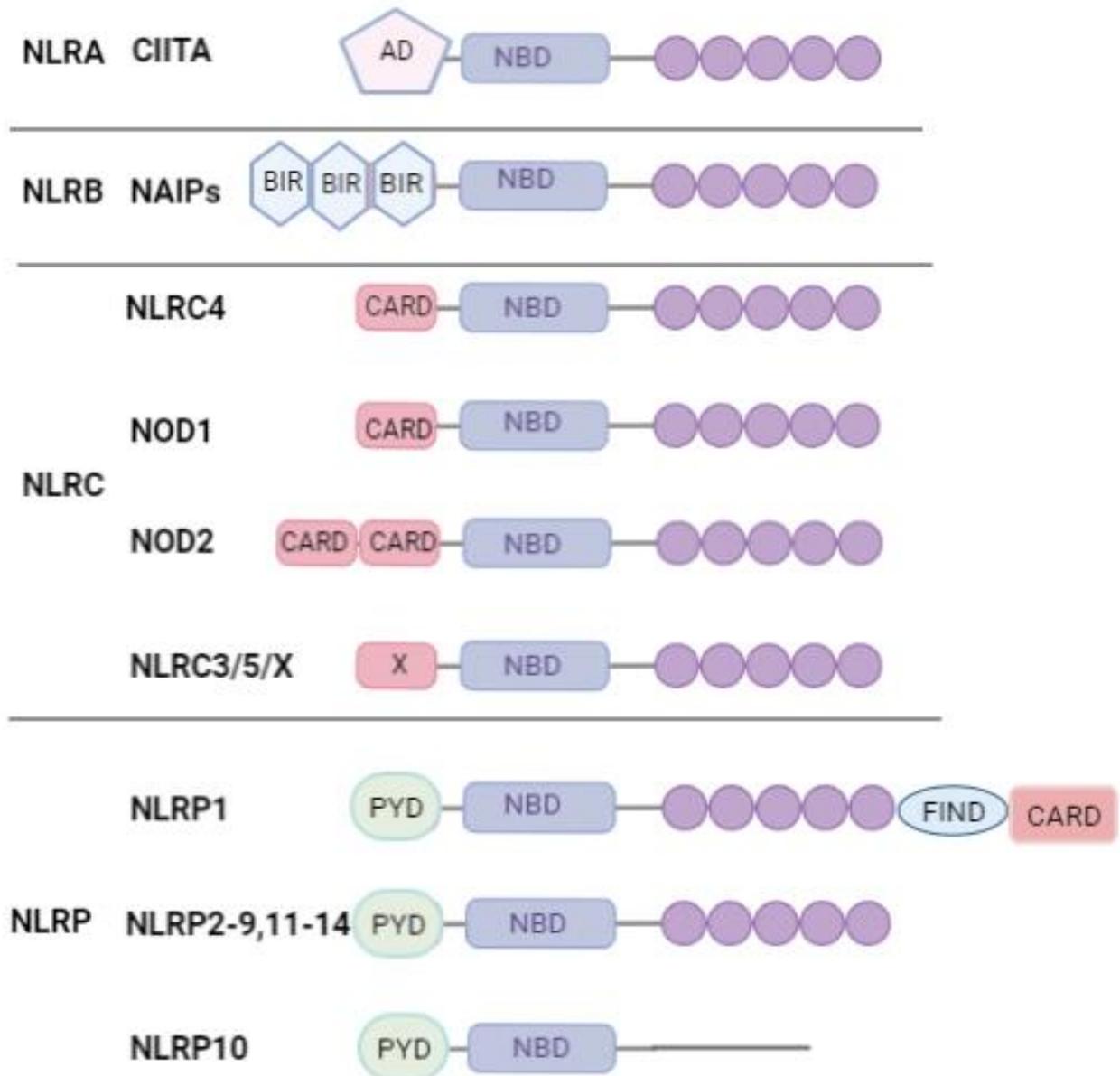
барьерных тканях – слизистых оболочках. Адаптивный иммунитет, впервые появившийся у хрящевых рыб, развивается более медленно, включает образование иммуноглобулинов и специализированных клеток памяти и нацелен на уничтожение патогенов, прошедших сквозь барьерные ткани.

Существование примитивных многоклеточных на протяжении сотен миллионов лет доказывает эффективность врожденного иммунитета, учитывая постоянную изменчивость представителей микробиологического сообщества. Система врожденного иммунитета обеспечивает адекватный ответ на патогены и толерантность к безвредной микрофлоре через рецепторы образа патогенности (PRR), расположенные на поверхности мембран клеток и внутри клеток, узнающие молекулярные паттерны, связанные с патогенами (PAMP) [433, 488, 495, 527]. Другая немаловажная функция PRR - сохранение гомеостаза в стрессовых ситуациях и утилизация погибших клеток посредством распознавания молекулярных паттернов, связанных с опасностью (DAMP) эндогенного происхождения [143]. Основные классы PRR: Toll-подобные рецепторы (TLR), Nod-подобные рецепторы (NLR), the retinoic acid-induced gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs), RIG-I-подобные рецепторы (RLR), лектиновые рецепторы (CLRs); различают также и другие [406]. Структура белков PRR образована несколькими доменами, эволюционно консервативными, с достаточно большой степенью гомологии у представителей различных видов [599].

### **1.1.1 – Nod-подобные рецепторы**

NOD-подобные рецепторы (NLR) являются внутриклеточными рецепторами узнавания PAMP и DAMP и представляют собой мультидоменные белки [486, 487, 490]. Семейство NLR человека представлено 22 белками, в которых можно выделить три части: 1) С-концевой домен, воспринимающий агонисты/связывающий лиганд (LRR); 2) центральный нуклеотид-связывающий и ответственный за олигомеризацию домен NOD (NBD/NACHT); и 3) N-концевой сигнальный домен (CARD) [437]. Семейство NLR подразделяется на четыре подгруппы: NLRA, NLRB, NLRC и NLRP в зависимости от природы N-концевого домена, состоящего, соответственно, из домена трансактивации (AD), повтора

IAP бакуловируса (BIR), каспазы-рекрутирования домена активации (CARD) и пиринового домена (PYD) [706]. В NLRP1 присутствует также FIND домен (рисунок 1.1). PYD и CARD представляют собой домены смерти (DD), которые опосредуют взаимодействия гомотипических доменов.



**Рисунок 1.1 – Семейство NLR человека**

Среди NLRs NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP12, NLRC4, и NAIP осуществляют свою активность посредством образования инфламмасом. Другие NLRs такие, как NOD1, NOD2, NLRP10, NLRX1, NLRC5 и CIITA не

взаимодействуют напрямую с воспалительными каспазами, а вместо этого активируют ядерный фактор-κB (NF-κB), митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) и интерферон (IFN) регуляторные факторы (IRF) для стимуляции врожденного иммунитета [635, 706].

NLR представляют собой самое большое и самое разнообразное семейство среди всех PRR, как структурно, так и функционально, а также по репертуару сигналов, которые они узнают [271, 422].

NLR впервые были описаны у растений как факторы резистентности к патогенам, и кодирующие их гены были названы R-генами [555]. Позднее их аналоги были обнаружены у человека. Полногеномное исследование 38 репрезентативных модельных организмов, включая основные таксоны (эубактерии, архебактерии, протисты, грибы, растения и метазои), показало, что два основных домена, NBD и LRR, существовали до разделения прокариот и эукариот [657]. Авторы исследования делают вывод, что сходство врожденных иммунных систем растений и животных сформировалось в результате конвергентной эволюции после их независимого происхождения [657]. Независимое происхождение NLRs у разных видов животных объясняет отсутствие NLRs у дрозофил, 3 у актиний (*Nematostella vectensis*) и значительное количество - 203 - у морского ежа [364, 534]. У дрозофил функцию иммунного ответа на патогены выполняют TLR, осуществляя Toll mediated NF-κB response [124]. У морского ежа NLRs расположены в основном в кишечнике, и многообразие TLRs и NLRs может служить ответной реакцией на разнообразие микроорганизмов в среде обитания [534].

В последнее время полногеномные исследования организмов представляют новые данные о рецепторах врожденного иммунитета, но интерпретация этих результатов может отличаться в связи с различными определениями NLRs. Так, при исследовании генома гидры *Hydra magnipapillata* сообщалось о 290 NLR подобных генах [210]. Однако, если придерживаться универсальной номенклатуры и определения NLR и принятой Комитетом по номенклатуре генов HUGO, NLR обозначается как ген, содержащий «нуклеотидсвязывающий домен и

богатый лейцином повтор», поскольку это выделяет два определяющих эволюционно консервативных домена, отражая негомологичное сходство NLR животных и NLR растений [696]. Таким образом, обнаруженные у гидры гены, содержащие NACHT, NB-ARC, CARD и DD домены, не могут считаться полноправными NLR в связи с отсутствием LRR домена. Тем не менее, обнаруженные 290 структур, лишенных LRR доменов и располагающихся в эктоплазме гидры, осуществляют защиту от микроорганизмов, основываясь не на выявлении с помощью LRR домена паттернов патогенности, а на основании реагирования доменов NACHT, NB-ARC, CARD и DD на стрессорные молекулы, возникающие при инвазии патогенов (*таблица 1.1*).

Полученные данные подтверждены последними исследованиями, согласно которым представители NLR семейства белки NOD1 и NOD2 активируются при взаимодействии с эндогенным метаболитом сфингозин-1-фосфатом (sphingosine-1-phosphate, S1P) [169].

**Таблица 1.1 – Количество NLR и NLR-подобных белков в разных организмах**

<i>Hydra magnipapillata</i> (гидра)	<i>Strongylocentrotus purpuratu</i> (морской ёж)	<i>Caenorhabditis elegans</i> (круглый червь)	<i>Amphimedon queenslandica</i> (губка)	<i>Homo sapiens</i> (человек)
290 <sup>1</sup>	203	0	35	≈ 20

*Примечание:* <sup>1</sup> NLR- подобные белки

S1P связывается с NBD и активирует опосредованную RIP2 передачу сигналов, которая отличается от восприятия пептидогликана через домены LRR NOD1/2 и указывает на другой механизм активации NOD1/2 с помощью S1P. Вторичный мессенджер S1P обладает плеiotропным действием как внеклеточно, так и внутриклеточно, регулируя различные процессы, включая перенос иммунных клеток, воспаление и апоптоз [587]. Учитывая, что S1P структурно и метаболически сохраняется в ходе эволюции [302], G. Pies коллегами делают

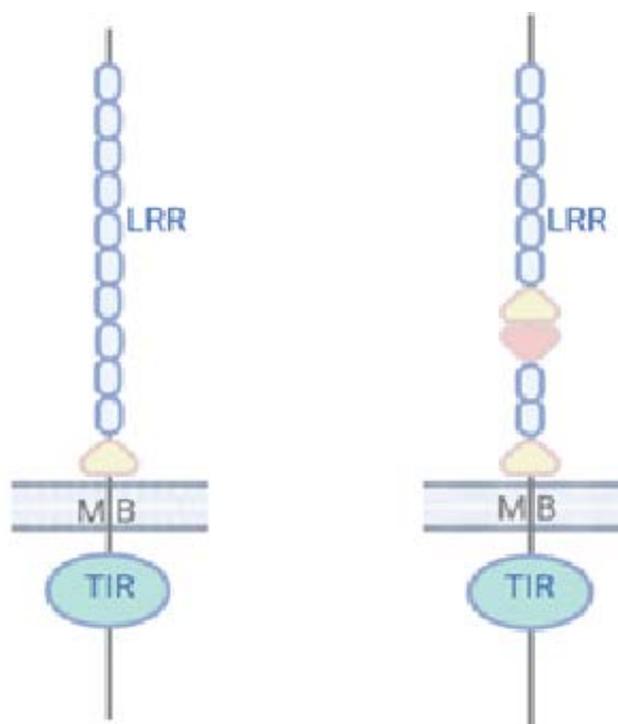
вывод, что «цитозольный S1P, генерируемый при нарушении клеточного гомеостаза, представляет собой эндогенный стресс-ассоциированный молекулярный паттерн (SAMP)» [169]. S1P генерируется в цитозоле при индукции клеточного стресса без значительной гибели клеток, в отличие от канонических молекулярных паттернов, связанных с повреждением или опасностью (DAMP), высвобождаемых после лизиса клеток [433].

Таким образом, на основании данных последних достижений можно утверждать, что первоначально идентифицированные функции NLRs определять паттерны патогенности микроорганизмов, являются не единственными. Другой функцией NLR и, возможно, более древней, является распознавание внутри клетки сигналов опасности через вторичные мессенджеры, такие как S1P, связывающиеся с NBD доменом [497]. Способ, при котором клетка в состоянии детектировать присутствие любого патогена по продуктам его метаболизма или по вторичным мессенджерам, возникающим в клетке при инвазии, независимо от PAMP, можно считать универсальным, защищающим организм от микроорганизмов, чьи PAMP не могут распознаваться. Становится понятным, почему при воздействии индукторов NLRs, например, МДП и ГМДП, возрастает противоинфекционная защита против широкого класса патогенов бактериальной и вирусной этиологии [489].

### **1.1.2 – Toll-подобные рецепторы**

Toll-подобные рецепторы (TLR) – следующий класс PRRs, появившийся у древних организмов многие миллионы лет назад [538]. Структура TLR представлена гомо- и гетеродимерами, распознающих бактериальные, вирусные патогены, а также эндогенные сигналы опасности. У человека TLR представлены 10 вариантами и образованы из 700-1100 аминокислотных остатков. TLR чаще функционируют как гомодимеры, в то же время существование гетеродимеров и возможность привлекать другие белки расширяют возможность TLRs в распознавании лигандов. Например, TLR4 человека использует белки MD2 и CD14 для узнавания LPS, при этом структура LPS имеет решающее значение [694].

TLR состоят из внеклеточного богатого лейцином повторяющегося домена для распознавания DAMP/PAMP (LRR), трансмембранного домена и домена гомологии цитоплазматического рецептора Toll/IL-1 для передачи сигнала (TIR) (рисунки 1.1, 1.2). Некоторые домены LRR содержат остатки цистеина в N-концевой (LRRNT) или дополнительные С-концевые (LRRCT) части домена LRR, в таком случае образуется множественный цистеиновый кластер. Используется также другая номенклатура: V-тип для одиночного цистеинового кластера, когда имеется только один LRRCT, расположенный рядом с доменом TIR; P-тип – для множественного цистеинового кластера, имеющего более одного LRRCT, а иногда и домен LRRNT.



**Рисунок 1.2 – Структура TLR и TLR-подобных белков.**

*Примечание:* Структура TLRs: внеклеточный домен с лейциновыми повторами (LRR), трансмембранный домен пронизывает мембрану (MB) и цитоплазматический домен (TIR). Домены LRR, содержащие остатки цистеина в С-концевой области (LRRCT), – желтые треугольники. Домены LRR, содержащие остатки цистеина в N-концевой области (LRRNT), – розовые треугольники. TLR V-типа имеют только один LRRCT, расположенный рядом с доменом TIR; TLR P-типа имеют более одного LRRCT, а иногда и домен LRRNT.

Белки, у которых отсутствует LRR или TIR домен, не относят к рецепторам TLR, и считают TLR – подобными белками.

LRR домены представлены также и в других рецепторах врожденного иммунитета – семейства NLR, а также в трансмембранных белках, принимающих участие в межклеточных контактах [629].

LRR-домен распознает DAMP или PAMP и через цитоплазматические TIR-домены конвертирует полученный сигнал в активацию внутриклеточных путей. TIR-домены рекрутируют сигнальные адаптеры MyD88, TIRAP, TRAM и/или TRIF, затем различные цитозольные киназы IRAK1, IRAK2, IRAK4, TBK1 и IKK1 (IRAK - interleukin-1 receptor-associated kinases 1, 2, 4; TBK1 - Tank binding kinase 1; IKK1 - I $\kappa$ B kinase) и убиквитинлигазы TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей; TNF receptor-associated factor 6) и Pellino 1. Эта цепь белок-белковых взаимодействий создает путь передачи сигнала, который связывает активированный рецептор с его ответом. Конечными мишенями TLRs являются ДНК-связывающие факторы транскрипции (такие как NF- $\kappa$ B и IRFs), которые активируют специфические паттерны экспрессии генов в ядре, что приводит к образованию антимикробных пептидов, провоспалительных цитокинов и хемокинов, включая фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерлейкины (IL) IL-1 $\beta$ , IL6 и др. [400, 407]. TLR располагаются на внешней мембране и на мембранах эндосом, при этом индуцировать образование активных форм кислорода (АФК) в макрофагах могут исключительно поверхностные TLR1, TLR2 и TLR4, тогда как стимуляция эндосомальных TLR (TLR3/7/8/9) не индуцирует АФК [646]. Таким образом, стимуляция поверхностных TLR увеличивает микробицидную активность.

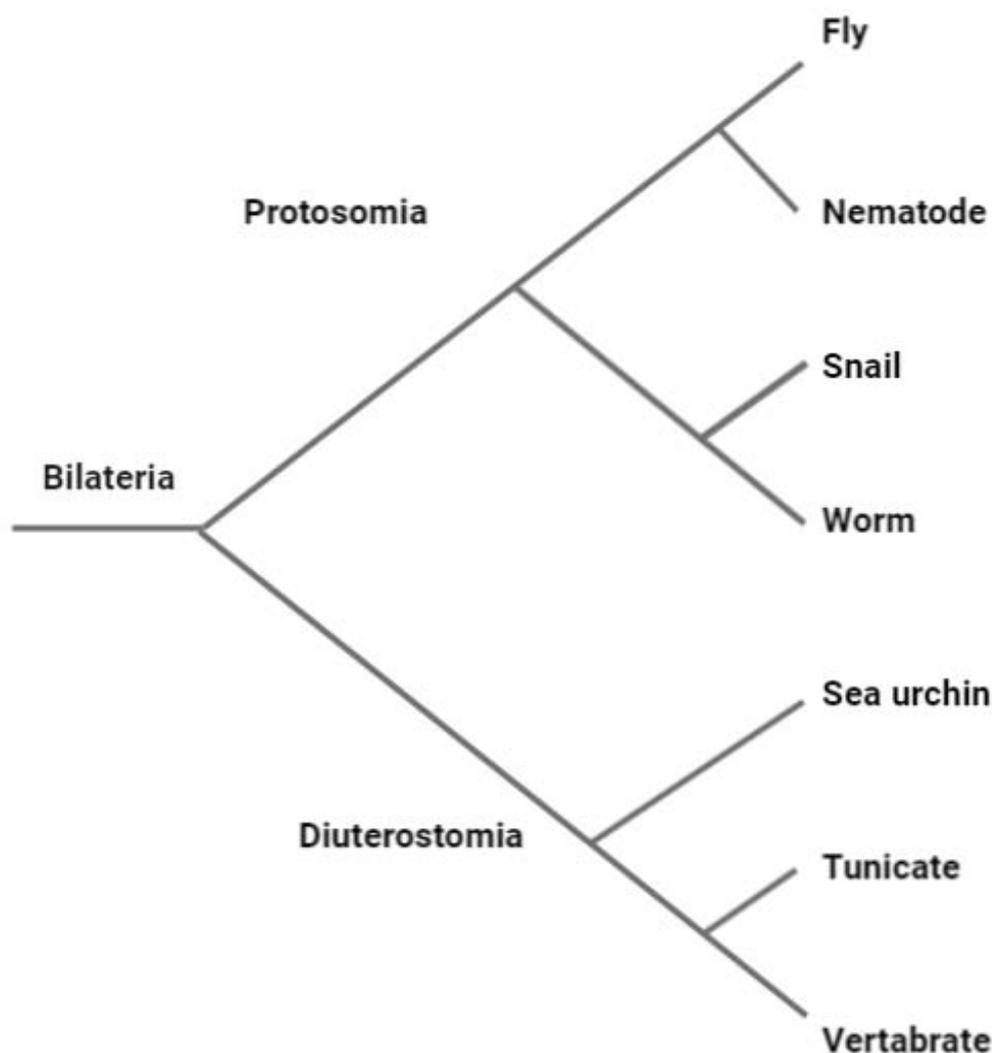
TLR первыми были определены у дрозофил [139, 402]. У дрозофилы TLR1 контролирует иммунный ответ на грамположительные бактерии и грибы, различая пептидогликаны и активируя сигнальный путь, консервативный на протяжении всей эволюции [234,650]. Геном дрозофилы кодирует восемь дополнительных рецепторов, связанных с Toll, большинство из которых принимают участие в развитии [147]. Используя аминокислотную последовательность TLR1 дрозофилы, в базе данных Human Genome Project

(<https://www.genome.gov/human-genome-project>) были найдены родственные последовательности и идентифицированы Toll-подобные рецепторы [85,441].

Разнообразие TLR очень сильно варьирует у разных видов животных; отличаются и лиганды, определяемые этими TLR. Так, например, у мыши TLR13 распознает бактериальную 23S рРНК [652] и не реагирует на 80% глубоководных бактерий, культивированных из глубин Тихого океана, содержащих модифицированный липополисахарид [205]. Авторы исследования делают вывод, что неспособность иммунных рецепторов обнаруживать большинство бактерий из другой экосистемы предполагает, что стратегии распознавания образов могут определяться локально, а не глобально [205]. Другим объяснением неответственности мышинных макрофагов на тихоокеанские бактерии может быть толерантность к микроорганизмам, не способным размножаться в интраперитонеальной полости и не представляющих опасности для животного.

Филогенетические исследования семейства генов TLR, предпринятые совсем недавно, выявили, что среди многоклеточных животных TLR не были обнаружены за пределами кишечнополостных и двусторонне-симметричных животных [287, 619].

У морских рыб *Gadus morhua* (*Gadiformes*), было обнаружено 42 гомолога человеческих TLR, при этом повышение температуры от 2°C до 6°C, способствовало значительному увеличению экспрессии гена TLR5 и уменьшению экспрессии TLR21 [649]. В геноме иглокожих – у пурпурного морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* обнаружено 222 гена Toll-подобных рецепторов (TLR) и соответствующее увеличение непосредственно связанных сигнальных адапторов [624]. Морские ежи входят в группу вторичноротых животных, включающую тип хордовых, к которому относятся люди. Следовательно, люди гораздо более тесно связаны с морскими ежами, чем с дрозофилами и круглыми червями (рисунки 1.3).



**Рисунок 1.3 – Филогенетические взаимоотношения между некоторыми представителями первичноротых и вторичноротых животных**

*Примечание:* Bilateria- двусторонне-симметричные; Protostomia - первичноротые; Diuterostomia - вторичноротые; Fly- мухи; Nematode – круглые черви; Snail - улитки; Worm - черви; Sea urchin – морской ёж; Tunicate - оболочник; Vertebrate - позвоночные.

Круглый червь *Caenorhabditis elegans* в геноме имеет 1 ген TLR (таблица 1.2) [155]. Показано, что TLR1 *C. elegans* необходим для поведенческого ответа на патогенный микроб *Serratia marcescens* [89]. Оказалось, что TLR1 необходим для поведения избегания патогенных микробов [155]. TLR1 и связанные с ним сигнальные молекулы в хемосенсорных нейронах BAG регулируют экспрессию генов в нейронах BAG и необходимы для их сенсорной функции. Нейроны BAG являются газочувствительными нейронами, которые активируются гипоксией и

CO<sub>2</sub> [264]. Обнаружено, что CO<sub>2</sub>, образующийся в результате микробного дыхания, является молекулярным сигналом, используемым *C. elegans* для избегания метаболически активных патогенов. Следовательно, у *C. elegans* TLR функционирует при восприятии микробов посредством особого механизма: способствуя развитию нейронов, которые необходимы для сенсорного обнаружения микробов [155].

**Таблица 1.2 – Число TLR у разных организмов**

<i>Hydra magnipapillata</i> (гидра)	<i>Strongylocentrotus purpuratu</i> (морской ёж)	<i>Caenorhabditis elegans</i> (круглый червь)	<i>Gadiformes morhua</i> (рыба)	<i>Homo sapiens</i> (человек)
0	222	1	35	10

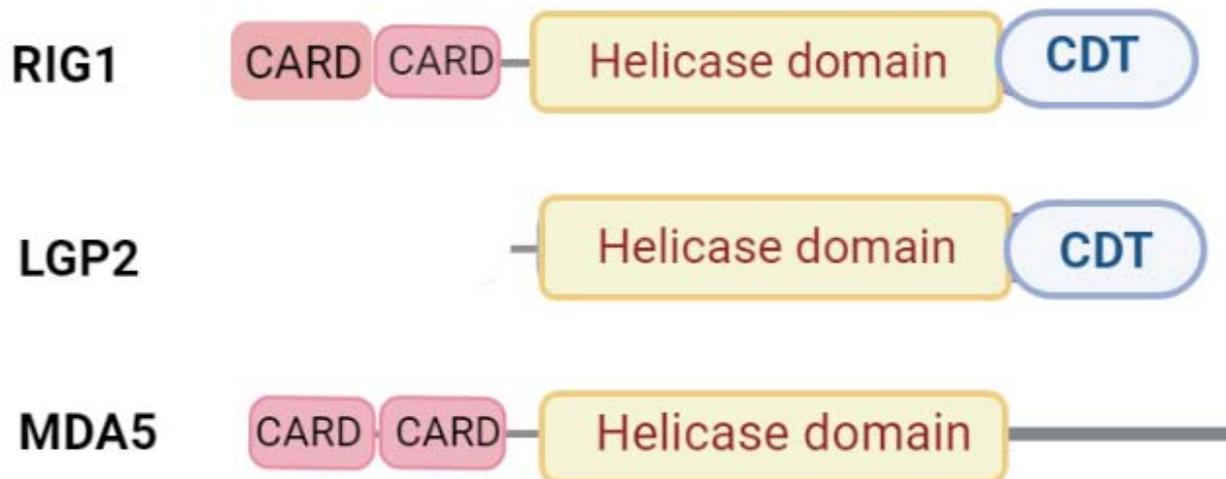
Таким образом, у филогенетически отдаленных животных TLR выполняют различные функции для достижения одной цели - защиты от патогенов во время инфекции.

TLR активируются не только при распознавании патогенов. Сигналы, возникающие при повреждении или разрушении клеток (DAMP), когда внутриклеточные компоненты высвобождаются в окружающую среду, специфически активируют TLR [83], при этом продукты распада внеклеточного матрикса также могут действовать как сигналы повреждения [563]. Значение этих сигналов может заключаться в привлечении профессиональных фагоцитов для элиминации разрушенных клеток и последующей регенерации ткани. Необходимо отметить, что излишняя активация TLR4 у млекопитающих способствует рубцеванию ткани с потерей специфических функций [146].

### **1.1.3 – RIG-I-подобные рецепторы**

RIG-I-подобные рецепторы (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RLRs) являются цитозольными сенсорами РНК-содержащих вирусов и представлены 3 белками: RIG-I (retinoic-acid inducible gene), LGP2 (laboratory of

genetics and physiology 2) и MDA5 (melanoma differentiation-associated 5) [692]. Общее свойство всех трех RLRs – наличие центрального Helicase домена с АТФ-азной активностью, раскручивающего РНК. С-концевой домен (C-terminal domain, CTD) также связывает вирусную РНК (*рисунок 1.4*).



**Рисунок 1.4 – Семейство RLR человека**

Различные CTD трех RLR определяют тип РНК, с которой они могут связываться: RIG-I связывает короткие <2000 п.н. одно- или двухцепочечные РНК, MDA5 – связывает предпочтительно двухцепочечные РНК > 2000 п.н.; LGP2 связывается с двухцепочечной РНК с тупыми концами разной длины [435, 539]. RIG-I и MDA5 имеют также два N-концевых CARD (домены активного рекрутирования каспазы), которые необходимы для инициации нижестоящей передачи сигналов. В LGP2 отсутствуют сигнальные домены CARD, что обеспечивает ему возможность отрицательной регуляции RIG-I [692]. Связывание RLRs с лигандом инициирует сигнальные каскады, в результате образуются интерфероны (IFNs) 1 типа [692]. IFNs I типа являются важными цитокинами противовирусной системе врожденного иммунитета, их синтез регулируется двумя сигнальными каскадами: 1) сигнал, индуцированный патогенами с продукцией IFN, и 2) сигнал, опосредованный рецептором IFN [633]. Связывание вирусной РНК с помощью RLRs активирует факторы транскрипции, такие, как активирующий фактор транскрипции (ATF)c-jun, NF-κB (nuclear factor κB) и регулирующий IFN фактор (IRF). Эти факторы активируют транскрипцию IFN-β

посредством взаимодействия с промотрной областью IFN- $\beta$  РНК-полимеразы и активируют транскрипцию сотен генов [160]. Распознавание RLR чужеродной РНК и последующая передача сигнала, в результате которой происходит инактивация вируса, является важным защитным механизмом от вирусных инфекций [160, 669].

Известно, что участники активированного сигнального пути RIG-I и MDA5 взаимодействуют с митохондриальным противовирусным сигнальным белком (MAVS), и это взаимодействие вызывает рекрутирование нижестоящих сигнальных молекул; MAVS является ключевым адаптером для передачи сигналов RLR [692].

У беспозвоночных противовирусная защита реализуется, в основном, через РНК интерференцию [507], но оказалось, что RLR сигнальный путь также играет незаменимую роль в противовирусном иммунитете хозяина [173, 620]. При этом путь активации сигнала у моллюска был аналогичным пути активации RLRs у человека. Было установлено наличие у устрицы *Crassostrea gigas* 13 белков семейства RLR, 11 из которых значительно активизировались при заражении герпесом (таблица 1.3). У других моллюсков *Bathymodiolus platifrons* и *Mytilus coruscus* обнаружено 12 и 19 генов TLR соответственно. Оказалось, что RLR был полностью утрачен у членистоногих 58 исследованных видов.

**Таблица 1.3 – Число RLR у разных организмов**

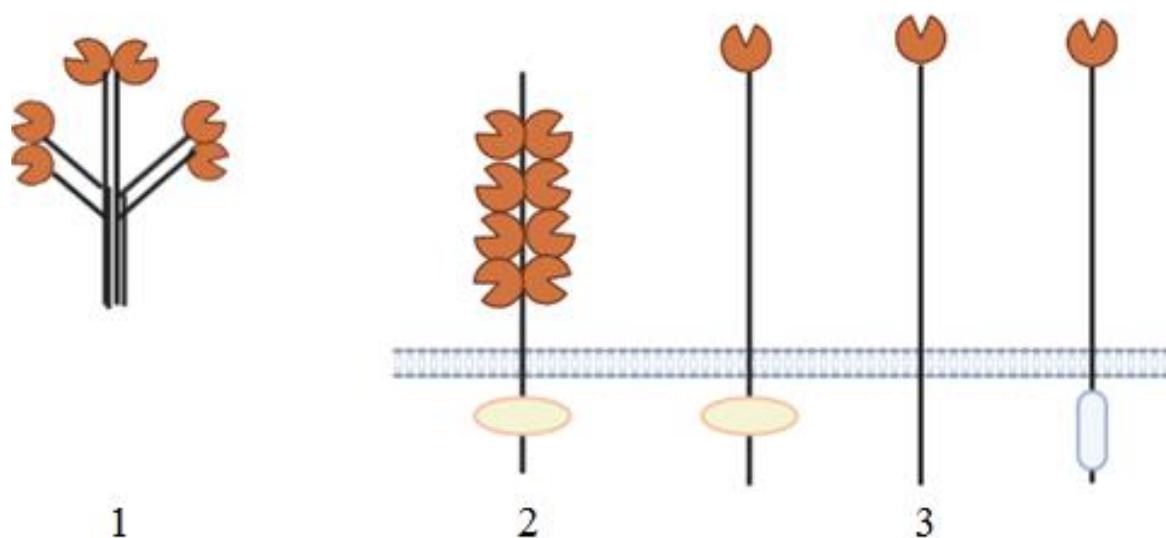
<i>Amphimedon queenslandica</i> (губка)	<i>Arthropods</i> (членистоногие)	<i>Crassostrea gigas</i> (устрица)	<i>Mytilus coruscus</i> (моллюск)	<i>Homo sapiens</i> (человек)
2	0	13	19	3

#### **1.1.4 – Рецепторы лектина С-типа**

К рецепторам лектина С-типа (CLR) относится более 1000 белков многоклеточных организмов, которые обладают доменами распознавания углеводов (CRD), связывающимися с углеводами кальций-зависимым образом [702]. На основании их структуры CLRс объединяют в три группы: растворимые,

мембран связанные I типа и мембрансвязанные II типа [519]. Растворимые CLR включают лектин, связывающий маннозу (MBL), который активирует систему комплемента, активируя врожденный иммунитет против дрожжей [383, 668]. MBL распознает маннозу и N-ацетилглюкозамин на микроорганизмах, что приводит к опсонизации и активации лектинового пути комплемента. MBL также взаимодействует с углеводами гликопротеина (gp)120 ВИЧ и может ингибировать распространение ВИЧ [379].

Мембрансвязанные лектины подразделяются на две большие группы в зависимости от количества доменов распознавания углеводов. CLR I типа имеют несколько доменов, CLR II типа – 1 домен (*рисунок 1.5*). При этом цитоплазматический домен может иметь различную структуру, в частности обладать мотивом активации иммунорецептора на основе тирозина (immunoreceptor tyrosine-based activation motif - ITAM) или мотивом ингибирования иммунорецептора на основе тирозина (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif - ITIM), придающими, соответственно, иммуностимулирующие или иммуносупрессирующие функции. ITAM мотив необходим для передачи сигнала ниже стоящему пути активации [265].



**Рисунок 1.5 – Рецепторы лектина С-типа**

*Примечание:* CLR человека. 1 – растворимые CLR; 2 – CLR I типа; 3 – CLR II типа.

CLR функционируют как PRR для распознавания микробных компонентов и интернализуют различные гликопротеины и микробы с целью клиренса и презентации антигена Т-лимфоцитам [475]. CLR-индуцированные сигнальные каскады приводят к активации семейства транскрипционных факторов ядерного фактора карраВ (NF-κB) через Syk- и CARD9-зависимый пути. Активация NF-κB играет критическую роль в индукции врожденных иммунных и воспалительных реакций при микробной инфекции и повреждении тканей [224, 281].

Функция CLRс заключается не только в распознавании патогенов, но и в обнаружении мертвых или трансформированных клеток [201]. Один из CLRс, экспрессируемых на макрофагах, распознаёт компонент малого ядерного рибонуклеопротеина, который высвобождается из мертвых клеток и активирует фагоцитоз макрофагов, а также продукцию воспалительных цитокинов и хемокинов [458].

Геномное секвенирование рецепторов лектина С-типа показало множество CLR белков беспозвоночных, при этом их доменная архитектура заметно отличается от позвоночных [701]. CLR позвоночных эволюционировали, чтобы специфически распознавать белковые, липидные и неорганические лиганды, в том числе специфичные для ветвей позвоночных змеиные яды, а также рыбий антифриз и белки скорлупы птичьих яиц [701].

Для изучения эволюции рецепторов лектина С-типа используют подход сравнения генов различных кластеров CLR [549]. Было обнаружено, что мотив лектина С-типа CLECT для распознавания углеводов появился на ранней стадии эволюции. Его можно обнаружить в белках многих модельных организмов, в том числе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, нематод *Caenorhabditis elegans* и плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, а также оболочников [159, 549, 573]. Кластер DECTIN-1 CLR I типа имеет значительную гомологию с другими видами организмов, и считается возникшим у человека в результате последующих дупликаций генов с инверсиями в Alu последовательностях [549].

Самым древним видом, обладающим лектиноподобным белком С-типа, является морская асцидия *Botryllus schlosseri*, колониальное хордовое

беспозвоночное. Белок BsCD94-1 представляет собой трансмембранный рецептор типа II с лектиноподобным доменом С-типа, имеющим наибольшее сходство с лектиноподобными рецепторами С-типа млекопитающих. Интересно, что BsCD94-1 экспрессируется на подмножестве клеток крови *B. schlosseri* и играет роль в аллоузнавании [153, 526]. Предполагается, что первые гены лектиноподобных рецепторов С-типа возникли до дивергенции рыб и четвероногих более 400 миллионов лет назад с последующими независимыми дубликациями общего предкового гена [284].

В настоящее время известны геномы 3278 видов организмов, преимущественно позвоночных [313]. Отмечается, что геномы беспозвоночных, в том числе и морских, недостаточно изучены [313].

### **1.1.5 – Клеточные факторы врожденного иммунитета**

Реализация иммунного ответа у млекопитающих основывается на клеточных и гуморальных факторах врожденного и адаптивного иммунитета. Эпителий и фагоцитирующие клетки, относящиеся к врожденному иммунитету, представляют первую линию защиты от патогенов.

На примере гидры, одного из самых простых известных многоклеточных животных, можно проследить эволюцию механизмов врожденной иммунной системы. Оказалось, что у гидры полностью отсутствуют мобильные фагоциты и Toll-подобные рецепторы (TLR). Вся антимикробная защита осуществляется эпителием гидры, оснащенным мощными антимикробными пептидами. Индукция продукции противомикробных пептидов в эпителии гидры опосредована взаимодействием белка, содержащего богатые лейцином повторы (LRRs), с белком, содержащим TIR-домен, в котором отсутствуют LRR [151]. На основании своих исследований Т.С. Bosch и коллеги делают вывод о том, что эпителий и антимикробные пептиды представляет собой древнюю систему защиты хозяина [151].

Гемоциты - основные клетки беспозвоночных, обладающие подвижностью, ответственны за фагоцитоз и производство растворимых антимикробных и цитотоксических факторов [473]. В клеточном иммунитете асцидий - хордовых

морских беспозвоночных, принадлежащих к ветви *Tunicata* в типе хордовых, - гемоциты циркулируют в гемолимфе и глотке и при инвазии PAMP распознаются и индуцируют воспалительные факторы [614].

### 1.1.6 – Белки эпителия

Эпителиальные ткани – кожа и слизистые представляют механическую защиту от патогенов. При этом состав компонентов слизистой оболочки влияет на колонизационную резистентность и обеспечивает среду, благоприятную для поддержания комменсальной микрофлоры, которая предохраняет организм от инфекций и поддерживает гомеостаз [84,125]. Считается, что слизистые оболочки впервые появились около 560 миллионов лет назад у водных обитателей - представителей типа книдарий, или стрекающих, *Cnidaria* [151, 360, 566, 663].

В состав слизи у млекопитающих входят муциноподобные белки, растворимые IgA, лизоцим, антимикробные пептиды (АМП). Муцины представляют собой крупные гликозилированные белки, покрывающие клетки слизистого эпителия. Исследование эволюции муцинов с использованием профильного поиска в базе данных белковых последовательностей NCBI, выявило, что большинство позвоночных имеет 5–6 консервативных генов, кодирующих образование гелеобразующего муцина [569]. Исключение составляет лягушка *Xenopus tropicalis* с репертуаром 26 муцинов этого типа. RNA-секвенирование выявило, что эти белки широко распространены у беспозвоночных. Их присутствие у *Cnidaria*, *Porifera* и *Stenophora* показывает, что эти белки присутствовали на ранних этапах эволюции метазоя. Выявлен консервативный N-концевой домен FCGBP, встречающийся у муцинов всех организмов, включая ряд бактериальных белков [569]. При этом бактериальные белки имеют доменный состав, отличный от эукариотических белков. Большинство (425 из 564) бактериальных белков с доменами FCGBP\_N относятся к бактериальным группам флавобактерий, цитофагов и сфингобактерий, обладающих общей функцией – способ движения, известный как «скользящая» подвижность [370]. В этой подвижности не участвуют ни жгутики, ни пили.

Данное исследование демонстрирует очень раннее происхождение муциноподобных белков, участвующих в защите от патогенов.

### 1.1.7 – Антимикробные пептиды

Антимикробные пептиды (АМП) – древний и широко распространенный от прокариот до эукариот класс соединений, направленный на защиту хозяина от проникновения патогенов [320, 592].

К АМП относятся соединения, содержащие от 5 до 100 аминокислотных остатков, два и более из которых являются положительно заряженными (аргинин, лизин или, в кислой среде, гистидин), и значительную долю, обычно более 50%, гидрофобных остатков. Классическими катионными антимикробными пептидами являются дефенсины и кателицидины.

История АМП началась с открытия в 1939 г. у почвенных бактерий *Bacillus* пептида, оказывавшего защитное действие против пневмококковой инфекции у мышей, названного грамицидином [702,703]. АМП животного происхождения, проявляющие литическую активность в отношении грамотрицательных бактерий, впервые были описаны в 1956 г. в полиморфно-ядерных лейкоцитах перитонеального экссудата кроликов [306, 702]. В эксперименте экстракты лейкоцитов человека и морской свинки также проявили бактерицидную активность, но в меньшей степени, чем препараты клеток кролика. В то же время аналогичные экстракты лейкоцитов крысы и мыши не проявили бактерицидной активности. В 1963 году Х. И. Зея и Дж. К. Шпицнагель выделил из гранул нейтрофилов кролика и морской свинки антимикробные полипептиды со значительной долей аргинина в структуре и определил их молекулярную массу – около 10 кДа [702,703]. Впоследствии их назвали дефенсинами.

В 1981 г. Х. Г. Боман с коллегами выделили АМП из гемолимфы куколок бабочки *Hyalophora cecropia* и назвали их цекропинами А и В [168, 530, 576]. Обнаруженные пептиды дают представление о способах защиты от инфекции у насекомых, у которых отсутствуют иммунокомпетентные клетки адаптивного иммунитета, обеспечивающие защиту позвоночных. За это время из насекомых было выделено более 250 АМП [506], многие из которых продемонстрировали не

только литические свойства по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, но и показали способность предотвращать образование биопленок и появление антибиотико-резистентных штаммов, например, цекропин А, разрушающий уропатогенную *Escherichia coli* [384].

В 1985 г. Т. Ганц и Р. И. Лерер с коллегами впервые охарактеризовали и определили структуру антимикробных пептидов из азурофильных гранул нейтрофилов человека, назвав их пептидами нейтрофилов человека (пептиды нейтрофилов человека - HNP1, HNP2, HNP3) или дефенсинами. Установлено, что смесь трех дефенсинов HNP 1-3 в концентрации 50 мкг/мл обладала литической активностью *in vitro* в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* в 10 мМ фосфатном буфере, содержащем определенные питательные вещества (5 мМ глюкозы и 1% соевая среда). В буфере, не содержащем питательных веществ, антимикробной активности пептидов не наблюдалось. В то же время в буфере без питательных веществ HNP1-3 проявлял высокую степень активности в отношении дрожжеподобных грибов *Cryptococcus neoformans*, инактивирующего вирус простого герпеса 1 типа. Сравнительный анализ показал, что HNP-1 и HNP-2 были более активны, чем HNP-3 против большинства тестируемых микробов [278].

Интерес к АМП существенно возрос после открытия в 1986 г. магайнинов - пептидов слизистых оболочек шпорцевых лягушек *Xenopus laevis*, активных не только в отношении бактерий, но и в отношении простейших [700]. В 1991 г. была установлена значительная степень гомологии между пептидами нейтрофилов человека, кролика, морской свинки и крысы и определена их решающая роль в реализации первой линии защиты от инфекций [398].

Антимикробные пептиды являются важным элементом слизистого эпителия беспозвоночных, обеспечивающих иммунную защиту [645]. Они конститутивно и индуцибельно экспрессируются для модулирования иммунных реакций, участвующих в защите от патогенных микроорганизмов [427]. В этом контексте антимикробные пептиды беспозвоночных представляют собой основу гуморальной системы защиты от инфекций. Морские беспозвоночные

представляют собой огромное разнообразие животных, обитающих в соленой воде. В эту разнообразную группу входят различные водные организмы, в том числе губки, кораллы, кишечнополостные, полихеты, моллюски, ракообразные и иглокожие.

Примечательной особенностью морских беспозвоночных являются их защитные механизмы, выработанные в ходе длительной эволюции при постоянном контакте с патогенными микроорганизмами. Известно, что в одном миллилитре морской воды содержится около миллиона бактерий, десять миллионов вирусов и около тысячи мелких простейших и водорослей [371]. За несколько сотен миллионов лет морские беспозвоночные выработали надежные защитные механизмы, позволяющие процветать в сложных условиях, несмотря на отсутствие приобретенного иммунитета. Примечательно, что микроорганизмы, включая патогены, более распространены в морской воде по сравнению с наземной средой. В совокупности океанические микроорганизмы таят в себе обширный и неиспользованный запас биологического и генетического разнообразия, превосходящий наземные аналоги как по биоразнообразию, так и по биомассе любые другие известные на Земле [371, 518]. Преобладает мнение, что биологически активные соединения, обнаруженные в морских организмах, намного превосходят те, которые получены из наземных организмов [625]. Значение морских беспозвоночных как источника антимикробных молекул заключается в том, что многие из этих соединений обладают уникальной структурой и механизмом действия и являются перспективными кандидатами для разработки новых антибиотиков. За последние два десятилетия ряд антимикробных пептидов был выделен из морских беспозвоночных, включая кишечнополостных, моллюсков, кольчатых червей, членистоногих и оболочников [128, 497, 529, 427].

Кишечнополостные, или стрекающие, — группа водных организмов, в которую входят гидроидные, коралловые полипы, кубомедузы, и сцифоидные. Их противомикробные пептиды включают аурелин, проявляющий антимикробные

свойства против грамположительных и грамотрицательных бактерий, и гидролизин [128].

Моллюски – тип первичноротых животных, включает моллюсков, мидий, кальмаров, осьминогов, полиплакофор и брюхоногих моллюсков. Большинство их антимикробных пептидов представляют собой катионные пептиды, богатые цистеином. В соответствии с первичной структурой и типами дисульфидной связи АМП моллюсков различают дефенсины, мителин, митицин и митимицин [336]. Охарактеризованные пептиды обладают разной степенью антимикробной активности, некоторые из них, в частности, Myticin C, обладают также противовирусной и иммуномодулирующей активностью, осуществляют контроль развития личиночной стадии [122, 477]. АМП митимицин обладает противогрибковыми свойствами, ингибирует рост *Neurospora crassa* и *Fusarium culmorum* [282].

Анелиды – кольчатые черви включают червей, пиявок и мизостомид. АМП, выделенные из этого типа, включают ареницины, перинерин, хедистин и никомицины, капителлацин, абареницин. Ареницины обладают широким спектром антимикробной активности в отношении грибов и бактерий [426, 529]. В низких концентрациях ареницины активируют систему комплемента [111]. Оказалось, что димеризация ареницина является ключевым моментом для проявления его цитотоксических свойства ареницина [217].

Перинерин обладает активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и грибов [512]. Хедистин обладает широким спектром антимикробной активности, включая метициллин-резистентный *Staphylococcus aureus* и *Vibrio alginolyticus*. Никомицин и капителлацин, выделенные из кольчатых червей *Nicomache minor* и *Capitella teleta*, обладают не только антибактериальной активностью, но и цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток [92, 497]. Капителлацин разрушает биопленки и предотвращает образование новых биопленок *E. coli*. Абареницин обладает сильным антибактериальным потенциалом против широкого спектра грамотрицательных бактерий, включая лекарственно-устойчивые штаммы [427].

АМП членистоногих представлены пенаидинами, выделенными из ракообразных (креветок), полифемузином и тахиплезином мечехвоста [131, 310, 609]. При этом пенаидины показывают выраженную активность по отношению к некоторым грамположительным и грамотрицательным бактериям, а также к мицелиальным грибам и не влияют на *Candida albicans* и *Saccharomyces cerevisiae* [541, 585]. Тахиплезин I обладает широким спектром антимикробной активности в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов и вирусов [532]. Обнаруженная противоопухолевая активность тахиплезина I показана на многих опухолевых клетках [353].

Среди АМП оболочников большинство выделено из гемоцитов асцидий. Это стиелины, клаваспирин, клаванины, галоциамины, пликатамид, дицинтаурин и галоцидин [182, 183, 396, 517]. Оказалось, что клаванины и пликатамид активны в отношении метициллин-резистентного золотистого стафилококка и являются перспективными средствами для разработки лекарств для лечения сепсиса и раневых инфекций [181, 517].

Все перечисленные АМП относятся к конститутивным, то есть постоянно экспрессируемым вне зависимости от активационного стимула. В ответ на микробную инфекцию беспозвоночные могут вырабатывать дополнительные антимикробные белки и пептиды, активизирующие защиту.

В секвенированном геноме морского ежа *Strongylocentrotus purpuratus* обнаружено 17 генов, которые активируются при иммунной нагрузке. Они кодируют белки SpTrf, которые связываются с бактериями и с дрожжами и усиливают фагоцитоз [137].

У круглого червя *Caenorhabditis elegans* обнаружены инфекционно-индуцируемые антимикробные пептиды NLP-29 и NLP-31, которые по-разному регулируются грибковой и бактериальной инфекцией [647]. Примечательно, что индукция этих АМП не зависит от единственного Toll-подобного рецептора нематод, а регулируется белком Tir-1. Таким образом, Tir-1 может представлять собой компонент ранее не охарактеризованного, но консервативного врожденного иммунного сигнального пути.

У асцидий *Ciona robusta* воспалительный стимул активирует экспрессию не только генов АМП, но и галектинов, лектинов С-типа, коллектинов, интерлектинов, ортологов факторов комплемента, TNF $\alpha$ , IL-17 [614].

Клонирование позволило провести анализ последовательности и молекулярные исследования, чтобы выявить семейства генов, связанных с иммунной системой, включая Toll-подобные рецепторы, галектины, лектины С-типа, коллектины, интерлектины, пентраксиноподобные, пероксинектины, факторы комплемента, подобные TNF $\alpha$ , IL-17, TGF, а также MIF-подобный [614]. Эти гены быстро активируются воспалительным стимулом, и их транскрипция во времени сходна. Сходство последовательностей доменов и филогенетические отношения с аналогами позвоночных позволяют понять эволюцию генов, связанных с иммунитетом. Селективные биотесты, а также биоинформационные подходы позволили охарактеризовать антимикробные пептиды и идентифицировать посттранскрипционные молекулярные механизмы, способные влиять на динамику регуляции генов [614, 427], проявляя, таким образом, способность АМП регулировать экспрессию генов.

Циркулирующая гемолимфа беспозвоночных содержит такие биологически активные вещества, как комплемент, лектины, факторы свертывания и антимикробные пептиды [117].

В настоящее время у *Drosophila melanogaster* имеется семь четко определенных индуцибельных семейств АМП. Активность этих АМП была определена *in vitro* или в сравнении с гомологичными пептидами других насекомых: мечниковин и дрософилин проявляют противогрибковую активность; дросоцин, диптерицины и аттацины в основном проявляют антибактериальную активность [444, 641]. Дефенсин и цекропины обладают антибактериальной и некоторой противогрибковой активностью [662]. В системном ответе после микробного распознавания эти АМП регулируются сигнальными путями Toll и Imd NF- $\kappa$ B [184].

У человека АМП обнаружены не только в нейтрофилах, но и в естественных клетках-киллерах, макрофагах, Т-лимфоцитах, эпителиальных

клетках слизистых оболочек и кожи [278, 279, 474], хромаффинных клетках надпочечников [215] и семенниках [260]. При этом они обладают не только антибактериальной [278, 279, 474], но и антипротозойной [314, 699], противогрибковой [699] и противовирусной активностью [195, 289], а также участвуют в нейро-эндокринной регуляции [215, 260].

На сегодняшний день известны структуры 26447 АМП, и 3444 из них молекулярно охарактеризованы с определением третичной структуры [203].

Систематизация АМП может быть основана на источниках и методах получения, особенностях аминокислотной последовательности и вторичной структуре ( $\alpha$ -спиральная, бета-складчатая, бета-шпилька, циклическая, линейная) [95, 171]. Большинство АМП приобретают вышеуказанные конфигурации при взаимодействии с биологическими мембранами. При этом гидрофильные аминокислотные остатки располагаются вдоль одной стороны, а гидрофобные аминокислотные остатки – вдоль противоположной стороны спиральной молекулы. Амфипатичность антимикробных пептидов позволяет им включаться в липидный бислой мембраны [630]. В то время как поверхности мембран эукариотических клеток имеют нейтральный электростатический заряд, поверхности бактерий заряжены отрицательно из-за присутствия фосфолипидов, тейхоевых кислот и липополисахаридов (ЛПС) и связываются с положительно заряженными АМП за счет электростатических сил [464]. Таким образом, электростатическое взаимодействие АМП с бактериальными мембранами, а не с мембранами клеток-хозяев, обеспечивает их специфичность [315, 438].

#### **1.1.7.1 – Антимикробная активность антимикробных пептидов**

Основными функциями АМП являются бактерицидное и бактериостатическое действие [301]. Антимикробная активность АМП реализуется посредством прямого контакта со стенками клеток бактерий, основанного на электростатическом взаимодействии. Катионные АМП взаимодействуют с отрицательно заряженной поверхностью внешней мембраны бактерии и либо нейтрализуют заряд на участке внешней мембраны, создавая поры, через которые пептид может проникнуть во внешнюю мембрану, либо

связываются с ЛПС и разрушают мембрану. Как только пептиды проходят через внешнюю бактериальную мембрану, они связываются с фосфолипидами отрицательно заряженной поверхности цитоплазматической мембраны бактерии и вызывают фатальные изменения в структуре мембраны или создают трансмембранные каналы, в результате чего целостность бактериальной клетки и происходит ее гибель [301].

В большинстве случаев литическая активность АМП проявляется в деструктивном действии на бактериальные мембраны, но, кроме того, ряд АМП обладает способностью воздействовать на цитоплазматические мишени бактерий, ингибируя синтез и метаболизм нуклеиновых кислот [504, 594, 602], АТФ [611], металлопротеиназы [376, 558, 572], биосинтез и фолдинг белков [352, 600], деление клеток [369, 589], биосинтез клеточной стенки [363, 273] и биосинтез липополисахаридов [273, 291, 515]. При этом активность АМП может снижаться с увеличением кислотности и ионной силы раствора вплоть до полного ингибирования в растворах с рН 5,8 и 0,14 М NaCl [575].

АМП производятся не только многоклеточными организмами для предотвращения инфекции, но и одноклеточными организмами. Бактерии и простейшие продуцируют АМП с целью завоевания мест обитания и воздействия на других представителей бактериального сообщества. Например, микроцины грамотрицательных бактерий *Enterobacteriales* уменьшают количество *E. coli* и увеличивают количество *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в слепой кишке [575], а АМП из 77 аминокислотных остатков представителя патогена *Entamoeba histolytica* проявляет литические свойства против грамположительных и грамотрицательных бактерий [540].

Помимо прямого действия на бактерии, АМП реализуют свою активность посредством взаимодействия с патогенными факторами бактерий, например, ЛПС, и последующей его инактивации [287, 401].

Способность АМП инактивировать ЛПС послужила основой для масштабного изучения их способности предотвращать гнойные осложнения в надежде на дальнейшее использование при хирургических вмешательствах [164].

Продемонстрирован потенцирующий эффект АМП при совместном применении с антибиотиками. АМП ареницин-1 кольчатого червя *Arenicola marina* способен существенно облегчить доступ антибиотиков к внутриклеточной мишени за счет дестабилизации мембраны. Синергизм АМП с антибиотиками позволяет снизить дозировку антибиотиков при сохранении их активности, что позволит существенно снизить лекарственную нагрузку на организм человека [116].

Следует отметить, что комменсальные и условно-патогенные микроорганизмы проявляют различную чувствительность к дефенсинам. В частности, отмечается устойчивость *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* (CIDCA 133) к альфа- и бета-дефенсинам человека [102], АМП бесхвостых амфибий [242]. Причем максимальная активность дефенсина регистрировалась в дистиллированной воде и при концентрации 0,1–10 мкг/мл, и ингибировалась в фосфатно-солевом буфере. Оказалось, что резистентность связана со структурой пептидогликана и мембраны штамма CIDCA 133, но не штамма CIDCA 331 [102]. Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм CIDCA 133 *Lactobacillus delbrueckii subsp. Lactis* хорошо адаптирован к эффекторам врожденного иммунитета как млекопитающих, так и амфибий. Это указывает на консервативные механизмы взаимодействия комменсальных микроорганизмов с ключевыми компонентами врожденной иммунной системы хозяина.

Адаптация микроорганизмов к АМП может выражаться не только в изменении структуры пептидогликана и бактериальных мембран, но и в выработке ферментов, разрушающих дефенсины макроорганизма. Так, например, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes* продуцируют протеиназы, разрушающие дефенсины человека, обеспечивая тем самым колонизационную устойчивость бактерий [226, 381, 581].

Особенности ответа различных микроорганизмов на АМП человека необходимо детально изучить с целью разработки стратегии терапии, связанной с инфекционными патологиями.

Многие АМП, помимо антибактериальной активности, обладают еще и противовирусной активностью, при этом нейтрализующее действие АМП выражается как в прямом разрушении оболочки капсида вируса, так и опосредованно за счет активации противовирусной активности хозяина [195, 308, 388]. В случае прямого контакта АМП с вирусом возможно разрушение капсида вируса [314, 553] или препятствование связыванию вируса с рецептором без нарушения его оболочки [352]. Циклический тета-дефенсин резусов и бабуинов защищает лабораторных животных от коронавирусной инфекции тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV [399].

Пептиды, выделенные из амфибий, каерин 1.1, каерин 1.9 и макулатин 1.1, полностью ингибируют ВИЧ-инфекцию Т-клеток в течение нескольких минут после воздействия вируса в концентрациях, не токсичных для клеток-мишеней [113]. Защитной функцией против ВИЧ-инфекции обладает полученный из цианобактерий циановирин [661]. Человеческий дефенсин HNP1 напрямую ингибирует активность ВИЧ-1, HSV-1, HSV-2, VSV, вируса гриппа, ЦМВ, аденовируса и вируса папилломы [198].

Кателицидины короткохвостого серого опоссума не только лизируют грамположительные и грамотрицательные бактерии, но и ингибируют репликацию вируса Западного Нила [180]. Катионный противомикробный пептид каерин 1.1 из амфибий рассматривается как перспективное лекарственное средство в животноводстве в связи с его литической активностью в отношении вируса эпидемической диареи свиней (PEDV) [158], приносящий значительный ущерб животноводству [90].

АМП с широким спектром биологической активности, включая нейротоксическую, антикоагулянтную, противодиабетическую и антифризную, были выделены из тканей многих морских беспозвоночных [497, 427].

Обнаруженная способность АМП предотвращать появление биопленок [198, 384, 533], их противовирусная [180, 195, 388], противогрибковая [521, 580, 680], противопротозойная [578], противоопухолевая [107, 112, 238, 353], а также

иммуномодулирующая активность служат основой для разработки современных лекарственных средств [109, 687].

#### **1.1.7.2 – Иммуномодулирующая активность антимикробных пептидов**

АМП у человека представлены тремя основными семействами: дефенсинами, кателицидинами, гистатинами. Дефенсины в зависимости от типа дисульфидных связей делятся на альфа- и бета-дефенсины. Альфа- и бета-дефенсины конститутивно продуцируются нейтрофилами, лимфоцитами и эпителиальными клетками кожи и слизистых оболочек [208].

Альфа-дефенсины 1-4 человека также называют пептидами нейтрофилов человека 1-4 (HNP), поскольку они чаще всего экспрессируются нейтрофилами и составляют до 50% общего содержания белка в этих клетках [263, 414]. Эти пептиды играют ключевую роль в местном и системном врожденном иммунитете, поскольку вместе с другими белками, такими как лизоцим, протеазы, РНКазы и другими протеинами, участвуют в уничтожении бактериальных возбудителей [335]. Концентрация HNP 1-3 в плазме крови человека в норме составляет  $254,8 \pm 7,1$  пг/мкл и может повышаться в 4,2 раза при бактериальной инфекции и в 3,2 раза при небактериальной инфекции [247]. Альфа-дефенсины 5 и 6 человека продуцируются и секретируются преимущественно клетками Панета тонкого кишечника [144], а также эпителием женских [283] и мужских половых органов [542].

Бета-дефенсины экспрессируются эпителиальными клетками кожи и слизистых оболочек [87, 199, 200, 397]. Выделено шесть типов бета-дефенсинов человека (от hBD-1 до hBD-6), из которых дефенсины hBD-1, hBD-2 и hBD-3 хорошо охарактеризованы с точки зрения уровней экспрессии и антимикробной активности [565, 339]. hBD-1 экспрессируется эпителиальными клетками конститутивно, тогда как hBD-2 и 3 – при стимуляции провоспалительными цитокинами, а также микроорганизмами. Антимикробная активность hBD-1 и hBD-2 снижается с увеличением концентрации соли, тогда как hBD-3 сохраняет бактерицидное действие даже при высоких концентрациях хлорида натрия [199, 200, 337].

Индукторами секреции дефенсинов являются как целые бактерии, так и их компоненты, например, ЛПС, липотейхоевая кислота, липид А и мурамилпептиды [570]. После того, как было показано, что олигодезоксинуклеотиды CpG также индуцируют секрецию дефенсинов, стало очевидным, что стимуляция рецепторов TLR и NLR врожденного ответа является сигналом к высвобождению клетками дефенсинов [469, 634, 556]. Индукторы АМП как эндогенного, так и экзогенного происхождения представляют особый интерес в связи с возможностью их использования в качестве приоритетных препаратов, нацеленных на клетки, продуцирующие АМП. Индукция экспрессии эндогенных антимикробных пептидов является новой концепцией лечения инфекций у людей, а также сельскохозяйственных животных и птиц [522, 643].

Было продемонстрировано, что метаболиты, полученные из микробиоты кишечника, а точнее короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), способствуют выработке кателицидина поджелудочной железой, а изменениями в микробиоте кишечника объясняют дефектное производство кателицидина у мышей NOD [498]. Было показано, что короткоцепочечная масляная жирная кислота и дитерпеноид форсколин индуцируют экспрессию куриных АМП-генов *AvBD2*, *AvBD6* и *AvBD7*, связанных с бета-дефенсинами и кателицидином *CATH2*, как *in vitro*, так и *in vivo* [157]. Кроме того, витамин D в присутствии бактериальных возбудителей является прямым индуктором экспрессии генов, кодирующих антимикробные пептиды, в частности кателицидин [676]. Это доказывает, что АМП являются ключевыми факторами врожденного иммунного ответа на бактериальную инфекцию и могут действовать как сигнальные молекулы, участвующие в регуляции иммунной системы.

На уровень экспрессии дефенсинов также влияют повреждение тканей и эндогенные факторы. При повреждении ткани экспрессия hBD-2 увеличивается, тогда как инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1) и трансформирующий фактор роста- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) подавляют экспрессию hBD-2 [242]. Быстрое высвобождение дефенсинов может индуцировать IFN- $\gamma$  [500], IL-13 [365].

Представители семейства кателицидинов обнаружены в гранулах фагоцитов, а также в клетках различных барьерных эпителиев [697]. В отличие от дефенсинов, кателицидины характеризуются широким структурным разнообразием. Однако эти структурно разнообразные пептиды объединяются в одно семейство благодаря тому, что все они образованы из молекул-предшественников [697], включая высоко консервативную область (домен кателина), гомологичную белку кателина из лейкоцитов свиньи. Первыми представителями этого класса были пептиды VtVac5 [286] и додекапептид [595], выделенные из бычьих нейтрофилов.

У человека только один кателицидин (hCAP18/LL-37) обнаружен в различных типах эпителиальных клеток [96]. Синтез этого пептида стимулируют инфекционно-воспалительные процессы. Кателицидины обладают широким спектром антимикробной активности, некоторые из них способны связывать и нейтрализовать эндотоксины. Активность этих пептидов и их локализация в нейтрофилах и эпителии слизистых оболочек позволяют рассматривать их как ключевые эффекторные молекулы системы врожденного иммунитета млекопитающих.

Исследовано влияние дефенсинов на отдельных представителей микробного сообщества и установлено их влияние на микробиом и, как следствие, на гомеостаз макроорганизма. Благодаря ключевой роли дефенсинов в регуляции и управлении микробиомом человека на протяжении всего развития [561], использование АМП в медицине может быть достойной альтернативой антибиотикам. При внедрении АМП в медицинскую практику важно изучить их влияние на иммунную систему человека, в частности на гуморальный и клеточный иммунитет.

### **1.1.7.3 – Влияние антимикробных пептидов на гуморальный иммунитет**

#### **1.1.7.3.1 – Адьювантная активность антимикробных пептидов**

АМП, как компоненты врожденного иммунитета, принимают участие в активации антигенспецифического иммунного ответа, способствуют межклеточной кооперации и увеличивают выработку антител. Показано, что

интраназальное введение мышам овальбумина (OVA) совместно с дефенсинами HNP1-3 увеличивает продукцию специфических IgG и IgM, но не IgA. Авторы исследования приходят к выводу, что дефенсины усиливают системный иммунный ответ, но не мукозальный [439].

При внутрибрюшинном введении дефенсинов HNP 1-3 мышам показано увеличение выработки KLH-специфичных антител IgG1, IgG2a и IgG2b через 14 дней после иммунизации [207]. Дефенсины также значительно увеличивают продукцию антител к антигену сингенной опухоли и повышают устойчивость животных к трансплантируемой опухоли [207]. Эти результаты показывают, что дефенсины действуют как мощные иммунные адъюванты, усиливая выработку антигенспецифических иммуноглобулинов.

Адьювантная активность дефенсинов используется при разработке вакцин против вирусных и бактериальных инфекций. В частности, патогенная для человека микобактерия *Mycobacteroides*, являющаяся частой причиной послеоперационных инфекционных осложнений, а также встречающаяся у больных с инфекциями мягких тканей, весьма резистентна к традиционным противомикробным препаратам. Добавление hBD-2 в качестве адьюванта к вакцине против микобактериозов увеличивает эффективность терапии [654]. Дефенсин hBD-2 усиливает антигенспецифический иммунный ответ не только против бактериальных, но и вирусных антигенов. Введение в состав вакцины дефенсина hBD-2 повышает иммуногенность вакцин против гепатита В [626], гепатита С, как в свободном [260], так и в конъюгированном с полипептидом виде [345]. hBD-2 вводится в качестве адьюванта в разрабатываемые вакцины против MERS-CoV [535, 330].

Адьювантный эффект дефенсинов человека, проявляющийся в отношении бактериальных и вирусных инфекций, позволил сформулировать концепцию «дефенсиновой вакцины» как концептуальную основу для создания вакцин [655].

Эффективность адьювантного действия дефенсинов возрастает в несколько раз при совместном введении hBD-2 и hBD-3 с нуклеотидами CpG. Внутрибрюшинная иммунизация мышей комплексами hBD-2,3/CpG повышает

гуморальный ответ на OVA по сравнению только с OVA/hBD-3 или OVA/CPG в 5 и 10 раз соответственно [141].

В сложившейся эпидемиологической ситуации исследователи разных стран используют дефенсины для создания вакцин против SARS-CoV. Разрабатываются подходы к конъюгации дефенсинов с эпитопами Т- и В-клеток в вакцинах против SARS-CoV. Показано, что связывание трех структурных полипротеинов (шипового, мембранного и нуклеокапсидного (SMN)) с hBD-3 и hBD-2 человека на N- и C-концах, соответственно, повышает иммуногенность вакцины при отсутствии аллергенного эффекта [121, 216, 550].

#### **1.1.7.3.2 – Влияние антимикробных пептидов на продукцию цитокинов и хемокинов**

Конститутивно синтезированные АМП поддерживают иммунный гомеостаз не только за счет прямого воздействия на возбудителя и его элиминации, но и за счет активации продукции цитокинов и хемокинов, привлекающих иммунокомпетентные клетки в зону инвазии возбудителя [439, 561]. Таким образом, реализуется многоуровневая защита организма от инфекции.

В комплексном исследовании влияния hBD-1, hBD-2 и hBD-3 человека на продукцию цитокинов клетками периферической крови (РВМС) была показана селективная активность дефенсинов [317]. hBD-1 увеличивает выработку IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1 (моноцитарного хемоаттрактантного белка 1, CCL2), EGF (эпидермального фактора роста) в первый день. IGFBP-3 (белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста) увеличивается в первый день и снижается через 6 дней. hBD-1 значительно снижает уровень IL-5 и не влияет на IL-1- $\beta$ , IL-16, MCP-2. hBD-2 дозозависимо стимулирует индукцию цитокинов IL-1- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, ENA-78 (CXCL5), IGFBP-3 (белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста), EGF (эпидермальный фактор роста), HGF (фактор роста гепатоцитов). Максимальная активность в отношении IL-6 и IL-10 наблюдается через 8 часов, а IL-8 - через 18 часов. hBD-3 проявляет наименьшую активность из трех дефенсинов, повышая только IGFBP-3 и незначительно MCP-1, одновременно снижая синтез IL-10 и HGF (фактора роста гепатоцитов).

Интересно, что некоторые цитокины, такие как интерлейкин 8 (IL-8) и MCP-1, активируются всеми тремя дефенсинами, тогда как синтез IL-16 не активируется ни одним из протестированных дефенсинов. Примечательно, что каждый дефенсин индуцирует уникальный набор цитокинов. Обнаружено разнонаправленное действие дефенсинов по отношению к IL-10: hBD-1 и hBD-2 активируют его синтез, а hBD-3 ингибирует [317].

В экспериментальных исследованиях влияния hBD-1 на эпителиальные клетки бронхов человека наблюдается дозозависимое увеличение IL-8 и IL-1 [151]. На кератиноцитах человека показано, что в концентрации 5–8 мкг/мл hBD-2, hBD-3 и hBD-4, но не hBD-1, оказывают стимулирующее действие, что приводит к увеличению продукции IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-3. При этом цитотоксический эффект дефенсинов проявляется в дозе 50 мкг/мл [115, 453].

hBD2 и hBD 3 при совместном введении с CpG увеличивают синтез IFN- $\alpha$  плазмоцитоидными дендритными клетками человека и индуцируют воспаление. Внутривенное введение мышам комплексов hBD3/CpG индуцирует в сыворотке крови провоспалительные цитокины, такие как IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-6, IFN- $\alpha$  и IL-10 [141].

Альфа-дефенсины 1-3 также увеличивают выработку IFN- $\gamma$  в супернатантах клеток селезенки мышей, активированных *ex vivo* KLH [375].

Интраназальная иммунизация мышей овалбумином введением человеческих альфа-дефенсинов 1-3 увеличивает выработку IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6 и IL-10 по сравнению с контрольными группами, иммунизированными овалбумином [207].

При изучении влияния альфа-дефенсинов HNP1-3 на эпителиальные клетки легких человека A249 и продукцию провоспалительных и противовоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и GM-CSF было обнаружено, что HNP1-3 обладают дозозависимой способностью индуцировать выработку IL-8 [414]. Важно отметить, что HNP-индуцированное высвобождение IL-8 наблюдается даже при очень низких дозах альфа-дефенсинов - 3 мкг/мл [414].

АМП человека кателицидин LL37 индуцирует выработку цитокинов IL-6, IL-8 и IL-10, а также хемокинов CC-хемокинового лиганда 2 (CCL2) [695] и может действовать синергично с IL-1 $\beta$ , увеличивая выработку цитокинов IL-6, IL-8 и IL-10, а также хемокина CCL2. Кателицидин LL37 также увеличивает синтез и высвобождение альфа-дефенсинов, образуя петлю, усиливающую воспалительный процесс [409]. Сходным образом, hBD-1 и HNP-1, воздействуя на дендритные клетки, также усиливают собственную экспрессию [324].

В ряде случаев индукция провоспалительных цитокинов может быть нежелательной, в связи с чем создаются синтетические АМП, сохраняющие антибактериальные свойства, но обладающие противовоспалительной активностью [108]. На основе анализа структуры АМП из современных баз данных были синтезированы модифицированные триптофансодержащие амфипатические спиральные ундекапептиды (WALK11), проявляющие противомикробную активность со значительным противовоспалительным потенциалом [108, 537]. На клетках мышинной макрофагальной линии RAW264.7 пептид WALK11 ингибирует экспрессию медиаторов воспаления IL-1 $\beta$ , IL-6, INF- $\beta$  и TNF- $\alpha$ , сохраняя при этом антибактериальную активность [108].

#### **1.1.7.3.3 – Действие антимикробных пептидов на систему комплемента**

Альфа-дефенсин HNP-1 на ранней стадии ингибирует классический и лектиновый пути активации системы комплемента, образуя комплексы с C1q и MBL, тем самым защищая организм от тканевых повреждений [327].

АМП беспозвоночных также могут влиять на систему комплемента человека, причем в зависимости от концентрации эффект является разнонаправленным. В частности, пептид ареницин-1 морской полихеты *Arenicola marina* в относительно низких концентрациях (1–40 мкг/мл) стимулирует активацию комплемента и лизис эритроцитов-мишеней, а в более высоких концентрациях (80–160 мкг/мл) ареницин действует как ингибитор комплемента. Авторы данной работы обсуждают возможность взаимодействия АМП с белками комплемента C1q и C3 и регуляции их функциональной активности [460]. Изучено влияние структурных изменений ареницинов на их взаимодействие с

белками комплемента и биологическую активность [111]. Производное ареницина-1 без дисульфидной связи (Ag-1-(C/A)), несмотря на отсутствие этой связи, сохраняет все важные функциональные активности, а также проявляет меньшую токсичность по сравнению с обнаруженными ранее природными аналогами [92, 217, 426].

В другом исследовании тахиплезин-1 АМП мечехвоста *Tachypleus tridentatus* образует комплекс с белком комплемента C1q человека и запускает классический путь комплемента. Авторы использовали это свойство тахиплезина-1 для изучения возможности тахиплезина-1 связываться с поверхностью клеток карциномы простаты человека TSU и привлекать белки системы комплемента для разрушения карциномы. Установлено, что цитотоксическое действие тахиплезина-1 и C1q на клетки карциномы предстательной железы человека TSU реализуется только при сохранении пространственной структуры пептида, поскольку восстановление и алкилирование дисульфидных связей тахиплезина-1 приводит к слабому связыванию с C1q и уменьшению цитотоксической активности [608].

Очевидно, что АМП можно рассматривать как перспективные соединения для создания новых терапевтических средств, регулирующих работу системы комплемента как с целью разрушения инфицированных и трансформированных клеток, так и с целью предотвращения активации комплемента.

#### **1.1.7.4 – Влияние антимикробных пептидов на иммунокомпетентные клетки**

Наряду с прямой инактивацией бактерий, грибов и вирусов АМП оказывают различное действие на клетки организма хозяина. Важным свойством АМП является взаимодействие АМП с иммунокомпетентными клетками организма человека и животных с их дальнейшей активацией для формирования адекватного иммунного ответа на возбудителя [151]. В последнее время стало очевидным, что основная функция АМП заключается не только в непосредственном уничтожении возбудителя на начальной стадии, но и в привлечении фагоцитирующих и цитотоксических клеток для уничтожения убитых бактерий на более поздней

стадии, в запуске воспалительных реакций при неэффективности начальной стадии и индуцировании противовоспалительных реакций для купирования, завершения процесса воспаления и восстановления поврежденного эпителия [301, 411].

Привлечение иммунокомпетентных клеток к зоне воспаления осуществляется за счет экспрессии хемокинов и их рецепторов [623]. Запуск АМП провоспалительного иммунного ответа осуществляется как при участии описанных выше гуморальных факторов, так и при кооперативном взаимодействии иммунокомпетентных клеток [440, 685].

АМП обладают хемотаксической активностью в отношении нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток [440, 586] и вызывают дегрануляцию тучных клеток [321]. Дефенсины привлекают в область воспаления нейтрофилы, а также клетки, экспрессирующие рецептор хемокинов человека CCR6. Установлено, что альфа-дефенсины человека вызывают хемотаксис моноцитов *in vitro*. HNP-1 демонстрирует наиболее значительную активность, HNP-2 менее активен, а HNP-3 не проявляет хемотаксического эффекта [440]. Эти АМП также вызывают хемотаксис незрелых дендритных клеток человека и наивных Т-лимфоцитов. HBD1-3 также индуцируют хемотаксис Т-клеток и незрелых дендритных клеток путем связывания с хемокиновым рецептором CCR6 или CCR2 [316]. Кроме того, бета-дефенсины стимулируют миграцию кератиноцитов [115] и эндотелиальных клеток пуповины человека [138].

Хемотаксис, индуцированный бета-дефенсином, чувствителен к коклюшному токсину и ингибируется антителами к CCR6 [143]. CCR6 преимущественно экспрессируется незрелыми моноцитарными дендритными клетками (ДК) и CD8<sup>+</sup> Т-клетками [482]. В результате кооперативного взаимодействия происходит созревание ДК из моноцитов. ДК активируют CD4<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, а также В-клетки. В этот момент дефенсины индуцируют высвобождение провоспалительных цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-6 и IL-10 из моноцитов [270, 397, 410]. Однако также было показано, что бета-дефенсины

могут рекрутировать CD4<sup>+</sup> Т-клетки и дендритные клетки через другой CCR6-независимый, еще не идентифицированный рецептор [206].

Кроме того, альфа-дефенсины индуцируют экспрессию на CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитах костимулирующих молекул CD28, CD152\CTLA 4 и CD11a\LFA1 [227]. Под действием бета-дефенсинов моноциты и Th17 вырабатывают цитокины IL-17, IL-22, TNF- $\alpha$ , которые могут усиливать воспаление, ограничивая распространение инфекционного процесса [196].

Исследование механизма эффекторного действия hBD-3 на Т-клетки показало, что hBD-3 индуцирует фосфорилирование тирозина STAT1 и подавляет фосфорилирование тирозина STAT1 в случае воздействия IFN- $\gamma$  [323]. Сигнальные пути, инициируемые hBD-3, могут приводить к усилению различных эффекторных функций Т-клеток во время активации рецептора Т-клеток, например, к увеличению уровней IL-2 и IL-10. hBD-3 одновременно инициирует сигнальный каскад тирозинкиназы и тирозинфосфатазы, которые могут одновременно активировать Т-клетки и ингибировать их ответ на другие иммунные медиаторы [323]. Иммуносупрессирующая роль hBD-3 подтверждена *in vitro* на моноцитах периферической крови человека и *in vivo* на макрофагах мышей hBD3 [318]. Мышиный ортолог Defb14 (но не hBD2) эффективно ингибирует производство индуцированного LPS уровень TNF- $\alpha$  и IL-6 в сыворотке [318].

HBD-2 и hBD-3 могут регулировать собственную продукцию, а также развитие и функцию клеток Treg и Teff [177]. Анализ экспрессии специфического маркера регуляторных Т-клеток (Tregs) FoxP3 при инкубации Т-клеток с hBD-2 и hBD-3 показал увеличение CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Treg через 18 часов и снижение Treg через 42 часа *in vitro* из-за потери экспрессии FoxP3 [177]. hBD-2 и hBD-3 контролируют поляризацию CD4<sup>+</sup> Т-клеток человека и их способность индуцировать дифференцировку эффекторных Т-клеток в клетки ROR $\gamma$ t + Tbet + (Th17/Th1) и дифференцировку Treg [177]. Эта пластичность фенотипа Т-клеток также позволяет им превращаться из Treg в фенотип эффекторных Т-клеток, такой как Th1/17, после 18 часов культивирования [177]. Через 42 часа

культивирования обработка hBD-2 и hBD-3 индуцирует дифференцировку клеток Teff и Treg в сторону Th17-подобного фенотипа [177]. По сравнению с hBD-2, hBD-3 вызывает более выраженный эффект повышения уровня ROR $\gamma$ t в CD4+ T-клетках. Эта повышенная экспрессия может быть ответственна за индукцию секреции IL-17A. Также было обнаружено, что hBD-3, но не hBD-2, способен индуцировать более высокий уровень секреции IL-17A [177]. Кроме того, обработка hBD-3 индуцирует повышенную экспрессию IL-6, который способен направлять дифференцировку наивных T-клеток в направлении клеток Th17, продуцирующих IL-17 [177]. Эти данные указывают на то, что hBD-2 может ингибировать способность клеток Treg и вызывать подавление активности клеток Teff. Интересно, что совместное культивирование с hBD-2 также увеличивает устойчивость клеток Teff к иммунорегуляции Treg *in vitro*.

Использование генетического анализа на микрочипах идентифицировало хемокиновый лиганд СС-мотив 1 (CCL1) как потенциальный ген, реагирующий на эффекты hBD-2. Оказалось, что блокада CCL1 подавляет супрессивную функцию Treg. Влияние hBD-2 и hBD-3 на Treg и Teff демонстрирует пластичность фенотипов T-клеток и опосредованное влияние дефенсинов на адаптивный иммунитет [177].

Противоположные данные получены при воздействии бета-дефенсина-2 на T-клетки периферической крови человека, в которых наблюдается стимуляция IFN- $\gamma$  и IL-10 и подавление продукции IL-17 [333]. Возможно, объяснением может служить пластичность T-лимфоцитов и их зависимость от микроокружения и продолжительности воздействия бета-дефенсинов [333].

Альфа-дефенсины человека являются хемоаттрактантами для макрофагов, T-лимфоцитов и тучных клеток [176]. При анализе перекрестной регуляции между альфа- и бета-дефенсинами человека было обнаружено, что рецептор альфа-дефенсина подвергается перекрестной десенсибилизации бета-дефенсинами. Напротив, альфа-дефенсины десенсибилизируют опосредованную бета-дефенсинами миграцию иммунных клеток, что указывает на совместные рецепторы для обоих семейств дефенсинов [176].

В то время как альфа- и бета-дефенсины стимулируют пролиферацию Т-клеток, другой АМП, человеческий кателицидин LL-37, проявляет хемотаксическую активность в отношении нейтрофилов, моноцитов и CD4+ Т-лимфоцитов [411] и индуцирует апоптоз в регуляторных Т-клетках [623].

АМП могут ограничить воспаление. Например, в зависимости от микроокружения альфа- дефенсины могут блокировать секрецию IL-1 $\beta$  моноцитами, активированными липополисахаридом [86].

Влияние дефенсинов на моноциты человека зависит от зрелости иммунной системы. При исследовании влияния hBD-1 на неонатальные моноциты пуповины было обнаружено, что hBD-1 индуцирует GM-CSF и IL-4, но не воспалительных цитокинов. При этом hBD-1 способствует дифференцировке неонатальных моноцитов из пуповинной крови в незрелые дендритные клетки (ДК) и затем окончательному созреванию ДК. Кроме того, hBD-1 ингибирует апоптоз посредством CCR6 в дендритных клетках, полученных из неонатальных моноцитов. Что касается неонатальных CD4+ Т-клеток, hBD-1 способствует пролиферации и активации, но не их созреванию [350].

hBD2 и hBD3 активируют плазматоидные дендритные клетки, увеличивая внутриклеточное поглощение CpG. В этом случае CpG и ДНК хозяина образуют агрегаты с hBD2 и hBD3 [141].

Влияние дефенсинов на В-клетки опосредованное и реализуется через взаимодействие В- и Т-клеток. Это увеличивает системный ответ, синтез IgG, но не IgA, благодаря помощи цитокинов Th1 и Th2 [439].

Проявление многообразных эффектов АМП зависит от их концентрации в крови. В пико- или наномолярных концентрациях они могут связываться с определенными рецепторами на поверхности клеток и вызывать, например, хемотаксис иммунокомпетентных клеток. В микромолярных концентрациях, наблюдающихся при инфекционном процессе и воспалении, АМП проявляют антимикробную активность и могут оказывать токсическое действие на собственные клетки организма хозяина. В частности, концентрация дефенсинов имеет решающее значение для реализации их активности. hBD-3 в концентрации

5 мкМ и выше может вызывать повреждение мембран моноцитов (но не В- и Т-клеток) за счет взаимодействия с отрицательно заряженными фосфолипидами [442]. Аналогичным образом, концентрация HNP, высвобождаемых в микроокружение при активации нейтрофилов во время воспаления, оказывает различное влияние на продукцию цитокинов в активированных моноцитах. Концентрации HNP от 1 до 10 нМ могут усиливать экспрессию фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) и интерлейкина-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), тогда как концентрации от 10 до 100 мкМ цитотоксичны для моноцитов [86]. Выявленная избирательность активности дефенсинов человека свидетельствует о наличии тонкого механизма регуляции иммунного гомеостаза антимикробными пептидами [317].

АМП каталепидин LL-37 привлекает моноциты, нейтрофилы и Т-лимфоциты к очагу воспаления, взаимодействуя с поверхностным рецептором FPRL1 (формилпептидный рецептор-подобный 1), представленным на этих клетках [411].

Широкий спектр действия дефенсинов на иммунокомпетентные клетки, их избирательность и способность смещать провоспалительную реакцию на противовоспалительную позволили предположить, что иммуномодулирующая активность дефенсинов не менее важна, чем антибактериальная активность, и служит ключевым фактором связывания врожденного и адаптивного иммунного ответа [207, 232, 554].

При сравнении цитотоксических и антибактериальных свойств альфа-дефенсинов и бета-дефенсинов было установлено, что бета-дефенсины могут быть более подходящими антимикробными средствами для клинического применения, чем альфа-дефенсины, из-за менее выраженного цитотоксического действия [239], при этом наиболее активными среди бета-дефенсинов можно считать hBD-3 [578].

Свойства других иммунных клеток также могут быть изменены под действием АМП, которые могут инициировать дегрануляцию тучных клеток, участвуя в развитии воспалительных и аллергических реакций. Тучные клетки – это высокоспециализированные клетки, играющие ключевую роль в развитии

воспаления [253]. Когда тучные клетки активируются, высвобождается широкий спектр различных молекул, которые действуют как медиаторы воспалительных реакций [253]. Было показано, что как альфа-, так и бета-дефенсины человека вызывают дегрануляцию тучных клеток [250, 253, 710]. Человеческий кателицидин LL-37 также проявляет подобный тип активности [253]. LL-37 индуцирует высвобождение гистамина тучными клетками, а также секрецию IL-1 $\beta$ , IL-4 и IL-5 [321]. Таким образом, АМП нейтрофилов и барьерного эпителия могут участвовать в развитии воспаления, хемотаксиса и дегрануляции тучных клеток.

АМП обладают широким спектром действия не только на иммуномодулирующие клетки. АМП являются медиаторами эндокрино-иммунных взаимодействий и обладают кортикостатической активностью [253]. Было показано, что бета-дефенсины экспрессируются в эндокринных клетках поджелудочной железы человека и мыши, ослабляют аутоиммунный ответ и уменьшают последующее развитие диабета за счет увеличения пролиферации бета -клеток поджелудочной железы и количества Treg-клеток [295].

Доказано, что изменения антимикробных пептидов при туберкулезе связаны с тяжестью заболевания, клинической картиной, специфической терапией и уровнем иммуноэндокринных медиаторов [253, 255]. У впервые диагностированных пациентов с туберкулезом легких (ЛТБ) или плевры (ПЛТБ) было обнаружено, что у пациентов с тяжелым ЛТБ наблюдалось более высокое циркулирующее количество hBD-3, статистически отличающееся от контрольных. В то же время концентрации LL-37 оказались в пределах нормы [255]. У пациентов с ПЛТБ выявлено снижение уровня hBD-2 и увеличение количества hBD-3 и LL-37 в плевральной жидкости и плазме. Учитывая иммуно-эндокринную дисрегуляцию при туберкулезе, выявлены положительные корреляции между уровнями кортизола, IL-6 и бета-дефенсина-3 в плазме нелеченых тяжелых больных и их значениями дегидроэпиандростерона и LL-37. Различный профиль пациентов с ПЛТБ, снижение hBD-2 наряду с повышенными уровнями hBD-3 и LL-37, предполагает различную роль этих hBD в защите

хозяина [255]. Обнаруженная корреляция поднимает вопрос о причинно-следственной связи, ответ на который могут дать дальнейшие исследования, направленные на доказательство того, что дегидроэпиандростерон способствует выработке hBD-2 и hBD-3 в инфицированных клетках, что коррелирует со снижением нагрузки микобактериями туберкулеза [589].

Альфа-дефенсины ингибируют индуцированную АКТГ выработку кортикостерона клетками коры надпочечников крысы *in vitro* [373]. Эти дефенсины также ингибируют АКТГ-индуцированный синтез альдостерона клетками надпочечников крысы, но не влияют на стимулируемую ангиотензином II выработку альдостерона [373], хотя они ингибируют синтез альдостерона, индуцированный  $\alpha$ -меланоцитстимулирующим гормоном [585]. Установлено, что введение дефенсина RatNP-3 непосредственно перед стрессорным воздействием снижает стрессорное повышение концентрации кортикостерона в крови и нормализует стрессорные изменения количества нейтрофильных гранулоцитов в крови крыс [80, 690].

При исследовании уровня дефенсинов и гормонов у спортсменов, испытывающих длительную физическую активность, не было выявлено корреляции между дефенсинами человека (HNP-1 и hBD-1) и уровнями кортизола и тестостерона [307]. Наблюдения в течение 12 месяцев показали 29%-ное увеличение уровня HNP-1 через 3 месяцев и 10-кратное увеличение hBD-1 через 6 месяцев, которое сохранялось на протяжении всего периода наблюдения [307]. В то же время уровни кортизола и тестостерона достигли пика через 6 месяцев и вернулись к исходному уровню через 12 месяцев [307].

Кроме того, бета-дефенсины экспрессируются в разных сегментах семенника и выполняют основную функцию при созревании сперматозоидов [542]. Было обнаружено, что мутация бета-дефенсина в локусе *DEFB126* снижает подвижность сперматозоидов и фертильность у мужчин [81]. Мыши с делецией двух и более генов бета-дефенсина бесплодны [508]. Альфа-дефенсин HNP-1 восстанавливает способность к пролиферации шванновских клеток, влияя на регенерацию поврежденных периферических нервов, ингибируя старение клеток

и апоптоз [553]. Влияние дефенсинов на слизистую оболочку кишечника имеет решающее значение для поддержания гомеостаза; отсутствие экспрессии дефенсина способствует увеличению количества патогенных бактерий и наблюдается при воспалительных заболеваниях кишечника [627]. В то же время повышенное количество дефенсинов может свидетельствовать об интенсивности и напряженности иммунного ответа при повышении содержания условно-патогенных микроорганизмов.

В настоящее время появляется все больше данных об участии АМП во взаимодействии систем врожденного и приобретенного иммунитета. Влияние АМП на разные типы иммунокомпетентных клеток может быть прямым или опосредованным. АМП оказывают влияние на функциональную активность дендритных клеток, которые, в свою очередь, модулируют активность лимфоцитов. АМП также продуцируются иммунокомпетентными клетками, которые могут секретировать эти молекулы во время развития иммунного ответа. В результате реализуется особая иммуномодулирующая активность АМП [685].

#### **1.1.7.5 – Аллергенные свойства антимикробных пептидов**

АМП, которые возникли для защиты хозяина от патогенов, выполняют в многоклеточных организмах ряд других функций, таких как влияние на хемотаксис, дифференцировку клеток, синтез хемокинов, цитокинов, кортикостероидов, созревание половых клеток и регенерацию тканей, включая периферические нервы [553]. Кроме того, АМП также участвуют в регуляции воспалительных процессов [177, 333]. Анализируя действие АМП на человека, следует отметить, что некоторые АМП обладают аллергенными свойствами. Это не следует упускать из виду, учитывая перспективы их медицинского использования.

Показано, что некоторые растительные АМП, относящиеся к белкам патогенеза (PR), индуцированные абиотическими и биотическими стрессорными факторами и обнаруженные в корнях, листьях, стеблях, пыльце и плодах растений, могут вызывать у человека аллергические реакции вплоть до анафилактического шока с летальным исходом [354].

Выявлено, что из 19 классов PR-белков аллергенностью обладают 2, 3, 4, 5, 8, 10 и 14 классы [262]. Более того, между некоторыми группами была обнаружена структурная гомология, что объясняет перекрестную реактивность [98, 122, 262, 454]. Использование современных подходов к определению структурной гомологии, в том числе молекулярного докинга, выявило, что все 19 классов известных растительных PR-белков, включая АМП, обладают потенциальной аллергенной способностью [123, 689]. В то же время экспрессия эндогенных АМП при одной и той же аллергопатологии может существенно различаться. Кожа, слизистая оболочка глаз, носоглотки, пищеварительная и репродуктивная системы, а также легкие выполняют барьерные функции, а АМП являются первой линией защиты от патогенов [301].

Аллергический ринит (АР) проявляется повышенным выделением слизи, отеком слизистой оболочки и затруднением дыхания [237]. Анализ экспрессии АМП в миндалинах пациентов с АР показал значительно более низкие уровни hBD2 по сравнению с пациентами с неаллергическим ринитом [237]. Данные коррелируют с результатами сравнения уровня бета-дефенсина в носовой жидкости детей с АР по сравнению со здоровыми [237]. Установлено, что у детей с АР уровень бета-дефенсина 2 в назальной жидкости снижен по сравнению с контрольной группой, и уровень бета-дефенсина 2 отрицательно коррелирует с тяжестью заболевания: 173,8 пг/мл (межквартильный диапазон: 54,8–205,9 пг/мл) в группе аллергического ринита и 241,6 пг/мл (163,5–315,2 пг/мл) в контрольной группе [252]. Уровни кателицидина LL-37 в назальной жидкости у детей с АР также оказались ниже, чем в группе здоровых (медиана 2,3 нг/мл (минимум-максимум 2,1–3,2 нг/мл) против 2,6 нг/мл (2,1–5,4 нг/мл)). Тяжесть проявлений АР отрицательно коррелирует с уровнем LL-37 в назальной жидкости. Все эти данные подчеркивают роль АМП в патогенезе АР [145].

Интересно, что по данным протеомного исследования другие пептиды и белки значительно меньше экспрессируются в назальном секрете у больных АР по сравнению со здоровыми людьми в сезон обострения АР [653]. Вне сезона цветения и пыльцы у здоровых людей наблюдается сниженный уровень пептидов

и белков в назальном секрете, причем у больных АР такого снижения не обнаруживается, вне сезона их протеом/пептидом превосходит баланс здоровых людей. Эти результаты свидетельствуют об отсутствии пластичности реакции слизистой оболочки носа у пациентов с АР [653]. При неаллергическом риносинусите воздействие грибковых аллергенов *Aspergillus* и *Alternaria* повышает экспрессию кателицидина LL-37 в тканях носа у больных хроническим синуситом в 4- и 6 раз (соответственно) [276], что указывает на различия в патогенезе и механизмах аллергических и неаллергических синуситов.

Очень часто АР сопровождается аллергическим конъюнктивитом. При исследовании экспрессии АМП в миндалинах больных аллергическим риноконъюнктивитом было показано, что уровень hBD1–3 у больных аллергическим риноконъюнктивитом значительно снижен по сравнению со здоровыми пациентами [149]. Эпителиальные клетки роговицы человека конститутивно продуцируют антимикробные пептиды кателицидин LL-37 и бета-дефенсины [434]; их экспрессия может увеличиваться в 3,75–4,9 раза *in vitro* в ответ на инактивированные нагреванием *Candida albicans* с пиковыми значениями после 4 часов инкубации [322].

Снижение уровня АМП у пациентов с аллергическим риноконъюнктивитом может быть связано с воздействием цитокинов Th2, которые ингибируют выработку АМП [149]; кроме того, возможно наличие генетических полиморфизмов генов hBD, а также влияние других факторов на экспрессию АМП [140]. Показано, что тяжесть проявлений аллергических заболеваний полости рта (плоский лишай, рецидивирующий афтозный стоматит и др.) во многом связана с генетическим полиморфизмом генов hBD-1 [161, 261]. Полиморфизм гена hBD-1 также связан с предрасположенностью к легочным инфекционным заболеваниям, включая астму [126] и хроническую обструктивную болезнь легких (ХОБЛ) [285].

При анализе основных вариантов полиморфизма генов hBD-1 rs1047031 (C/T), rs1799946 (C/T), rs2738047 (C/T) и rs11362 (C/T) путем генотипирования 575 образцов крови мужчин и женщин, курильщиков сигарет (288)/некурящих

(287), было обнаружено, что генотипы СТ и СТ+ТТ rs1799946 показали 5-кратное увеличение корреляции среди курильщиков по сравнению с женщинами из контрольной группы, но с защитным действием генотипа ТТ у некурящих женщин [319]. В связи с этим при анализе уровня экспрессии hBD при астме необходимо учитывать возможность генетического полиморфизма генов АМП, который может усугублять течение астмы [544]. Астма также связана с полиморфизмом не только гена hBD-1, но и гена hBD-2. Генетические изменения локуса гена hBD-2 или отсутствие DEFB4A тесно связаны с распространенностью астмы и аллергических заболеваний у детей. Более того, раннее введение hBD-2 животным на модели астмы предотвращает развитие астмы, таким образом, hBD-2 может играть важную роль в предотвращении тяжелых форм астмы [331]. Эти результаты подтверждаются другим исследованием роли hBD-2 в развитии астмы на модели респираторного заболевания, вызывающего аллергические реакции на клещей домашней пыли, и на модели нечувствительного к стероидам овальбумина [334]. В обеих моделях терапевтическое интраназальное применение hBD2 значительно уменьшает приток воспалительных клеток в жидкость бронхоальвеолярного лаважа и уменьшает аллергическое воспаление верхних дыхательных путей у мышей. Полученные результаты могут иметь большое практическое значение для лечения аллергической и особенно стероидорезистентной астмы [334].

Конститутивная экспрессия hBD-1 в эпителиальных клетках дыхательных путей способствует защите от бактериальной и вирусной инфекции, тогда как hBD-2, hBD-3 и hBD-4 индуцируются различными стимулами и обнаруживаются при бронхиальной астме (БА) [483, 574]. Высокие концентрации альфа- и бета-дефенсинов оказывают негативное влияние на легочные эпителиоциты, вызывая миграцию нейтрофилов, индуцируя гиперсекрецию слизи, способствуя дегрануляции тучных клеток и повышая проницаемость сосудов [253, 467].

Дегрануляция тучных клеток под действием альфа- и бета-дефенсинов с высвобождением эйкозаноидов и продукцией IL-31 увеличивает проницаемость сосудов, а при атопическом дерматите (АД) вызывает зуд и поражение кожи.

Избыток альфа- и бета -дефенсинов оказывает негативное влияние на БА [114]. С другой стороны, при АД также отсутствует продукция альфа- и бета -дефенсинов, что способствует колонизации микробными организмами, главным образом *Staphylococcus aureus* и *Herpes simplex viruses* [197]. Механизм защитного действия АМП включает усиление барьерных функций плотного соединения кератиноцитов за счет активации экспрессии поверхностных рецепторов, блокирования активации TLR4 дендритных клеток и контактной аллергической сенсибилизации [312].

Таким образом, оценивая вклад АМП в аллергическое воспаление, можно заключить, что избыточное количество АМП может спровоцировать серьезные патологические изменения [114]. При этом недостаток продукции сопровождается инфекционными осложнениями на коже и слизистых оболочках [197].

Широкий спектр антимикробной активности АМП вдохновляет исследователей на поиск новых активных пептидов из биологического материала [192, 491], а также служит основой для создания новых синтетических соединений [664]. На сегодняшний день информация об АМП представлена в многочисленных базах данных, описывающих структурные, функциональные, аллергенные и токсикологические свойства этих пептидных факторов врожденного иммунитета [202, 341, 664, 563].

Цитостатическая активность АМП по отношению к нормальным клеткам, а также активность протеаз в кровотоке и взаимодействие с белками плазмы хозяина являются серьезными препятствиями для медицинского использования АМП. В связи с этим актуальными становятся задачи поиска соединений, избирательно действующих на мишень, подбора доз и способа применения.

АМП присутствуют во всех организмах, от одноклеточных до многоклеточных, и обладают широким спектром действия. Если применительно к одноклеточным организмам, продуцирующим АМП, можно говорить об антибактериальной и противовирусной функциях как об основных, то при усложнении организмов антимикробные пептиды проявляют плейотропное действие, не ограничивающееся антимикробной функцией. При анализе действия

АМП на иммунокомпетентные клетки выявлено их влияние на все звенья иммунной системы, на гуморальный и клеточный иммунитет. АМП оказывают прямое действие на нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки, Т-лимфоциты и тучные клетки, инициируя врожденный иммунитет. АМП действуют на В-лимфоциты опосредованно, усиливая индукцию антигенспецифического иммунитета, что в конечном итоге приводит к активации адаптивного иммунитета.

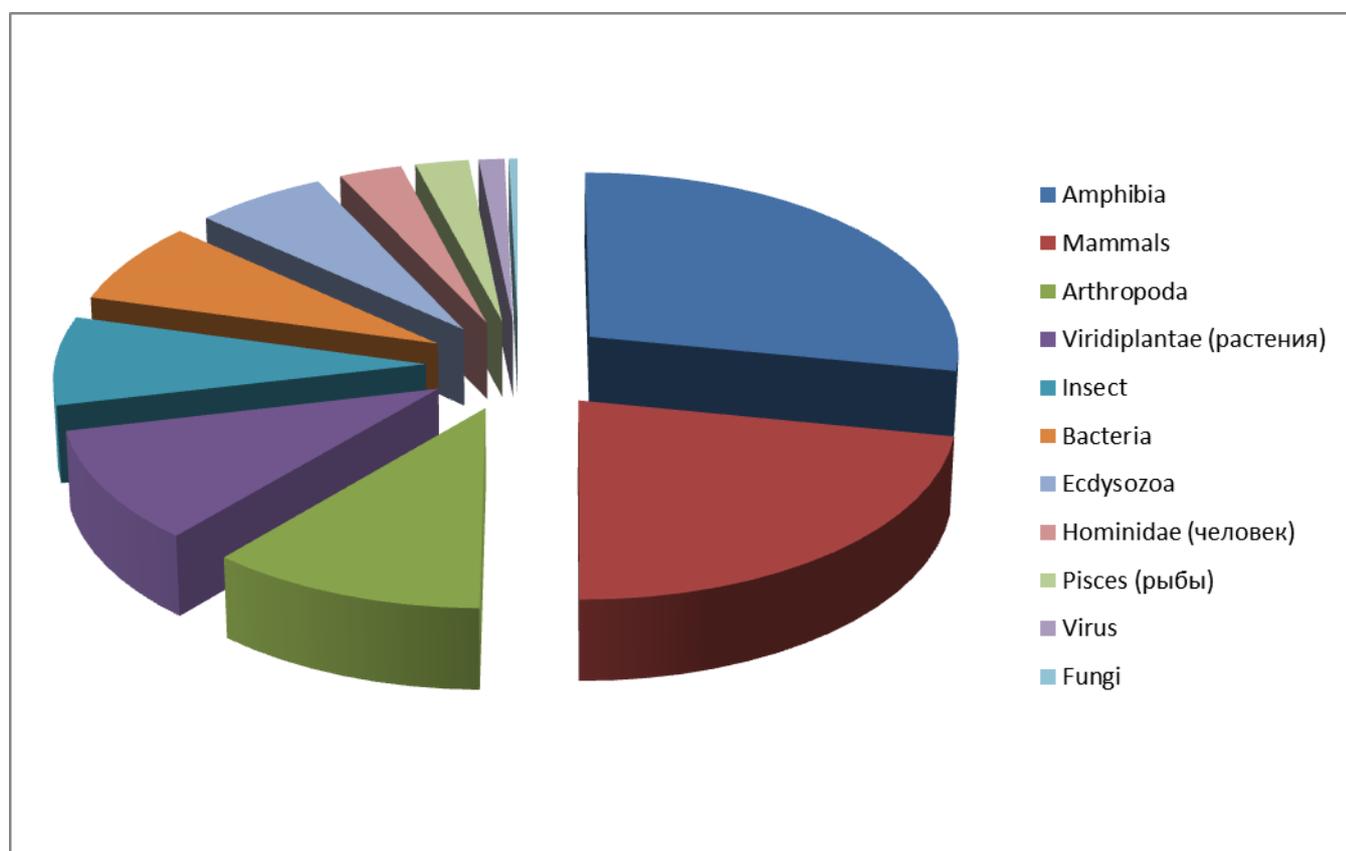
Таким образом, иммуномодулирующие функции АМП включают влияние на клетки ближайшего микроокружения, рекрутирование и активацию других клеток, поддержку ответа на патогенные микроорганизмы и завершение воспалительного процесса, оказывая тем самым системный эффект.

Исследования АМР имеют фундаментальное и прикладное значение. С одной стороны, АМП являются моделью для изучения иммунитета и защиты различных организмов от инфекций, анализа эволюции способов защиты, а также этиологии аутоиммунных и аллергических заболеваний. С другой стороны, большое количество молекул, обладающих антимикробными свойствами, может стать основой для разработки лекарственных препаратов, что особенно важно в современных условиях возникновения резистентности микроорганизмов к антибиотикам. В настоящее время проводятся клинические испытания рекомбинантных и синтетических АМП, а также АМП, полученных из природных источников (*рисунки 1.6*) [393].

Таким образом, первоначально обнаруженная антимикробная активность АМП у человека является не единственной, и, возможно, их иммуномодулирующая активность вносит равный вклад в проявление эффекторных функций.

Для успешного использования АМП в медицинской практике необходимо детальное изучение их иммуномодулирующей активности с учетом плеiotропности, степени зрелости иммунной системы и микроокружения. Это позволит предотвратить осложнения и повысить эффективность терапии,

поскольку в одних случаях АМП могут подавлять воспаление, а в других — усугублять реакцию организма и наносить ущерб.

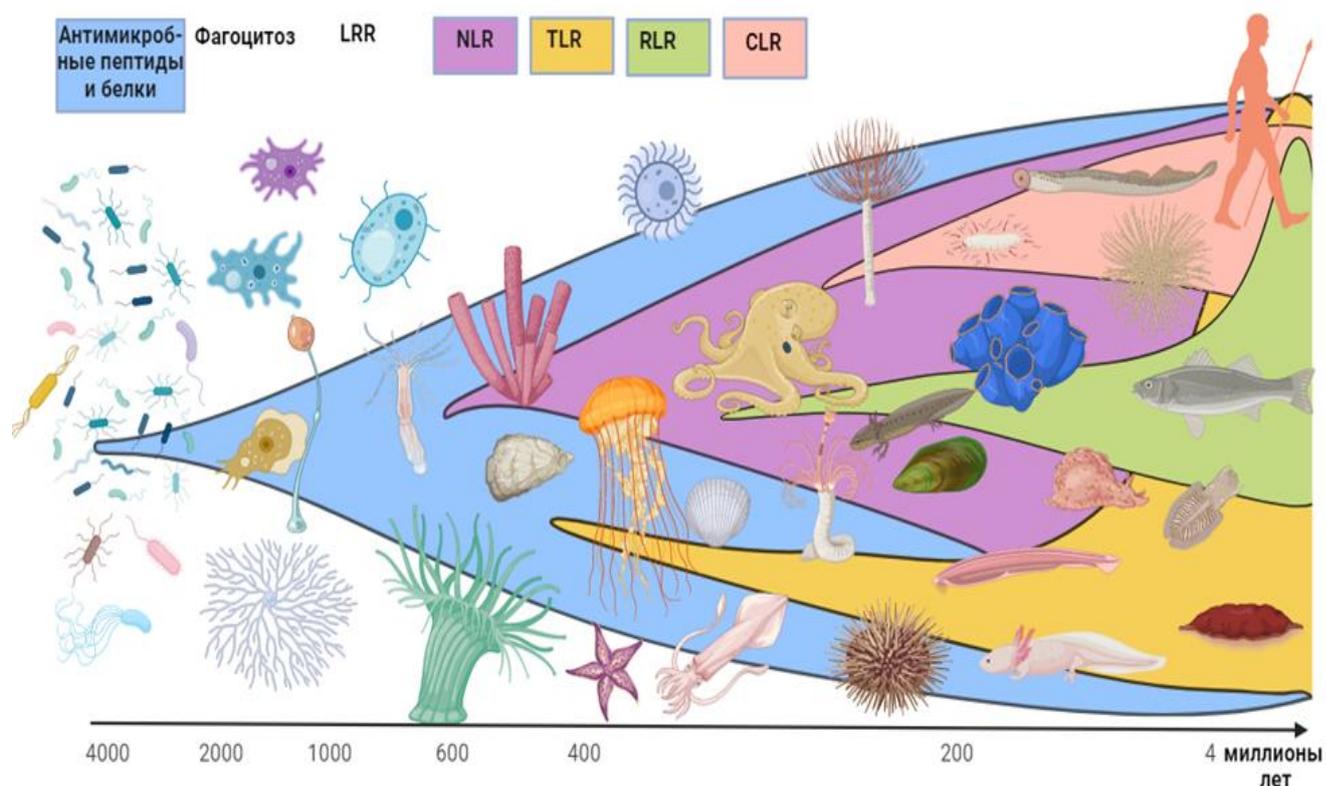


**Рисунок 1.6 – Природные источники антимикробных пептидов**

Таким образом, АМП, присутствующие у первых организмов, появившихся в ходе эволюции, сохранили свои защитные функции и у многоклеточных организмов, обеспечивая первую линию защиты. Сохранение гомеостаза древних многоклеточных организмов поддерживается физическими барьерами, эпителием, гуморальными и клеточными факторами врожденного иммунитета. С усложнением структуры многоклеточных организмов увеличивается разнообразие способов защиты от патогенов (*рисунок 1.7*).

Конвергентные и дивергентные процессы в эволюции механизмов защиты от патогенов, включают не только изменение рецепторов распознавания образов патогенности, специфических для разных видов патогенов, но и определение метаболических нарушений, которые могут быть вызваны как инвазией

патогенов, так и разрушением собственных тканей. Очевидно, что способ определения метаболитов, опосредуемых инвазией патогенов, является универсальным и потенциально может способствовать защите организма от инфекций, не определяемых TLRs и NLRs.



**Рисунок 1.7 – Появление механизмов врожденного иммунитета от первых микроорганизмов до человека**

Защитные белки и антимикробные пептиды представлены во всех организмах, они являются наиболее древним способом поддержания гомеостаза и могут служить основой для определения эволюции развития механизмов защиты многоклеточных организмов от микроорганизмов, а также для разработки новых лекарственных препаратов для терапии и профилактики инфекционных заболеваний.

## 1.2– Биорегуляторы бактериального происхождения

Симбиотические организмы, населяющие кожные покровы и слизистые, составляют важную часть сообщества, формирующего «метаорганизм» и выполняют множество функций, таких как вытеснение патогенов из ниш их

обитания, передача сигналов организму хозяина о гомеостатических или нарушенных условиях окружающей среды, регулируя таким образом работу всех систем организма с момента рождения [413, 616, 618]. Биорегуляторы бактериального происхождения вносят свой вклад в физиологию и гомеостаз хозяина, а также в производство, модуляцию и расщепление широкого спектра биоактивных молекул, оказывающих множественное воздействие на организм хозяина [413, 450].

В стерильных условиях в экспериментальной модели животные не способны сформировать адекватную систему защиты от патогенов [452], нарушаются процессы метаболизма, приводящие к ожирению [404, 225], онкологическим заболеваниям [405, 461], формированию фенотипа аутизма [448].

Установление определяющего значения микроорганизмов в формировании и поддержании гомеостаза человека послужило основанием для формирования понятия «суперорганизм» [289, 394], учитывая эволюционно сформировавшиеся связи между макроорганизмом и населяющими его микроорганизмами; геном микробиоты рассматривается как третий основной геном у человека наряду с ядерным и митохондриальным [162] и превышает по объему геном хозяина в 10 раз [100].

Недавние достижения в технологии секвенирования нового поколения подтвердили ключевую роль микробиоты легких и кишечника в патогенезе аллергической астмы и других заболеваний дыхательных путей [296]. Выявлены бактериальные сообщества, характерные для больных бронхиальной астмой; бактерии *Fusobacterium*, *Lachnospira*, *Veillonella* и *Rothia* чаще встречаются у больных бронхиальной астмой, чем у здоровых людей [231].

В норме микроорганизмы мигрируют в легкие путем микроаспирации, разносятся клетками мерцательного эпителия и удаляются путем фагоцитоза альвеолярными макрофагами, которые презентуют процессированные бактериальные антигены клеткам иммунной системы и посредством цитокинов и медиаторов поддерживают баланс и стабильность микроэкологии легких. Микробиом способствует формированию и созреванию иммунной системы и

формированию гомеостатических связей, поддерживая врожденный и адаптивный иммунитет [704]. В свою очередь, организм хозяина воздействует на микроорганизмы, регулируя выработку иммуноглобулина IgA, противомикробные компоненты, такие как дефенсины, и обеспечивая толерантность, способствуя тем самым сохранению комменсальной микрофлоры на поверхности слизистой оболочки [82, 367].

В случае нарушения функций клеток легочного эпителия, например, повреждения ресничек слизистой оболочки или избыточного количества выделяемой слизи, наблюдаемых при аллергических процессах, происходит колонизация микроорганизмами, что может привести к инфекционным патологиям [103]. Системное воспаление или угнетение фагоцитарной активности макрофагов также может вызывать изменения микробиома легких [231, 296, 367, 704].

При анализе микробиоты верхних дыхательных путей установлено, что у нормальных, здоровых людей иммиграция микробов из полости рта является важным источником микробиома легких и желудка, причем распределение таксономических групп в легких коррелирует с микроорганизмами полости рта, а не носоглотки [103]. Кроме того, разнообразие микрофлоры кишечника на раннем этапе жизни является предпосылкой развития иммунной системы, существенно снижая частоту астмы и других аллергических заболеваний [417, 264], а также применение антибиотиков широкого спектра действия в детстве значительно повышают вероятность развития аллергической астмы во взрослом возрасте [231, 511, 557].

На проявление астмы и атопии влияет также генетическая предрасположенность: при исследовании однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) у 3062 детей, больных астмой, были обнаружены множественные одиночные SNP, в том числе в генах *TLR* и *NLR*, а также белков, взаимодействующих с ними [648]. Выявленные полиморфизмы генов *TLR* и *NLR* влияют на связывание этих рецепторов с их лигандами и многочисленными адаптерными белками, модифицируя внутриклеточные сигнальные пути,

задействованные при астме, хронической обструктивной болезни легких и других заболеваниях [584, 648].

В настоящее время известно, что общее количество бактерий в организме человека достигает сотен триллионов, а видовое разнообразие оценивается в десятки тысяч видов [42]. При количественной оценке генетического разнообразия 3655 общедоступных метагеномов микробиома полости рта и кишечника, была обнаружена генетическая гетерогенность в наборе данных, идентифицировав в общей сложности 45666334 неизбыточных гена (23961508 пероральных, 22254436 кишечных), при этом 50% всех генов были «одинокими» или уникальными для одного метагеномного образца [628]. Это огромное биоразнообразие создает сложную сеть взаимодействий, где бактериальные биорегуляторы играют центральную роль в поддержании здоровья хозяина и имеют основополагающее значение для расшифровки взаимодействий человека и симбиотических микроорганизмов [42].

Биорегуляторы бактериального происхождения участвуют в процессах репликации, экспрессии генов, эпигеномных и пост-трансляционных модификациях эукариотических клеток, осуществляя тесную связь между микробиомом и хозяином [451]. Одной из ключевых функций бактериальных биорегуляторов является их влияние на иммунную систему хозяина. Они помогают в обучении иммунной системы, способствуя развитию толерантности к симбиотическим микроорганизмам и поддержанию адекватного иммунного ответа против патогенов [618]. Таким образом, микробиом кожи и слизистых является важным фактором в формировании иммунной системы и её способности противостоять инфекциям и воспалениям [451, 329].

Биорегуляторы бактериального происхождения вовлечены в широкий спектр функций, от регуляции иммунной системы до участия в метаболических путях и поддержания нормальной функции кишечника. Разнообразие и сложность взаимодействий между бактериальными биорегуляторами и клетками организма хозяина являются ключевыми аспектами понимания микробной экологии человека и её влияния на здоровье и заболевания [413, 616].

Бактериальные биорегуляторы включают в себя широкий спектр молекул, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), бактериоцины, пептидогликаны, липополисахариды и различные метаболиты, которые могут воздействовать как на бактериальные, так и на эукариотические клетки хозяина [329]. КЦЖК, такие как ацетат, пропионат и бутират, являются конечными продуктами ферментации пищевых волокон кишечными бактериями, в первую очередь растительных полисахаридов, которые не могут быть переварены человеком, поскольку у него отсутствуют гликозидгидролазы и полисахаридлиазы, необходимые для расщепления гликозидных связей, присутствующих в этих гликанах [531].

КЦЖК играют важную роль в питании клеток кишечного эпителия, в восстановлении его целостности, регуляции воспаления и защите от патогенных микроорганизмов [90, 430].

Бактериоцины — это антимикробные пептиды, вырабатываемые бактериями для подавления конкурирующих штаммов [366]. Эти вещества могут способствовать поддержанию баланса микрофлоры кишечника и использоваться как потенциальные альтернативы традиционным антибиотикам для борьбы с бактериальными инфекциями [366].

Пептидогликаны, составляющие клеточные стенки большинства бактерий, взаимодействуя с иммунной системой хозяина, поддерживают активность иммунной системы, необходимую для ответа на патогены [106, 413, 451].

Липополисахариды, обнаруженные во внешнем слое клеточной стенки грамотрицательных бактерий, также модулируют иммунные реакции, хотя их эндотоксические свойства могут привести к воспалительным реакциям и сепсису при высоких концентрациях [108, 543, 623].

Бактериальные метаболиты, такие как витамины, аминокислоты и другие биоактивные соединения, синтезируемые кишечными микроорганизмами, необходимы для множества физиологических процессов, включая пищеварение, метаболизм и синтез нейротрансмиттеров [413]. Таким образом, микробиом

влияет не только на состояние кишечника, но и на общее психофизическое здоровье, включая настроение и поведение человека [451].

Необходимо отметить, что бактериальные биорегуляторы не только поддерживают здоровье хозяина, но и могут играть роль в развитии различных заболеваний. Например, дисбаланс в производстве или составе КЦЖК может привести к нарушению барьерной функции кишечника и системному воспалению, что ассоциируется с такими состояниями, как ожирение, диабет 2 типа и воспалительные заболевания кишечника [311].

Понимание механизмов, через которые бактериальные биорегуляторы влияют на здоровье и болезнь, может открыть новые возможности для разработки лекарственных средств, пробиотиков, пребиотиков и других микробиотических интервенций для предотвращения и лечения многих заболеваний. Способность бактериальных биорегуляторов модулировать иммунную систему также подчеркивает их потенциал в разработке новых иммунотерапевтических стратегий. Например, исследования показывают, что определенные штаммы пробиотиков могут индуцировать развитие регуляторных Т-клеток, снижая тем самым воспалительные реакции и предотвращая аутоиммунные заболевания [526, 684]. Кроме того, бактериальные биорегуляторы играют ключевую роль в поддержании микробиома кожи, защищая ее патогенных микроорганизмов и способствуя заживлению ран [241, 385]. Эти молекулы также участвуют в регуляции местного иммунитета и могут влиять на развитие кожных заболеваний, таких как атопический дерматит и акне [31, 114, 197]. Интересное направление исследований связано с взаимодействием микробиома и центральной нервной системы, известным как ось "кишечник-мозг". Бактериальные биорегуляторы могут влиять на мозговую функцию и поведение через нейроактивные вещества, такие как серотонин и гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), производимые кишечными микроорганизмами [621, 622]. Эти открытия представляют новые направления для понимания и лечения неврологических и психических расстройств, включая депрессию, тревожные расстройства и аутизм.

Бактериальные биорегуляторы оказывают огромное влияние на здоровье и функционирование человеческого организма. Продолжающиеся исследования в этой области обещают открыть новые пути для создания инновационных стратегий лечения и профилактики большого количества заболеваний, улучшая тем самым качество жизни людей. Прогресс в области генетических исследований привел к более глубокому пониманию молекулярных механизмов, через которые бактериальные биорегуляторы взаимодействуют с клетками хозяина [254, 301]. Это открывает путь к разработке персонализированных медицинских подходов, основанных на уникальном составе микробиома человека. Однако, несмотря на значительные достижения в этой области, остается множество нерешенных вопросов. В частности, многие механизмы взаимодействия между бактериальными биорегуляторами и хозяином еще не до конца исследованы. Кроме того, большинство исследований проводилось на модельных организмах или в искусственных условиях, что ограничивает их прямую применимость к человеку. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования для того, чтобы полностью раскрыть потенциал бактериальных биорегуляторов в медицине.

### **1.3 – Клиническая эффективность биорегуляторов бактериального происхождения**

#### **1.3.1 – Лекарственные средства на основе мурамилпептидов**

##### **1.3.1.1 – Источники мурамилпептидов в организме человека**

Мурамилпептиды являются мономерами пептидогликана, формирующего клеточную стенку практически всех известных бактерий, за исключением *Rickettsia*, и защищают бактерии от осмотического лизиса [94]. У грамположительных бактерий пептидогликановый слой толще, чем у грамотрицательных [395]. N-ацетилмурамовая кислота, входящая в состав мурамилпептидов, является высоко консервативной структурой, синтезируется исключительно в прокариотических организмах и вместе с N-ацетилглюкозамином формирует остов бактериальных стенок [2, 4]. Моносахаридсодержащие мурамилпептиды (N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин, МДП) и дисахаридсодержащие – глюкозаминилмурамилдипептиды

(N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин ГМДП) могут иметь модификации как сахарного остатка, так и пептидной части молекулы, которые отличаются у разных бактерий [94].

Наличие или отсутствие мурамилпептидов в организме здорового человека долгое время было предметом дискуссии. Методами масс-хроматографии, газожидкостной хроматографии и масс-спектрометрии разрабатывались способы определения МП в тканях и жидкостях человека с целью выявления взаимосвязи с хроническими инфекционными заболеваниями [266, 606, 611].

В настоящее время с помощью моноклональных антител обнаружено, что в норме мурамилпептиды присутствуют в сыворотке крови здоровых людей в концентрации 0,330–0,838 мкг/мл, куда они попадают через слизистые кишечника при распаде микрофлоры [315]. Основную роль в деградации полимерного пептидогликана, играют ферменты хозяина, расщепляющие бактериальные пептидогликаны, например, лизоцим, амидазы, пептидогликан узнающие белки и многие другие [235]. Но, кроме этого, известны также и ферменты бактерий, которые используют гидролазы, пептидазы, амидазы, гликозидазы и лизоцим-подобные белки для частичной деструктуризации пептидогликана клеточных стенок, необходимой для деления и роста бактерий, образования пилей, автолизиса и трансмембранного транспорта [272, 357, 368]. Ферменты, разрушающие пептидогликан, выделяются бактериями также в конкурентной борьбе бактерий разных линий за освоение новых ниш обитания и являются строго видоспецифичными [232, 356]. Бактериофаги также используют муреиновые гидролазы и лизоцим-подобные белки для проникновения в бактерии, разрушая их пептидогликан [132, 292, 416]. Лизоцим-подобные белки, разрушающие пептидогликан до дисахаридсодержащих производных, обнаружены и в грибах [536]. Таким образом, ферменты бактерий, бактериофагов и грибов, входящих в состав комменсальной микрофлоры, наряду с ферментами человека вносят вклад в образование мурамилпептидов.

У животных выведение и деградация мурамилпептидов может происходить значительно быстрее, чем у человека. В частности, исследование содержания

природных мурамилпептидов в сыворотке крови кроликов показало, что в норме мурамилпептиды не обнаруживаются при чувствительности метода 500 пмоль/мл [262]. Причем, сразу после инъекции синтетического мурамилдипептида он легко обнаруживался в кровотоке, однако этот уровень быстро снижался [267]. Аналогично в тканях крыс при чувствительности метода 1 нг мурамилпептиды в норме не были обнаружены, а определялись в селезенке и спинномозговой жидкости пациентов с пневмококковым менингитом (от 6,8 до 3900 нг мурамовой кислоты/мл в спинномозговой жидкости) [389]. У мышей при внутривенной и подкожной инъекции радиоактивно меченного МДП более 50%  $^{14}\text{C}$ -MDP выводилось с мочой через 30 минут и более 90% через 2 часа после введения, причем меченое соединение было обнаружено в моче в неизменном виде [253].

При исследовании с помощью ВЭЖХ и МС содержания мурамилпептидов в сыворотке крови лабораторных мышей обнаружено содержание различных производных мурамилпептидов [656]. Кроме того, в сыворотке плода теленка (FCS) из разных партий, используемой для ведения клеточных культур, также обнаружены мурамилпептиды GlcNAc-MurNAc- 1 - Ala - d - Gln- meso DAP (GM-TriDAP), GlcNAc-MurNAc- 1 - Ala - d - Gln (ГМДП) и 1 -Ala- d - Gln - meso DAP (TriDAP), что дает основание предполагать, что следы циркулирующего пептидогликана могут присутствовать в сыворотке, и влияние мурамилпептидов в экспериментальных исследованиях *in vitro* может быть недооценено [656].

Видовую специфичность способности расщеплять мурамилпептиды, а также наличие мурамилпептидов в сыворотке, используемой для ведения клеточных культур, необходимо учитывать при организации доклинических исследований препаратов на основе мурамилпептидов, а также при интерпретации экспериментальных данных лабораторных исследований.

### **1.3.1.2 – Влияние мурамилпептидов на микроорганизмы**

Мурамилпептиды, являясь мономерами пептидогликана, оказывают непосредственное влияние на микроорганизмы и их циклы развития. Ремоделирование пептидогликана необходимо бактериям для их размножения; при каждом делении бактерий около 40-50% пептидогликана распадается на

мономерные звенья, и может использоваться для построения клеточных стенок следующего поколения бактерий [506]. При воздействии муреиновых гидролаз на клеточную стенку бактерии, образующиеся в периплазме, мурамилпептиды рециркулируют и вновь используются бактериями для образования пептидогликана [16, 290]. Описаны десятки муреиновых гидролаз, характерные для определенных линий бактерий и бактериофагов, образующих в результате большое количество моносахаридсодержащих и дисахаридсодержащих производных мурамилпептидов, рециркулирующих в процессе роста бактерий [132, 564]. В многочисленных экспериментах доказано спонтанное высвобождение фрагментов пептидогликана *E. coli* [290], *Bordetella pertussis* [189, 288] и *Neisseria gonorrhoeae* [564], *Neisseria meningitides* [583], *Bordetella pertussis* [423], *Shigella* [472].

Непосредственное воздействие мурамилпептидов и его аналогов на пять бактериальных штаммов четырех видов (*S. aureus* MRSA/MSSA, *K. pneumoniae* ESBL, *P. aeruginosa* и *E. coli*), выявило, что значение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) было >512 мкг/мл по отношению ко всем штаммам, за исключением синегнойной палочки (*P. aeruginosa*), для которой МИК был 128 мкг/мл. В качестве сравнения МИК антибиотиков (канамицин, тетрациклин и хлорамфеникол) в данном эксперименте был в диапазоне 1-32 мкг/мл [686]. Мурамилпептиды могут использоваться бактериями для коммуникации [228], участвуя в координации роста всей популяции и выступая наряду с другими низкомолекулярными биорегуляторами бактериального происхождения медиатором «чувства кворума» (quorum sensing).

Непосредственное влияние мурамилпептидов проявляется и на дормантные формы бактерий, обладающие высоким потенциалом устойчивости к антибиотикам. Мурамилпептид 1,6-ангидроГМДП в диапазоне концентраций 9-100 нг/мл, добавленный в среду с покоящимися бактериями *Mycobacterium smegmatis*, выводит микобактериальные клетки из состояния покоя [88].

В экспериментах на клеточных линиях J774 мурамилпептид ГМДП подавлял внутриклеточный рост *M. smegmatis*, *M. bovis* и *M. tuberculosis* в

концентрациях 40 мкг/мл [3, 64]. Интересные данные получены при инъекциях ГМДП мышам, инфицированным *Mycobacterium tuberculosis*. При этом обнаружено, что инъекции ГМДП снижали количество жизнеспособных бактерий в легких, но увеличивали их количество в селезенке через 16 недель, а также уменьшали рецидив инфекции в легких после химиотерапии [671].

В экспериментальных моделях на животных исследована антибактериальная активность нескольких десятков производных мурамилпептидов. Установлено, что N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) и некоторые аналоги защищают мышей от *Klebsiella pneumoniae* даже в случае перорального введения, они также оказались эффективны при введении и после контрольного заражения [174, 503]. Применение мурамилпептида ГМДП за 1—4 дня перед введением летальной дозы эндотоксина *E. coli* LPS защищает от 60 до 100 % мышей от гибели [254], а синтетическое производное МДП - от *Staphylococcus aureus* [243]. Аналог мурамилдипептида обеспечивает защиту, от внутрибрюшинной инфекции *Pseudomonas aeruginosa* или внутривенной инфекции *Candida albicans* у мышей при внутрибрюшинном, внутривенном или подкожном введении 80 мг/кг в день один раз в день в течение 4 дней подряд до инфицирования. Соединения не активны при пероральном введении. N-ацетил-нор-мурамил-L-аланил-D-изоглутамин потенцирует действие гентамицина и оказывал защитное действие от *Listeria monocytogenes*, при этом постинфекционная защита не наблюдается [269]. Мурамилпептид MDP-Lys (L18) оказывает защитный эффект у мышей C57BL/6 против живых культур *Salmonella enteritidis* и *Salmonella enterica* Serovar *Choleraesuis Hokkaido* [610].

Мурамилпептиды оказались способны защищать от инфекции животных с иммунодефицитами [268]. МДП защищает СВА/N мышей с X-ассоциированной мутацией иммунодефицита (xid) против смертельной бактериальной инфекции *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* и *Salmonella enteritidis* [516]. Интересно, что в другом исследовании в модели сальмонеллеза *Salmonella enteritidis* у СВА/N-дефектных мышей с X - связанным иммунодефицитом однократная инъекция МДП, либо МДП-Lys(L18) не вызывает какой-либо

эффективной защиты, но повторные инъекции МДП-Lys(L18) (100 мкг на мышь в день в течение 3 дней подряд) до бактериального заражения защищают иммунодефицитных мышей. Многократные инъекции МДП один раз в день в течение нескольких дней подряд повышают бактерицидную активность в брюшной полости и селезенке мышей [494]. Мурамилпептиды в экспериментальных исследованиях на животных демонстрируют активность не только против различных бактериальных инфекций, они также способствуют элиминации вирусов, грибов и простейших [194, 420, 485].

### 1.3.1.3 – Структура мурамилпептидов и лекарственные средства на их основе

Мурамилпептиды являются минимальными структурными компонентами пептидогликана клеточных стенок бактерий [129, 254, 375, 596, 688]. Они реализуют биологическую активность через связывание с NOD рецепторами внутриклеточной локализации [486, 487]. При этом различают моносахаридсодержащие мурамилпептиды и дисахаридсодержащие (рисунки 1.8 и 1.9) [2, 240, 343, 431, 510, 597].

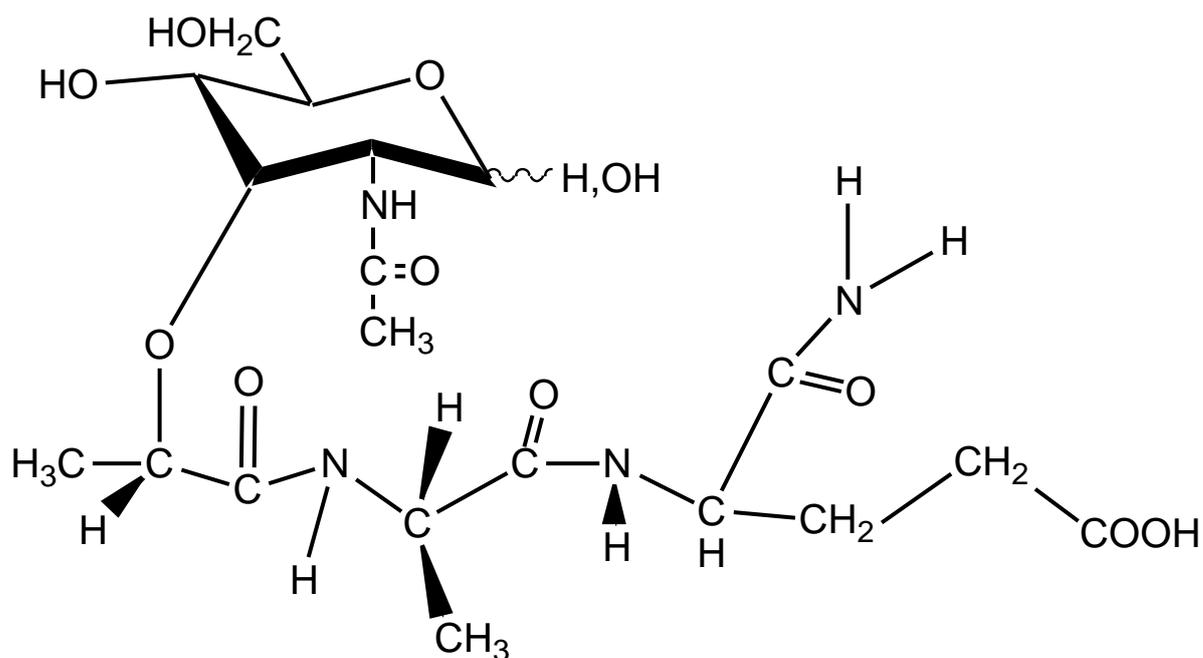
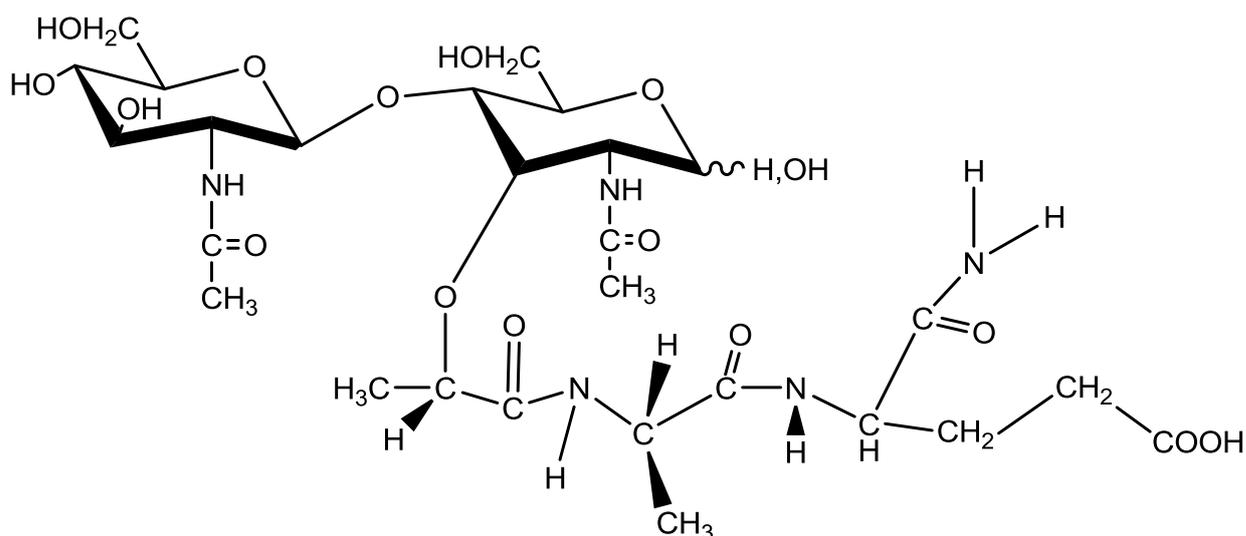


Рисунок 1.8 – Структура N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамина (МДП)



**Рисунок 1.9 – Структура N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил -L-аланил-D-изоглутамина (ГМДП)**

Многочисленные исследования показали, что ГМДП, как и МДП, является лигандом NOD2 рецептора [254], обладает более выраженным, чем МДП адьювантным эффектом [304], способностью стимулировать антиинфекционную резистентность и противоопухолевый иммунитет, активировать иммунокомпетентные клетки, индуцировать синтез ряда цитокинов и медиаторов воспалительных процессов [3, 61, 72]. Кроме того, ГМДП обладает менее выраженным пирогенным эффектом. Эти свойства ГМДП явились основанием для внедрения его в клиническую практику. В то же время высокая пирогенная активность МДП, связанная как с прямым действием на центральную нервную систему, так и с индукцией выработки эндогенных пирогенов, послужили препятствием для его клинического использования и основанием для поиска структурных аналогов, лишенных нежелательных побочных эффектов и обладающих большей иммуностимулирующей активностью [70].

В настоящее время синтезировано несколько десятков производных мурамилпептидов [64, 70, 101, 513, 591]. Некоторые из них прошли клинические испытания и уже применяются в России или за рубежом (таблица 1.4).

**Таблица 1.4 – Мурамилпептиды, зарегистрированные и исследуемые в качестве лекарственных препаратов**

Торговое название МНН/ Компания	Названия химического соединения	Область применения	Страна /Дата регистрации
Noria®/ Romurtide, Muroctasin, Daiichi Pharmaceutic	N-Acetylmuramyl-Ala-D-isoglutaminyl-N $\epsilon$ -stearoyl-Lys, DJ-7041, МДП-Lys(L18)	Онкология, Нейтропении	Япония/ 1991 Выпуск ЛФ приостановлен
B30-MDP Daiichi Pharmaceutic	6-O-(2-tetradecylhexadecanoyl)-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-isoglutamine)	Инфекционные заболевания (адьювант в противогриппозной вакцине)	Япония/ 1992 Выпуск ЛФ приостановлен
Ликопид® АО Пентек, Россия	Глюкозаминилмурамил-дипептид, ГМДП	Хронические рецидивирующие инфекции дыхательных путей, гнойно-воспалительные заболевания кожи и мягких тканей, герпетические инфекции	Россия/1995; Беларусь, Казахстан/ 2001; Азербайджан, Армения, Молдова/ 2007; Узбекистан, Кыргызстан, Монголия, Грузия/ 2015
Threonyl Muramyl Dipeptide BOC Sciences	Threonyl-N-Acetylmuramyl-Ala-D-isoglutamin, Threonyl-MDP	ВИЧ-инфекции (адьювант в вакцине против СПИДа)	США, I фаза/ 1996 Выпуск ЛФ приостановлен
ImmTher® Immunotherapeutics Inc.	N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин-L-аланил-глицерилдипальмитат, disaccharide tripeptide glycerol dipalmitoyl	Онкология	США/ 2000
Лиастен® (Бластен) Технолог, Украина	глюкозаминилмурамил-пентапептид, ГМПП	Инфекционные болезни, пульмонология онкология хирургия	Украина/ 2000

## Продолжение таблицы 1.4

Торговое название МНН/ Компания	Названия химического соединения	Область применения	Страна /Дата регистрации
Murabutide <i>ISTAK Biotechnology, Lille, France</i>	N -ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин-n-бутиловый эфир	Инфекционные болезни, ВИЧ-инфекции [М]	Франция/ 2002
Meract®, Junovan Mifamurtide Takeda Pharmaceutical	Мурамилтрипептид, фосфатидилэаноламин, включенный в липосомы, Liposomal Muramyltripeptide Phosphatidylethanolamine L-MTP-PE, MTP-PE	Онкология (остеосаркома), адъювант в вакцине против СПИДа и гепатита В	27 стран Европейского Союза/ 2009 Мексика/ 2010
norMDP, Almurtime® <i>American Custom Chemicals Corp</i>	N-acetyl-nor-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, Cgp-11637, Nor-MDP, UNII-1DCO35D4OR	Онкология (адъювант в вакцине)	США/ 1 фаза 2011-2017 гг.
Поли-мурамил® «Комбиотех» для ООО «КОРУС ФАРМ»	Комплекс из трех компонентов: 1) N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновой кислоты (ГМтри); 2) N-ацетил-D-глюкозаминил-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелоил-D-аланин (ГМтетра); 3) димер(ГМтетра и диГМтетра)	Вторичные иммунодефицитные состояния, острые и хронические пиодермии, осложненные вторичной инфекцией дерматозы, лечение и профилактика хирургических инфекций	Россия/ 2013

Примечание: ЛФ - лекарственная форма.

### 1.3.1.4 – Моносахаридсодержащие мурамилпептиды

Первый лекарственный препарат на основе мурамилпептида N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин-N6-стероил-L-лизина, внедренный в клиническую практику, - **Noria® (ромуртид, муруктозин)** был выбран японскими учеными из нескольких десятков производных МДП, способных

повышать неспецифическую резистентность животных к бактериальным и вирусным патогенам [591]. Детально исследована способность ромуртида индуцировать синтез цитокинов. Было установлено, что ромуртид является мощным индуктором синтеза ИЛ-1, ИЛ-6 и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора [440, 525]. Последнее обстоятельство послужило основанием для изучения его влияния на лейкопоз у онкологических больных после курса химио- или радиотерапии [545-547]. В результате проведенных клинических испытаний было установлено, что применение ромуртида способствует быстрому восстановлению количества лейкоцитов, в основном за счет нейтрофилов; при этом наблюдается дозозависимый эффект: ромуртид в дозировке 400 мкг в каждом из исследований более эффективен, чем в дозах 100 и 200 мкг, при этом в дозировках 100 и 200 мкг увеличивает количество нейтрофилов не только в крови, но и в костном мозге. Стимуляция лейкопоза у пациентов с солидными опухолями более выражена, чем у пациентов с гематологическими злокачественными опухолями, при этом дозировка 400 мкг вызывает побочные эффекты - повышение температуры, боль и покраснение в месте введения, головная боль; в связи с чем оптимальный режим дозирования был выбран 200 мкг/сут. в течение 6 дней. Дальнейшие клинические исследования ромуртида в коррекции побочных эффектов противораковой химио- и лучевой терапии показали, что он эффективен не только в восстановлении количества лейкоцитов, но и тромбоцитов, а внутривенное введение более предпочтительно, чем подкожное [548]. Полученные данные позволили сделать вывод, что ромуртид является высокоэффективным лекарственным средством для восстановления числа лейкоцитов и тромбоцитов у онкологических больных после химио- или радиотерапии [375]. Ромуртид является первым иммунотерапевтическим лекарственным средством мурамилдипептидного происхождения, разрешенным для медицинского применения при лейкопениях. Позже в 2011 году было обнаружено потенцирующее действие ромуртида: совместное его введение с IFN- $\beta$  способствует созреванию дендритных клеток и подавляет рост B16F10 меланомы, тогда как отдельно мурамил пептид и IFN- $\beta$  не

оказывали существенного воздействия на рост опухоли [91]. Кроме того, японские исследователи в экспериментах на животных обнаружили обезболивающее действие ромуртида: в дозировках 10, 50, и 2.0 мкг на мышь наблюдалось уменьшение частоты судорожных движений, вызванных уксусной кислотой [101]. Лекарственная форма (ЛФ) ромуртида до 1998 года производилась в виде лиофилизата 200 мг во флаконах в комплекте с водой для приготовления раствора для подкожных инъекций. В настоящее время выпуск ЛФ ромуртида приостановлен, субстанция выпускается несколькими компаниями, в том числе Invivogen (San Diego, CA, USA) и Ning Zhang Shaanxi Dideu Medichem Co. Ltd. (Shaanxi, China). Ромуртид входит в состав композиции нескольких тысяч патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Amgen Inc.

Одним из направлений в создании иммунотерапевтических лекарственных средств мурамилдипептидной природы является разработка липофильных производных мурамилпептидов. В этих случаях к мурамилпептиду присоединяются жирные кислоты или фосфолипиды. Первым липофильным аналогом мурамилпептидов, прошедшим 1 фазу клинических испытаний, является 6-О-(тетрадецилгексадеканойл)-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин (**V30-MDP**) [513]. Включение мурамилпептида V30-MDP в качестве адъюванта в состав противогриппозной вакцины, содержащей гемагглютенин и нейраминидазу вируса гриппа, индуцирует в 16 раз более сильное антителообразование по сравнению с вакциной без мурамилпептида, а инкорпорирование компонентов в холестероловые частицы (виромы) удлиняет антителообразование до 6 месяцев [220]. Местные побочные реакции, наблюдавшиеся при введении MDP-виромных вакцин в виде покраснения, отека, болезненности в месте инъекции, исчезали в течение 5 дней. Системные побочные реакции проявлялись в виде лейкоцитоза. В настоящее время лекарственная форма V30-MDP не производится, но входит в состав композиции многочисленных европейских и американских патентов как адъювант, например, патенты WO2017023782A1 (2017), US20150306198A1 (2015), WO2011085071A2 (2011), US20130202655A1 (2011), WO2008070564A1 (2007).

Мурамилпептиды **Threonyl-MDP** и **МТР-РЕ** использовались в качестве адъюванта в вакцине против СПИДа в рандомизированном слепом плацебо-контролируемом исследовании 1 фазы клинического исследования. У 112 здоровых ВИЧ-отрицательных добровольцев определяли способность вакцины rgp 120/SF-2 индуцировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа при подкожном введении в присутствии адъювантов [479]. В связи ограничением финансирования дальнейшие исследования были прекращены [456]. Threonyl-MDP входит в состав композиции более 4 тысяч патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Novartis International Ag.

Мурамилтрипептидфосфатидилэтаноламин (**МТР-РЕ**, **Mifamurtide**), включенный в липосомы (L-МТР-РЕ, торговое название **Mepect**), зарегистрирован в 27 странах Евросоюза в качестве адъюванта в сочетании с традиционной химиотерапией при лечении остеосаркомы, орфанного заболевания, поражающего, главным образом, детей и молодых людей с 30% летальным исходом [640]. В доклинических исследованиях на собаках с остеосаркомой было показано, что в послеоперационный период внутривенное введение L-МТР-РЕ увеличивало продолжительность жизни животных в три раза. Причем в группе, получавших L-МТР-РЕ, из 14 животных у 4 наблюдалось полное излечение. Отмечалась хорошая переносимость препарата, отсутствие токсических эффектов, за исключением умеренного повышения температуры тела (на 1-2°C) в течение 2-6 часов после инъекции [640]. Клинические исследования I фазы подтвердили безопасность мифамуртида при внутривенном введении в дозе 2 мг/м<sup>2</sup> дважды в неделю на протяжении 12 недель и далее 24 недели один раз в неделю [446, 455].

Рандомизированное исследование III фазы продемонстрировало снижение риска смерти от остеосаркомы на 30%, что позволило Европейскому агентству лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA) рекомендовать включение мифамуртида в системную терапию метастатической остеосаркомы [447]. Известно, что метастазирование легкого является основным отягчающим фактором прогноза остеосаркомы. В экспериментальной модели показано, что

включение в комплексную терапию мифамуртида в дозировке 1 мг/кг устраняет метастазирование в легкие, увеличивает ответ на химиотерапию [412]. Впечатляющие результаты получены также при включении мифамуртида в качестве адьюванта в состав вакцины против гепатита В: иммуногенность возрастает в 4-5 раз, увеличивается уровень IFN- $\gamma$  [377]. Мифамуртид входит в состав композиции более 500 патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Bayer Pharma Ag.

**Мурабутид**, апирогенный МДП (N -ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин-n-бутиловый эфир, ISTAC Biotechnology, Lille, France) - безопасное производное МДП, которое взаимодействует с клетками врожденной и адаптивной иммунной системы, оказывает свое действие посредством активации NOD2 рецептора. Макрофаги, стимулированные мурабутидом, показывают повышенную экспрессию генов, кодирующих различные белки, такие, как иммунные медиаторы и их рецепторы, транскрипционные факторы и киназы, транспортеры и белки, участвующие в метаболической активности клеток, что отражает широкий спектр биологических эффектов. Мурабутид также усиливает устойчивость хозяина к микробным инфекциям, неспецифическую резистентность к опухолям и индукцию цитокинов и хемокинов, участвующих в усилении иммунного ответа и гематопоеза [378].

Мурабутид прошел первую и вторую фазы клинических испытаний во Франции, побочные эффекты практически отсутствовали: в сыворотке крови с помощью иммуноферментного метода обнаружено только 2 цитокина: ИЛ-6 и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (ГКСФ). В то же время у всех обследованных в сыворотке выявлено некоторое количество растворимых рецепторов для ФНО и ИЛ-1, которые, как известно, являются антагонистами этих провоспалительных цитокинов. Влияние мурабутида на продукцию цитокинов было проанализировано в цельной крови человека для воспроизведения естественной среды. Зарегистрировано повышение уровня цитокинов, таких как фактор некроза опухолей (TNF), интерлейкин-1 бета (IL-1 $\beta$ ), IL-6, IL-8, а также противовоспалительный медиатор IL-1Ra. Исследования

совместного действия мурабутида с цитокинами показали, что в комплексе с ФНО повышается секреция ИЛ-6 человеческими моноцитами, а в комплексе с ИЛ-2 или ИЛ-4 - пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов. Комбинация интерферона- $\alpha$ -2а и мурабутида индуцирует существенное повышение уровня ГКСФ, ИЛ-64, растворимых рецепторов для ИЛ-1 и ФНО в крови. Результаты экспериментов показали, что ассоциация мурабутида с цитокинами может оказывать синергетическое действие, таким образом, снижая эффективные дозы рекомбинантного цитокина, увеличивая выделение противовоспалительных медиаторов и вызывая эффективный клеточный иммунитет [378].

Известно, что коррекция иммунитета ВИЧ-инфицированных способствует усиленному восстановлению иммунитета и эффективному контролю репликации вируса. Мурабутид регулирует функцию антигенпредставляющих клеток и избирательно активирует CD4-лимфоциты, что приводит к резкому подавлению репликации ВИЧ *in vitro*. Поэтому в качестве первого шага на пути к оценке иммунотерапевтического потенциала мурабутида при ВИЧ-инфекции были проведены клинические испытания 1 и 2 фазы, которые посвящены безопасности и эффективности мурабутида у ВИЧ-инфицированных пациентов, получавшим антиретровирусную терапию [636]. При исследовании способности мурабутида контролировать репликацию ВИЧ 1-го типа (HIV-1) в инфицированных моноцитах и дендритных клетках обнаружено существенное подавление репликации вируса в обоих типах клеток. Мурабутид не влияет на проникновение вируса в клетку, активность обратной транскриптазы или раннее образование провирусной ДНК в цитоплазме инфицированных клеток. Тем не менее, наблюдается резкое сокращение вирусных мРНК в моноцитах, и в дендритных клетках. Эта подавляющая ВИЧ-1 активность не опосредована ингибированием клеточного синтеза ДНК или активацией p38 митоген-активированной протеинкиназы. Кроме того, стимулированные мурабутидом клетки экспрессируют уменьшенные количества рецепторов CD4 и секретируют высокие уровни бета-хемокинов, при этом нейтрализация высвобожденных хемокинов не изменяет подавляющую ВИЧ-1 активность мурабутида. Эти результаты

свидетельствуют о том, что использованный в клинике иммуномодулятор мурабутид может активировать множественные эффекторные пути в макрофагах и дендритных клетках, и как следствие происходит угнетение репликации ВИЧ-1 [99]. Мурабутид входит в состав композиции около 200 патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Virochem Pharma Inc.

Мурамилпептид **norMDP (Almurtide®)** в настоящее время проходит 1 фазу клинических испытаний в качестве адьюванта в HER-2 вакцине против рака желудка, груди и яичников [667]. HER-2 (CD340) — мембранный белок, тирозинкиназа семейства рецептора эпидермального фактора роста, повышенная экспрессия которого играет важную роль в патогенезе и прогрессировании определённых агрессивных типов рака, является важным биомаркером и терапевтической мишенью этого заболевания [659, 667]. norMDP входит в состав композиции около 200 патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Novartis International Ag.

### **1.3.1.5 – Дисахаридсодержащие мурамилпептиды**

Дисахаридсодержащие производные мурамилпептидов получили широкое распространение в медицинской практике в качестве иммунотерапевтических лекарственных средств ввиду менее выраженных побочных эффектов, свойственных моносахаридсодержащим мурамилпептидам (повышение температуры, ломота, боль в суставах), и широкого диапазона терапевтической эффективности. При сравнении индексов стимуляции гуморального ответа на овальбумин мышей при внутрибрюшинном введении МДП и ГМДП, обнаружено, что ГМДП проявляет более выраженную адьювантную активность, чем МДП [70].

Первым зарегистрированным лекарственным средством в ряду дисахаридсодержащих мурамилпептидов является препарат **ликопид**.

Внедрению препарата ликопид в клинику предшествовали многочисленные доклинические исследования в России, Великобритании, Австралии, в ходе которых был выявлен широкий спектр биологической активности глюкозаминилмурамилдипептида [1, 6, 54, 615, 679].

ГМДП стимулирует развитие как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. При иммунизации мышей BCG вакциной ГМДП увеличивает в 3 раза синтез фактора, угнетающего миграцию макрофагов и в 2 — 5 раз усиливает антителообразование к корпускулярным и растворимым антигенам [64]. В экспериментальных исследованиях выраженный стимулирующий эффект выявлен при использовании ГМДП в качестве адъюванта в ВИЧ-вакцине, содержащей рекомбинантный антиген gp120 [615], при иммунизации *in vitro* для получения моноклональных антител [18], в составе ДНК-вакцины против вируса простого герпеса [69], а также бесклеточной коклюшной вакцины [67]. Данные исследования показывают, что ГМДП является перспективным адъювантом, пригодным для использования в составе широкого спектра вакцин. Его применение за 1—4 дня перед введением смертельной дозы *E. coli*, *Ps. aeruginosa* или LPS защищает от 60 до 100 % животных от гибели. ГМДП обладает и антивирусной активностью: подавляет распространение вируса гриппа в организме зараженных мышей [64], достоверно увеличивает как общее число лейкоцитов, так и число нейтрофилов на 6 — 7-й день после облучения [1]. ГМДП обладает противоопухолевой активностью: тормозит рост некоторых перевиваемых опухолей, проявляет синергизм с другими противоопухолевыми агентами и иммуностимуляторами. Так, комбинация ЛПС и ГМДП полностью излечивала от тимомы EL-4, от саркомы Mc-11. При этом у вылеченных мышей развивался противоопухолевый иммунитет [78]. Результаты доклинических экспериментов показали высокий потенциал глюкозаминилмурамилдипептида как иммунотерапевтического средства и легли в основу клинических испытаний.

Анализ накопленного фактического материала позволил к настоящему времени выделить несколько механизмов, лежащих в основе клинической эффективности препарата. Безусловно, основным механизмом иммунотерапевтического действия препарата ликолипид является активация под его влиянием противoinфекционной защиты, клеточного и гуморального иммунитета, угнетенного вторичными иммунодефицитами [3, 64]. Другой механизм включает патогенетическое воздействие на механизм аллергического

воспаления, переключая иммунный ответ с Th2-типа на Th1, достоверно снижая уровень основных маркеров атопии IgE и IL-4 [14, 31]. Кроме того, стимулируя экспрессию колониестимулирующих факторов, ликопид корректирует цитопению за счёт ускорения процесса костномозгового кроветворения [39, 55, 61].

Эффективность препарата ликопид в терапии вторичных иммунодефицитных состояний, вызванных хроническими инфекциями различной этиологии, многократно подтверждена в клинической практике [30, 63, 76]. В частности, наблюдение за детьми в течение одного года выявило снижение частоты ОРЗ в 2,24 раза ( $p < 0,01$ ) в группе младших детей и в 2,34 раза в группе старших детей ( $p < 0,01$ ), получавших ликопид, на фоне практически неизменных средневзвешенных показателей заболеваемости детей г. Владимира в исследуемый период [30].

Сопоставление эффективности двух схем применения препарата ликопид у детей с рецидивирующими инфекциями позволило определить интервал между курсами в 3 месяца. Лучшие результаты по снижению заболеваемости получены при пролонгации назначения препарата ликопид до 3-х месяцев (схема №2) - по 1 мг в сутки, каждые первые 10 дней месяца (перерыв между курсами приема составлял 20 дней). Снижение числа эпизодов респираторных инфекций отмечено у 27 (90%) пациентов. Из них у половины детей из исследуемой группы отмечен удовлетворительный эффект (снижение эпизодов ОРЗ на 25-50%), у 40 % - хороший (снижение эпизодов ОРЗ более чем 50%) [76].

Анализ эффективности препарата ликопид у 123 пациентов с хроническим бронхитом в стадии ремиссии (средний возраст  $43,03 \pm 1,4$  года, с давностью заболевания в среднем  $8,2 \pm 1,4$  года) выявил оптимальную дозировку - 2 мг 3 раза в день, при которой наблюдается отсутствие кашля у 75% пациентов (при наличии у 100% до лечения); отсутствие хрипов в легких у 76% (при наличии у 100% до лечения); отсутствие одышки у 84% (при 25% значении до лечения) [28].

При лечении хронических рецидивирующих инфекций, вызванных вирусом простого герпеса 1 и 2 типов, прием препарата ликопид в комплексе с противовирусными препаратами приводит к отсутствию новых высыпаний на 5-7

день терапии и их полному исчезновению через 3 дня. При этом отмечен выраженный противорецидивный эффект – отсутствие рецидивов в течение 1,5 лет наблюдений у 100% пациентов в группе, тогда как у пациентов контрольной группы рецидивы герпетической инфекции наблюдались каждые 3-4 месяца [55]. Клиническое улучшение четко коррелировало с улучшениями показателей иммунитета. В группе пациентов, получавших комплексную терапию с препаратом ликопид, отмечается нормализация уровня клеточного звена (числа CD3, CD4 клеток) и функциональной активности естественных киллеров. При лечении препаратом ликопид цитомегаловирусной инфекции в стадии обострения уже через 2 недели от начала лечения пациенты отмечают значительное улучшение самочувствия (исчезает общая слабость, повышенная утомляемость и потливость), происходит нормализация температуры. Отдаленные результаты – при наблюдении в течение 1 года отмечается отсутствие ОРЗ по сравнению с периодом до лечения – частые ОРЗ в течение года [55].

В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании в лечении 100 женщин с локальными и обширными формами кондиломатоза шейки матки применение препарата ликопид в дозировке 20 мг в течение 10 дней через 7 дней после лазеродекструкции повышает эффективность комплексной терапии: снижается количество рецидивов в 4 раза [39]. Лечение препаратом ликопид 207 пациенток с папилломавирусной инфекцией (ПВИ) гениталий в курсовой дозе 200 мг до или после лазеродекструкции имеет высокую эффективность в 97,6% случаев. Рецидивы ПВИ отмечены лишь у 2,4% женщин по истечении 1 года [24].

При лечении хронических гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей в сочетании с этиотропной антибактериальной терапией и антистафилококковым иммуноглобулином отсутствие рецидивов заболевания по окончании терапии в течение 6 месяцев отмечено у 96% пациентов [6]. При этом у 1 пациента с хроническим фурункулезом на фоне сахарного диабета не достигнуто полного выздоровления, но в течение болезни наблюдалась положительная динамика - редкие рецидивы с легким и кратковременным течением. При назначении препарата ликопид по 10 мг один раз в сутки в течение

10 дней пациентам с хроническим вялотекущим фурункулезом (давностью заболевания более 4 лет) наступает клиническая ремиссия у 97% пациентов. Важно отметить, что сочетание препарата ликолипид и антистафилококкового иммуноглобулина у пациентов с выявленными антибиотикорезистентными штаммами стафилококка позволило достигнуть наступления ремиссии у 99% пациентов, тогда как при применении только антистафилококкового иммуноглобулина ремиссия достигнута у 40% пациентов в течение полугода [6].

При лечении хронических гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей препарат ликолипид назначали детям в возрасте от 1 года до 14 лет внутрь на фоне базисной и антибактериальной терапии [77]. Все 30 пациентов, включенные в исследование, страдали рецидивирующими гнойными инфекциями кожи в течение шести и более месяцев. Переносимость препарата ликолипид была хорошей, при проведении курса лечения побочные явления отсутствовали. По окончании лечения у 27 детей (90%) с рецидивирующими гнойными инфекциями кожи отмечен хороший эффект (снижение количества рецидивов заболевания более чем на 50% в течение 6 месяцев после окончания лечения по сравнению с аналогичным показателем до лечения). Из них у 20 детей (66%) наступила полная ремиссия - за время динамического наблюдения в течение полугода не было ни одного рецидива. После проведения курса иммунотерапии препаратом ликолипид уменьшалась потребность в назначении антибактериальных средств. Отрицательной динамики не было отмечено ни у одного из пациентов, было зарегистрировано достоверное увеличение исходно сниженных относительных и абсолютных величин CD4-лимфоцитов, содержания сывороточного IgG [77].

Таким образом, внедрение препарата ликолипид в тактические схемы лечения многих заболеваний, в том числе хронических рецидивирующих бактериальные и вирусных инфекций, способствует сокращению длительности заболевания, увеличению эффективности стандартной терапии снижению количества рецидивов.

На фоне приёма препарата ликолипид происходит улучшение течения не только инфекционных, но и аллергических заболеваний как за счёт нормализации

иммунологических показателей и предотвращения вследствие этого инфекционных осложнений основного заболевания, так и за счёт восстановления баланса между Th1 и Th2. В общей сложности в контролируемых исследованиях по изучению эффективности препарата ликопид в лечении атопических и инфекционно-аллергических заболеваний участвовало 406 пациентов, из них 140 взрослых и 266 детей (без учёта контрольной группы). В клиническом исследовании влияния препарата ликопид на течение IgE-опосредованного атопического дерматита (АД) средней степени тяжести в стадии обострения 46 детей в возрасте от 6 до 9 лет принимали ликопид сублингвально за 30 мин до еды по 1 мг 2 раза в день в течение 5 дней; затем - по 1 мг 1 раз в день в течение 15 дней (курсовая доза - 25 мг) [31]. Было отмечено, что включение препарата ликопид в комплексную терапию способствует сокращению в 3,5 раза площади поражения (при традиционной терапии - в 1,8 раза) через 1 месяц, а через 2 месяца еще в 3 раза, при этом у 40% пациентов кожные проявления полностью исчезли. Анализ интенсивности клинических проявлений выявил значимое снижение в 4 раза через месяц от начала лечения и в 8 раз через 2 месяца. Так, у 26 пациентов этой группы кожный зуд и нарушение сна к концу 1-го месяца лечения отсутствовали, лишь у 5 сохранялся незначительный кожный зуд. Исследование содержания общего сывороточного IgE после лечения выявило достоверное его снижение только у детей, получавших ликопид [31].

Аналогичные данные получены при изучении эффективности ликопида в комплексной терапии атопического дерматита тяжелой степени выраженности у взрослых [62]. Всех пациентов до лечения беспокоил зуд различной степени интенсивности - от незначительного до биопсирующего. Анализ ближайших результатов лечения показал, что у всех больных была отмечена положительная динамика клинических проявлений, но достоверно значимые результаты наблюдались только в группах пациентов, получавших ликопид. Так, после использования препарата ликопид 10 мг индекс SCORAD (IS) снизился с  $58,0 \pm 3,96$  до  $17,2 \pm 2,2$  ( $p < 0,05$ ) [62]. Более выраженная коррекция лабораторных и иммунологических показателей происходила только в группе лечения с

применением препарата ликолипид 10 мг. У этой группы пациентов наблюдалось достоверное снижение спонтанной хемиллюминесценции ( $1,23 \pm 0,04$  до лечения,  $1,1 \pm 0,03$  – после лечения,  $p < 0,05$ ) и стимулированной хемиллюминесценции нейтрофилов ( $1,65 \pm 0,1$  – до лечения и  $3,0 \pm 0,5$  – после лечения,  $p < 0,05$ ). Происходило и снижение исходно повышенного количества нейтрофилов ( $4,0 \pm 0,24$  до и  $3,1 \pm 1,2$  в 1 мкл плазмы крови после лечения,  $p < 0,05$ ) и лейкоцитов ( $7,4 \pm 0,5$  до и  $5,8 \pm 0,3$  в 1 мкл плазмы крови после лечения,  $p < 0,05$ ) [62].

При изучении отдаленных результатов сроки наблюдения составили от 6 месяцев до 1,5 лет [62]. Во внимание принимались анамнестические данные, включающие частоту, длительность обострений, выраженность клинической картины, интенсивность зуда, изменение характера течения сопутствующих заболеваний. Отдаленные результаты изучены у 60 пациентов с атопическим дерматитом, из них у 19 – после применения препарата ликолипид 10 мг, у 18 – с использованием препарата ликолипид 1 мг, у 23 – получавших только традиционную терапию. Уменьшение частоты обострения отметили 16 пациентов из 19 (84%) после комплексного лечения с использованием препарата ликолипид 10 мг, у 61,1% пациентов, получавших ликолипид 1 мг (11 пациентов из 18), и у 52% (12 из 23 пациентов), получавших традиционную терапию. Статистическая оценка частоты обострений атопического дерматита свидетельствует о существенной положительной динамике у пациентов после комплексной терапии с включением препарата ликолипид по сравнению с группой пациентов, получавших традиционную терапию ( $\chi^2 < 4,8$ ;  $p < 0,05$ ) [62].

Включение препарата ликолипид (по 10 мг 1 раз в сутки, 10 дней) в комплекс с аллергенспецифической иммунотерапией (АСИТ) у 128 пациентов с инфекционно-аллергическими заболеваниями дыхательных путей и кожи, наряду с повышением клинической эффективности, позволило вдвое уменьшить число побочных реакций, вызванных основным лечением, число и интенсивность кожных проб со специфическими аллергенами. Изучение иммунного статуса пациентов показало более значимое влияние комбинированной иммунотерапии на

систему нейтрофильного фагоцитоза, количественные и функциональные показатели клеточного звена иммунитета и уровень общего IgE [7].

Углубленное изучение возможностей иммуотропной терапии с использованием препарата ликопис у больных с бронхиальной астмой (БА) продемонстрировало влияния препарата как на клинические проявления заболевания [29, 45, 49], так и на патогенетические его механизмы - баланс Th1/Th2- лимфоцитов и уровень основных маркеров атопии - IL-4, IgE [4, 31]. Таким образом, полученные ранее клинические данные, свидетельствующие об улучшении состояния больных атопическими заболеваниями при терапии препаратом ликопис, могут быть интерпретированы не только как предотвращение инфекционных осложнений основного заболевания, но и как патогенетическое воздействие препарата на процесс аллергического воспаления – восстановление баланса Th1/Th2- лимфоцитов.

Противоопухолевая активность препарата ликопис исследовалась в России и Австралии при различной онкологической патологии в общей сложности на 620 пациентах (без учета пациентов контрольной группы). В клиническом исследовании эффективности препарата ликопис при лечении 164 больных с распространенным опухолевым процессом желудочно-кишечного тракта (68,7% пациентов с IV стадией заболевания) была проведена оценка иммунотерапевтической активности при назначении препарата по двум схемам [61]. Один курс препарата ликопис по 10 мг 1 раз в день, в течение 7 дней, курсовая доза – 70 мг получали 86 пациентов в комплексе с базисной симптоматической терапией (первая группа). Два курса препарата ликопис по 10 мг 1 раз в день в течение 7 дней с интервалом в две недели между курсами, курсовая доза 140 мг получали 78 пациентов в комплексе с базисной симптоматической терапией (вторая группа). Контрольную группу составили 82 пациента, получавших базисную симптоматическую терапию [61]. Эффективность терапии оценивалась путем сравнительного анализа клинико-иммунологических показателей в каждой группе на этапах: исходном (до начала лечения); на 21-й день от начала лечения (через 2 недели после окончания первого курса лечения

препаратом ликопид); на 42-й день от начала лечения (через 2 недели после второго курса лечения препаратом ликопид); на 100-й день от начала лечения (через 2 месяца после окончания второго курса лечения препаратом ликопид). В иммунологических показателях больных 1 и 2 групп наметились положительные тенденции в виде увеличения числа иммунокомпетентных клеток (CD3, CD4), иммунорегуляторного индекса (ИРИ), увеличения фагоцитарной активности нейтрофилов, но при этом показатели иммунограммы оставались сниженными и не достигали нижней границы нормы. Анализ результатов на 42-й день исследования показал, что у пациентов 2-й группы (получавших по протоколу два курса препарата ликопид) отмечаются достоверно значимые положительные изменения со стороны Т-клеточного и фагоцитарного звеньев, показатели которых приближались к нормальным значениям. Кроме того, происходила нормализация уровня НК-клеток, IgA, уменьшение ЦИК. У пациентов 1 группы (получавшие один курс препарата ликопид) сохранялись незначительные положительные сдвиги. В то время как у пациентов контрольной группы наметилась тенденция к усугублению иммуносупрессии со стороны Т-клеточного и фагоцитарного звена. Исследование иммунного профиля на 100-й день от начала лечения выявило тенденцию к усилению иммуносупрессии в контроле и в 1-ой группе больных, получивших один курс иммунотерапии [61].

Один из механизмов, лежащих в основе клинической эффективности препарата ликопид у больных со злокачественными новообразованиями - гемопоэтическая активность. В открытом пилотном исследовании, проведенном в МНИОИ им. П.А. Герцена, была исследована эффективность препарата ликопид у 29 пациентов с различной локализацией и распространенностью опухолевого процесса с лейкопенией II-IV степени по окончании и между курсами химио- и лучевой терапии (15 человек) и лейкопенией I-II степени, развившейся в процессе проведения специфической противоопухолевой терапии (14 человек) [61]. Анализ содержания лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови выявил, что количество нейтрофилов увеличилось в 1,8 раз относительно исходного значения и составило  $2,1 \pm 0,2 \times 10^9$  кл/л, а лимфоцитов в 2,0 раза -  $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$  кл/л [61].

Коррекция нейтропений под действием препарата ликопид наблюдалась также при противовирусной терапии 36 пациентов с хроническим гепатитом С [34]. Наряду с повышением числа лейкоцитов и нейтрофилов препарат ликопид восстанавливал фагоцитарную активность до уровня здоровых лиц (с 64% до 75%) и достоверно повышал фагоцитарное число – с  $4,31 \pm 0,0,34$  до  $7,39 \pm 0,75$  ( $p < 0,001$ ), являющимся наиболее информативным для оценки фагоцитарного звена иммунитета [34].

Воздействуя на ключевую молекулярную мишень в иммунной системе – NOD2 рецептор [487], ГМДП в составе препарата ликопид имитирует процесс обнаружения фрагментов пептидогликана бактерий. Связывание ГМДП с рецептором приводит к целой серии событий внутри клетки, которая заканчивается активацией нуклеарного фактора NF- $\kappa$ B и выработкой ряда ключевых цитокинов — ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- $\alpha$ , интерферон-гамма, колониестимулирующих факторов [486, 487]. Помимо цитокинов в результате активации NF- $\kappa$ B усиливается экспрессия острофазовых белков, ферментов воспаления (NO-синтазы и циклооксигеназы), молекул ГКГС, дефенсинов и т.д. [11, 47]. На уровне организма активация синтеза и секреции перечисленных молекул приводит к развитию воспалительной реакции с подключением всех имеющихся систем защиты от инфекции.

Таким образом, действие мурамилпептидов максимально приближено к процессу естественной иммунорегуляции, реализуемой в организме под действием бактерий. Глюкозаминилмурамилдипептид входит в состав композиции нескольких десятков патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Curevac Ag.

ГМДП-ОН, производное ГМДП, демонстрирует высокую эффективность в составе комплексной противораковой терапии и в настоящее время готово к клиническим испытаниям [12].

Включение ГМДП-ОН в лечение трансплантируемых опухолей лимфоцитарного лейкоза P388 и меланомы B16 снижает частоту метастазирования и тормозит рост опухоли в 95% (P388) и в 100% (B16) случаях,

увеличивает продолжительность жизни животных и снижает количество цитостатического цисплатина на 30% [12].

Липосомальная лекарственная форма N-ацетилглюкозамин-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглютамин-L-аланил-глицерил дипальмитата (**ImmTher**) признана Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных средств США (Food and Drug Administration – FDA) орфанным. Основными показаниями для его назначения являются остеосаркомы, саркомы Юинга и колоректальная аденокарцинома с наличием метастазов в легкие и печень. В клинических испытаниях множественные инъекции препарата при сопутствующей радио- и химиотерапии вызывали лейкоцитоз за счет нейтрофилов и существенное повышение фактора некроза опухоли (ФНО $\alpha$ ).

ImmTher индуцирует экспрессию и продукцию интерлейкина IL-1 $\beta$ , -1 $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-12, ФНО $\alpha$ , но не IL-2 или IL-10. При этом зарегистрирована цитотоксическая активность в отношении остеосаркомы, саркомы Юинга, меланомы, но не рака молочной железы [342, 683]. В январе 2020 года 2 фаза клинического испытания закончена досрочно вследствие отсутствия достаточного количества пациентов, необходимого для статистической значимости.

ImmTher входит в состав композиции около двух сотен патентов, большая часть которых зарегистрирована компанией Curevac Ag.

**Лиастен** - дисахаридсодержащий мурамилпентапептид, выделенный из *Lactobacillus Delbrueckii*, производится с 2000 года в форме порошка для приготовления раствора для инъекций, содержащий 0,002 г активного вещества, а также в форме таблеток 2 мг.

Лиастен используется при лечении заболеваний, сопровождающихся вторичным иммунодефицитом и лейкопенией, при острых и хронических лучевых поражениях, при хирургическом лечении онкологических заболеваний, при острых и хронических бактериальных инфекциях [33, 46]. На курс лечения требуется 3–5 подкожных или внутримышечных инъекций в суточной дозе 2 мг с интервалом 5–7 дней между ними.

Побочные эффекты могут проявляться в виде местных реакций в месте введения, гипертермии и боли в суставах. Во время проведения клинических исследований на 81 пациенте с раком молочной железы (РМЖ) при оценке эффективности препарата в расчёт принимались субъективные ощущения больных, перенесших химио- и лучевую терапию, а также изменение показателей лейкограммы крови (до начала приема препарата  $3,0 \pm 0,3 \cdot 10^9/\text{л}$ , во время лечения  $(3,7 \pm 0,4 \cdot 10^9/\text{л})$ , после окончания приема препарата  $(3,8 \pm 0,6 \cdot 10^9/\text{л})$  [33].

Было показано, что комбинированное лечение больных раком молочной железы I—IV стадий в сочетании с трех-, пятикратным подкожным введением иммуномодулятора в качестве препарата сопровождения препятствует развитию лейкопении на протяжении всего курса химио- и лучевой терапии. При лейкопении, развившейся в результате лечения больных РМЖ, препарат восстанавливает количество лейкоцитов, что позволяет завершить курс химио- и/или лучевой терапии. При оценке 5-летней выживаемости больных РМЖ II—III стадии, в комплексном лечении которых применяли иммуномодулятор из *Lactobacillus Delbrueckii*, установлено повышение общей и безрецидивной выживаемости по сравнению с данными в контрольной группе пациентов на 13 и 10% соответственно [13].

Клинические испытания эффективности лиастена в комплексном лечении 33 больных с острыми и хроническими воспалительными заболеваниями бронхолегочной системы в фазе обострения показали хорошую переносимость препарата, сокращение курса антибиотикотерапии и время пребывания в стационаре на 1,5-2 дня, уменьшение количества обострений. Исследователи объясняют эффективность препарата неспецифической стимуляцией клеточного звена иммунитета и фагоцитарной системы посредством повышения продукции ИЛ-1 [20].

Стимуляцией клеточного и гуморального звена иммунитета объясняется также положительный эффект лиастена в комплексном лечении больных с тяжелыми ожогами и впервые диагностированного деструктивного туберкулеза легких [46, 56].

Лекарственное средство **полимурамил** выпускается в виде раствора для внутримышечного введения и представляет собой комплекс мурамилпептидов, состоящий из трех основных компонентов:  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диаминопимелиновой кислоты (ГМтри),  $\beta$ -N-ацетил-D-глюкозаминил-(1 $\rightarrow$ 4)-N-ацетил-D-мурамоил-L-аланил-D-изоглютаминил-мезо-диамино-пимелоил-D-аланина (ГМтетра) и димера ГМтетра (диГМтетра), в котором мономерные остатки ГМтетра соединены амидной связью между карбоксильной группой терминального D-аланина одного остатка ГМтетра и  $\omega$ -аминогруппой мезо-диаминопимелиновой кислоты другого остатка ГМтетра [59].

Препарат применяется у взрослых одновременно с антибактериальными препаратами в комплексной терапии вторичных иммунодефицитных состояний, проявляющихся в виде хронических, вялотекущих, рецидивирующих инфекционно-воспалительных процессов кожи, мягких тканей; острых и хронических пиодермий, остеофолликулита, сикоза, глубокого фолликулита, карбункула, гидраденита, фурункулеза, абсцессов, импетиго; осложненных вторичной инфекцией дерматозов (атопического дерматита, экземы); для лечения и профилактики хирургических инфекций, в том числе послеоперационных гнойно-септических осложнений [59]. Во время 1-ой фазы клинических испытаний препарат показал хорошую переносимость и безопасность в дозе до 400 мкг при однократном введении и до 1 мг при курсовом введении. Полимурамил усиливает способность лейкоцитов крови вырабатывать активные формы кислорода и убивать *S. aureus*, вызывает повышение сывороточных уровней С-реактивного белка, а также цито- и хемокинов, участвующих во врожденном иммунном ответе (MIP-1 $\beta$ , MCP-1, IL-6) [59].

Во время последующих плацебо-контролируемых клинических испытаний II/III фазы у пациентов с гнойной хирургической инфекцией (n = 30 человек) ежедневное введение полимурамила в дозе 200 мкг внутримышечно в течение 5 дней способствовало нормализации температуры тела, сокращению выраженности болевых ощущений и общего дискомфорта. Компоненты

препарата являются лигандами рецепторов врожденного иммунитета NOD1 и NOD2 [137].

По данным лабораторного исследования препарат стимулирует компоненты иммунной системы, необходимые для борьбы с внеклеточными формами бактерий: повышение сывороточного уровня IgM, увеличение внутриклеточной бактерицидности лейкоцитов, фагоцитарного индекса нейтрофилов [58]. Полимурамил упоминается в двух патентах компании "Корус Фарм".

Таким образом, экспериментальные исследования и клинический опыт применения лекарственных средств на основе мурамилпептидов, воздействующих на рецепторы врожденного иммунитета и модулирующих продукцию ключевых цитокинов, говорят о возможности за их счёт влиять на возникновение и течение инфекционного процесса, вызванного различными патогенами, потенцировать действие противоопухолевых препаратов, регулировать соотношение популяций иммунокомпетентных клеток, влияя на патогенез заболевания.

В современных условиях, когда увеличивающееся количество микроорганизмов, устойчивых ко всем известным антибиотикам, угрожает существующему контролю за инфекционными процессами, и обычное хирургическое вмешательство может стать смертельным, иммуномодуляторы на основе мурамилпептидов приобретают основное преимущество в сравнении с другими лекарственными средствами: воздействуя не на возбудитель, а на иммунокомпетентные клетки организма, они активизируют каскад иммунных реакций, призванных защитить от патогена.

Возможность химической модификации мурамилпептидов представляет большие перспективы для получения новых лекарственных средств, эффективных как в борьбе с патогенами, так и в коррекции дисфункций иммунитета, возникающих вследствие аллергических, онкологических и других патологических процессов, что доказано включением мурамилпептидов в несколько тысяч патентов, зарегистрированных по всему миру. Наиболее подходящие аналоги – дисахаридсодержащие производные, не имеющие пирогенного эффекта.

Кроме того, мурамилпептиды, как фрагменты клеточных стенок бактерий, являются модельными соединениями для определения механизмов реализации врожденного и приобретенного иммунитета, с их помощью были идентифицированы NLR рецепторы, выявлена роль этих рецепторов в активации фактора транскрипции NFκB и последующей экспрессии генов, которые отвечают за процесс воспаления. Однако, при анализе клинической эффективности лекарственных средств на основе мурамилпептидов, выявляется как провоспалительная, так и противовоспалительная их активность. Например, полимурамил повышает сывороточный уровень С-реактивного белка и IL-6 [59], а глюкозаминилмурамилдипептид при лечении хронических гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей в сочетании с этиотропной антибактериальной терапией уменьшает выраженность воспалительного процесса [6]. Разнонаправленные процессы проявляются и при воздействии на изменение количества нейтрофилов и лейкоцитов в периферической крови [62, 34]. В частности, у пациентов с атопическим дерматитом препарат на основе мурамилпептида уменьшает количество нейтрофилов и лейкоцитов [62], а при терапии онкологических больных происходит увеличение лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови [62, 34]. Способность лекарственных препаратов на основе мурамилпептидов инициировать не только воспалительные реакции, но и противовоспалительные требует дальнейшего изучения.

### **1.3.2 – Лекарственные средства на основе липополисахаридов**

Среди лекарственных средств на основе ЛПС используются продигиозан, пирогенал и шигелвак.

Продигиозан был получен из непатогенного аэробного микроорганизма *Serratia marcescens*, ранее называвшимся *Bacterium prodigiosum* советскими учеными З.В. Ермольевой и Г.Е. Вайсбергом в 1958 [15, 21-23, 53]. Продигиозан эффективен при лечении бактериальных и вирусных инфекций, онкологических заболеваний и восстановления лимфопоэза после облучения, регенерации клеток печени [4, 8, 9, 25, 36, 37, 41, 68]. Продигиозан повышает эффективность вакцин, что позволило использовать его в качестве адьюванта [10].

Другое лекарственное средство – пирогенал, полученное на основе ЛПС, выделенного из микробных культур *Pseudomonas aeruginosa* и *E. typhosa* используется в виде раствора для инъекций, супозиторий и геля. Пирогенал стимулирует миграцию лейкоцитов в очаг повреждения тканей и может быть применен для коррекции первой фазы раневого процесса [52, 65]. Показана эффективность пирогенала в предоперационной подготовке к малым ампутациям стопы при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей [52, 65]. Оказалось, что у пациентов с синдромом диабетической стопы преобладает анергический и гиперергический тип клеточной миграции, наблюдается снижение местных защитных сил организма, содержание нейтрофилов снижено на 38% в сравнении со здоровыми добровольцами. Через 6 часов после введения пирогенала наблюдается существенное увеличение нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов в очаге травматического повреждения, сохранявшееся через 24 часа после введения пирогенала, что свидетельствует о смене гиперергического типа клеточной эмиграции на нормоергический [52, 65]. Пирогенал в составе комплексной терапии хронического бактериального простатита повышает эрадикацию возбудителей и способствует быстрому прекращению болевого синдрома [74]. Эффективность пирогенала доказана при использовании в педиатрии, а также при пиротерапии ряда заболеваний [19, 5], в частности, гепатита С, болезни Рейтера и псориатического артрита, ассоциированных с урогенитальным хламидиозом, заболеваний предстательной железы [71, 73-75].

Шигеллвак – вакцина на основе липополисахарида шигелл *Shigella sonnei* - формирует специфическую устойчивость к возбудителю, стимулирует появление специфических антител, обеспечивающих через 2-3 недели невосприимчивость к инфекции. Ежегодная иммунизация против дизентерии Зонне работников категории «группы риска» (работники молокоперерабатывающих предприятий, лечебно-профилактических учреждений, детских организованных коллективов и др.) позволила снизить заболеваемость дизентерией в несколько раз в одних регионах и полностью избавиться от данного заболевания в других [27, 51, 66]. Интересно, что процент взрослого населения с защитным титром антител

значительно превышает таковой у детей - 91,1% через 3 года после вакцинации. В то же время после вакцинации детей через 1 месяц только у 55,8% вырабатываются антитела с защитным титром [27].

Ведутся активные исследования влияния ЛПС при терапии онкологических заболеваний, атопического дерматита и астмы [127, 579, 642]. Подчеркивается, что на поверхности пыльцы растений находятся бактерии, компоненты которых, в том числе ЛПС, также вносят вклад в аллергическое воспаление. При этом у пациентов с атопической астмой наблюдается снижение рекрутирования воспалительных клеток в дыхательных путях после ингаляционной провокации эндотоксином по сравнению со здоровыми добровольцами [127], не оказывая влияние на показатели сердечно-сосудистой системы [567]. В то же время у здоровых добровольцев ингаляция 2 мкг ЛПС вызывает значительное нейтрофильное воспаление дыхательных путей [418].

Липополисахариды в норме обнаружены в крови здоровых людей и оказывают системное воздействие, обеспечивают поддержание иммунной системы в физиологическом тоне [50]. Это осуществляется за счет стимуляции экспрессии собственного рецептора TLR4, связывание с которым запускает активацию транскрипционных факторов NFκB и последующий синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов [694].

ЛПС также оказывает стимулирующее влияние на экспрессию NOD2 рецепторов, ответственных за связывание с мурамилпептидами и определение внутриклеточных патогенов [543].

Содержание ЛПС в крови здоровых людей составляет 3-10 пкг/мл; изменение этих значений наблюдается при серьезных патологических состояниях и может определяться в крови с помощью LAL-теста (LAL – *Limulus amoebocyte lysate*) и метода активированных частиц (МАЧ) [32, 60, 79, 211, 468]. При постоянной циркуляции ЛПС в крови обеспечивается также эндотоксиновая толерантность к ЛПС за счет фрагмента липида А [303]. Липополисахариды, выделенные из различных бактерий, гетерогенны по О-антигену, и могут использоваться для диагностики [35].

#### **1.4 – Биорегуляторы бактериального происхождения на основе антимикробных пептидов**

Рост антибиотикорезистентности бактерий, а также появление новых возбудителей инфекционных заболеваний актуализирует поиск новых стратегий в борьбе с патогенами. Использование антимикробных пептидов, вырабатываемых бактериями одного штамма, активных по отношению к близкородственным штаммам, называемых бактериоцинами, может помочь в лечении и профилактике социально значимых инфекционных заболеваний.

Преимуществом бактериоцинов перед другими антимикробными пептидами является их низкая токсичность по отношению к клеткам хозяина и специфические способы воздействия на бактериальные клетки, затрагивающие множественные процессы жизнедеятельности бактериальной клетки, затрудняющие появление резистентности. Возможность получения в прокариотических организмах заметно облегчает их получение и способствует их широкому применению. Хотя применение бактериоцинов ограничивается только в пищевой промышленности – низином – в виде консерванта E234, большое количество исследований микробицидных свойств бактериоцинов дает основание предполагать, что в обозримом будущем применение бактериоцинов будет расти в области медицины.

Для успешного применения бактериоцинов в медицине необходимо понимать особенности их воздействия на иммунную систему, особенно в случае ослабленного состояния из-за инфекционных процессов, онкологических, аллергических и аутоиммунных заболеваний. Анализ иммуномодулирующей активности исследованных бактериоцинов на животных моделях и клетках человека выявил их способность индуцировать как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы, задействованные в реализации врожденного иммунитета. Широкое применение бактериоцинов в пищевой промышленности, низкая токсичность, наличие соединений с широкой и узкой специфической являются серьезным основанием для привлечения внимания исследователей к

иммуномодулирующим свойствам бактериоцинов с целью поиска возможностей их медицинского применения.

Более трех миллионов американцев страдают от инфекций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами [156]. Бесконтрольное использование антибиотиков в сельском хозяйстве и медицине приводит к появлению устойчивых к антибиотикам бактериальных патогенов в сточных водах [675].

При выяснении основных путей и динамики распространения бактерий, устойчивых к противомикробным препаратам между людьми, животными и окружающей средой, отмечается, что остатки антибиотиков, применяемых в сельском хозяйстве, оказывают избирательное давление на бактериальные сообщества в системе почва-растение, что в свою очередь, способствует возникновению и распространению генов устойчивости к антибиотикам посредством горизонтального переноса генов.

Помимо горизонтального переноса генов распространение антибиотикорезистентности осуществляется за счет везикул наружной мембраны грамотрицательных бактерий, конъюгации между плазмидами, трансдукции бактериофагами и естественной трансформации внеклеточной ДНК, что позволяет генетическому материалу перемещаться между штаммами и видами [188, 403].

С целью ограничения распространения и появления новых антибиотикорезистентных штаммов используются различные подходы, ограничивающие использование антибиотиков в сельском хозяйстве и медицине [549].

Разрабатываются новые стратегии борьбы: вакцины, антитела, лиганды рецепторов распознавания образов, пробиотики, экстракты растений, использование бактериофагов, фитохимических веществ, наночастиц серебра и хитозана, антимикробных ферментов и пептидов [120, 189, 691].

Одной из таких стратегий является использование бактериоцинов, субстанций с антимикробным действием, производимых бактериями.

### 1.4.1 – Источники, организация генов и биосинтез бактериоцинов

Бактериоцины — это продуцируемые бактериями антибиотики пептидной или белковой природы, действующие, в отличие от всех других антибиотиков, только на штаммы одного и того же или близкородственного вида.

История изучения бактериоцинов начинается в 1925 году, когда А. Gratia наблюдал ингибирование *Escherichia coli*  $\phi$  штаммом *E. coli* V, а затем Р. Fredericq детально описал и внедрил понятие «колицин» для бактериоцинов, продуцируемых *E. coli* [190]. Впоследствии определение бактериоцинов было уточнено, и в настоящее время считается, что это продуцируемые бактериями, синтезированные на рибосомах пептиды, которые активны против других бактерий и против которых продуцент имеет специфический механизм иммунитета. К преимуществам бактериоцинов относится низкая токсичность, специфический механизм действия; некоторые бактериоцины стабильны при низком рН, высокой температуре и в широком диапазоне концентраций соли [350, 358].

Обычно бактериоцины состоят из 20-60 аминокислот, имеют положительный заряд и обладают гидрофобными свойствами. Показано, что протеазы и пищеварительные ферменты разрушают бактериоцины, что ограничивает их пероральное использование [135].

С целью сохранения их активности разрабатываются различные способы доставки, например, в составе липосом, инкапсуляция, включение в таблетки, покрытые оболочкой, в матрицы на основе крахмала, а также химическая модификация, например, С-конца с целью защиты от протеолитических [105].

Бактериоцины синтезируются чаще всего в форме предшественника с дальнейшей модификацией N-конца. Клетки, продуцирующие бактериоцины, имеют несколько стратегий защиты от литического действия собственных бактериоцинов, среди которых – наличие специальных белков или системы насосов, выводящих их из клетки, а иногда комбинацию этих стратегий [204].

Гены бактериоцинов в основном располагаются кластерами, которые кроме гена бактериоцина, также содержат один или несколько белков иммунитета для

предотвращения самоубийства бактерии. Показано расположение генов бактериоцинов как на хромосомах, так и на плазмидах.

Бактериоцины продуцируются всеми известными грамположительными и грамотрицательными бактериями, а также археями, причем известно, что некоторые бактерии продуцируют несколько разных бактериоцинов, активных против многих патогенных бактерий [233, 318, 359, 493]. Примечательно, что бактериоцины грамположительных бактерий обладает узким спектром действия и активны в отношении других грамположительных бактерий, в то время, как грамотрицательные бактерии могут продуцировать бактериоцины с более широким спектром действия [190, 359, 493].

В настоящее время описано несколько сотен бактериоцинов. Считается, что 99% всех бактерий могут вырабатывать бактериоцины, причем многие из них могут производить более одного бактериоцина, большинство из которых до сих пор не известно [386].

Бактерии, продуцирующие бактериоцины, находятся повсеместно: в воде, почве, на кожных покровах и слизистых человека и животных, а также в пищевых продуктах и растениях. Считается, что, морская среда является одним из самых богатых ресурсов для извлечения морских микробных бактериоцинов. Изначально основное внимание исследователей было направлено на изучение таких источников, как пищевые продукты и животные [372, 708].

В последние годы особенно активно исследуются бактерии, населяющие слизистые ротовой полости человека, в том числе желудочно-кишечный тракт, включая *Lactobacillus*, *Enterococcus* и *Streptococcus* [374].

Известно, что молочнокислые бактерии (LAB) продуцируют различные нетоксичные бактериоцины, устойчивые к рН и обладающие широким спектром антимикробной активности. Бактериоцины молочнокислых бактерий не оказывают неблагоприятного воздействия на микробиоту кишечника, так как чувствительны к пищеварительным протеазам хозяина – химотрипсину и трипсину [135]. Наиболее распространенными продуцентами бактериоцинами в сыром молоке являются *Brevibacillus brevis* и *Bifidobacterium lactis*; в йогурте и

ферментированных соевых продуктах *L. acidophilus*, *L. plantarum* в сыре и козьем молоке [135].

В молочных продуктах наиболее распространенными штаммами молочнокислых бактерий являются *L. brevis* *Lactococcus lactis* и *L. plantarum* в верблюжьем и козьем молоке, *L. kefiranofaciens* в кефире и *S. thermophilus* и *L. brevis* LSe - в других молочных продуктах. Как правило, *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Streptococcus* являются преобладающими пробиотическими бактериями в молочных продуктах. *L. plantarum* subsp. *plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, и *L. fermentum* наиболее распространены в приготовленных мясных продуктах и останавливают рост *L. monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, и *S. Aureus* посредством бактериоцинов [374].

Молочнокислые бактерии *L. brevis* LAP2, *L. plantarum* и *E. faecium* HL7 из морепродуктов проявляют ингибирующую активность в отношении патогенов рыб и человека [374]. Планктонные бактерии *Aeromonas*, *Alteromonas* и *Vibrio*, обитающие в морях и океанах, также вырабатывают бактериоцины с активностью против антибиотико-резистентных штаммов [258].

В свежих овощах и фруктах из молочнокислых бактерий наиболее представлены *L. brevis*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus plantarum*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* и *E. durans* [190, 258].

#### **1.4.2 – Механизм действия на микроорганизмы**

Биологическую активность бактериоцины реализуют различными способами в зависимости от их структурных и физико-химических свойств, а также посттрансляционных модификаций. Большинство бактериоцинов имеют катионную природу и взаимодействуют с отрицательно заряженными компонентами бактериальной мембраны за счет электростатических сил аналогично катионным антимикробным пептидам многоклеточных организмов [190, 301, 258].

Электростатическое взаимодействие осуществляется с отрицательно заряженными тейхоевыми кислотами и фосфолипидами грамположительных

бактерий или липополисахаридами грамотрицательных бактерий, а также с липидом II - предшественником пептидогликана грамположительных и грамотрицательных бактерий, и является первым этапом проявления как неспецифической, так и специфической активности [190].

На следующем этапе может происходить образование пор, ионопроницаемых каналов и гибель клетки [190]. Лизис клеток может наступать также из-за высвобождения аутолитических ферментов, связанных с липотейхоевыми кислотами [386].

Другой способ - проникновение в бактериальную клетку, используя разнообразные транспортеры, с помощью которых в клетку поступают необходимые питательные вещества, обеспечивающих жизнедеятельность бактерий [190].

Некоторые бактериоцины грамположительных бактерий, в частности, низин, гарвицин ML, лактококцин G и субланцин 168 используют для проникновения в клетку цинк-зависимые металлопептидазы, ABC-переносчики мальтозы и ундекапренил пирофосфатфосфатазы [190].

Колицины грамотрицательных бактерий, для проникновения в клетку через две липидные мембраны клеточной оболочки используют в качестве рецепторов липополисахарид и трансмембранные белки во внешней мембране, которые участвуют в импорте питательных веществ и ионов металлов, таких как витамины, сахара и  $Fe^{3+}$ . После проникновения в периплазму колицины взаимодействуют с белком транслокатором, который помогает установить взаимодействие с белками, называемыми Tol или Ton в периплазме хозяина с последующим проникновением в цитоплазму клетки. [190].

Примечательно, что одноцепочечная ДНК, связанная с колицином, может транспортироваться в периплазму бактерий. Обнаруженные транспортные пути колицинов могут быть использованы бактериями для переноса больших молекул, например, при конъюгации [185].

Было установлено, что бактериоцины и грамположительных, и грамотрицательных бактерий могут использовать фосфотрансферные системы

транспорта сахаров для проникновению в клетку [190]. После проникновения в бактериальную клетку бактериоцины могут вызывать деграцию ДНК и РНК, ингибировать репликацию, транскрипцию и синтез белка за счет специфического расщепления 16s рРНК, а также останавливать синтез клеточной стенки бактерий. В частности, микроцин С, микроцин J25 и микроцин В17 связывают и ингибируют Asp-тРНК-синтетазу, РНК-полимеразу и ДНК-гиразу, соответственно, которые были идентифицированы как их непосредственные мишени [233]. Руминококцин С, выделенный из бактерии *Ruminococcus gnavis* микробиоты человека, препятствует синтезу нуклеиновых кислот, не нарушая мембраны бактерий-мишеней [179].

Несмотря на многообразие возможных механизмов антимикробных стратегий, образование пор в мембране клетки-мишени является наиболее распространенной. При этом бактериоцины обладают бактериостатическим или бактерицидным спектром действия, которое в основном направлено против бактерий, тесно связанных со штаммом-продуцентом и в редких случаях против широкого круга бактерий [190].

Следует отметить, что некоторые представители бактериоцинов используют сразу несколько способов воздействия на бактериальную клетку, что заметно затрудняет противостояние им бактерий и появление резистентности.

Устойчивость к бактериоцинам может быть естественной или приобретенной, появляющаяся у ранее нечувствительных штаммов. Обнаружено, что до 8% штаммов *L. monocytogenes* дикого типа обладают природной устойчивостью к педиоциноподобным бактериоцинам, в частности к педиоцину РА-1 с сохранением чувствительности к низину. Естественная и приобретенная резистентность к бактериоцинам может появляться и исчезать в результате мутаций генов, ответственных за чувствительность. Для штаммов, не производящих бактериоцины, распространенной стратегией защиты является синтез внеклеточных протеаз и пептидаз. Например, *E. Faecalis* секретирует желатиназу для инактивации педиоциноподобных бактериоцинов [572].

Приобретенная устойчивость может вырабатываться с помощью многочисленных стратегий, включающих снижение проницаемости мембран за счет увеличения гидрофобности, синтеза бактериальной клеточной оболочки или цитоплазматической мембраны [190]. В частности, резистентность к низину у *L. monocytogenes* возникает с изменением состава жирных кислот, входящих в мембрану, а у *Clostridioides difficile* происходит реорганизация клеточной оболочки и выраженные изменения в центральных клеточных процессах, таких как углеводный обмен и увеличение количество жгутиков на клетку [429]. Обнаружено, что некоторые бактериальные штаммы одновременно могут приобретать несколько способов устойчивости, что приводит к общему фенотипу резистентности [415].

Понимание механизмов образования защиты от бактериоцинов необходимо для разработки новых стратегий клинического применения бактериоцинов с учетом возможных негативных воздействий образовавшихся резистентных штаммов.

#### **1.4.3 – Биодоступность и безопасность бактериоцинов**

С момента обнаружения бактериоцинов основное внимание исследователей было направлено на определение их антимикробной активности, однако бактериоцины воздействуют не только на представителей микробиологического сообщества, но и на эукариотические клетки [233, 425].

Для клинического применения бактериоцинов в качестве антимикробных лекарственных средств необходимы исследования их биодоступности, безопасности и клинической эффективности. Для предупреждения побочных эффектов необходимо также понимание механизмов воздействия на ткани и органы при местном применении, а также на иммунокомпетентные клетки при системном воздействии [110, 138].

Для оценки биодоступности при пероральном применении необходима оценка трансэпителиального транспорта и влияния протеолитических ферментов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) на сохранение биологической активности

бактериоцинов. В связи с исследованным механизмом действия низин является эталоном сравнения при анализе других бактериоцинов [133, 171, 348].

С целью определения возможности миграции бактериоцинов через эпителиальные клетки желудочно-кишечного тракта и эндотелиальные клетки сосудов определяли транспорт флуоресцентно меченных бактериоцинов - низина, плантарицина 423 и bacST4SA через клетки аденокарциномы толстой кишки (Caco-2) и эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) *in vitro* [457]. Было обнаружено, что через 3 часа 75% низина, 85% плантарицина 423 и 82% bacST4SA мигрировали через монослой клеток Caco-2. За тот же промежуток времени 88% низина, 93% плантарицина 423 и 91% bacST4SA мигрировали через монослой HUVEC [457].

Отмечается, что жизнеспособность обоих типов клеток оставалась неизменной при воздействии 50 мкМ низина, плантарицина 423 или bacST4SA. При этом влияние плазмы человека на активность бактериоцинов зависела от структуры и концентрации бактериоцинов, среди протестированных соединений низин был менее стабильным. Это исследование представляет собой одно из первых доказательств того, что бактериоцины способны преодолевать кишечного-гематологический барьер [457].

При пероральном применении необходимо оценить сохранение активности бактериоцинов при действии ферментов ЖКТ. Исследования на лабораторных и сельскохозяйственных животных показали, что многие бактериоцины расщепляются и инактивируются протеолитическими ферментами в желудке и тонком кишечнике, такими как пепсин, трипсин и химотрипсин [386].

Оказалось, что бактериоцины без посттрансляционных модификаций очень чувствительны к кишечным протеазам, что снижает их антимикробную активность при пероральном употреблении. Исследование биологической стабильности педиоцина ПА-1 в условиях верхних отделов ЖКТ с использованием динамической модели *in vitro* показали, что педиоцин был стабилен в желудке, но полностью разложился при воздействии условий, эквивалентных условиям, обнаруженным в тонкой кишке. Бактериоцины с

посттрансляционными модификациями в целом более устойчивы к протеазам, однако низин А инактивируется и переваривается кишечными протеазами.

Первоначальные исследования стабильности микроцина J25, проведенные, показали его устойчивость к перевариванию протеолитическими ферментами, присутствующими в желудке и кишечном содержимом [190]. Однако, впоследствии исследовали деградацию микроцина J25 с использованием как динамических, так и статических моделей пищеварения, связанных с антибактериальными анализами, ЖХ-МС/МС и анализом молекулярных сетей и установили, что хотя микроцин J25 удивительно стабилен в экстремальных условиях из-за своей топологии лассо, он деградировал под действием панкреатической протеазы эластазы, и потерял свою противомикробную активность [135, 386]. С целью сохранения биологической активности бактериоцинов разрабатываются их структурные модификации с помощью биоинженерных способов, а также способов доставки в тонкий и толстый кишечник, где осуществляется действие бактериоцинов [190, 135, 386].

В случае местного применения включение бактериоцинов, в том числе в состав гидрогелей и наночастиц, заметно повышает эффективность терапии при заживлении ран и в борьбе с инфекциями слизистых человека и животных [199, 200]. Кроме того, бактериоцины, в частности низин, наносят на сплавы на основе титана, такие как Ti6Al4V, обычно используемые для медицинских имплантатов, и его версия Ti6Al4V-ELI со сверхнизким междоузлем с улучшенной вязкостью разрушения и коррозионной стойкостью, используемым в ортопедии [603]. Проблемы, связанные с инфекцией, острым и хроническим воспалением, расшатыванием имплантата и его несостоятельностью могут быть решены нанесением на ортопедические материалы бактериоцинов [603].

С целью повышения растворимости бактериоцинов исследуются различные растворители [240]. В частности, при анализе эффективности низина в способности воздействовать на клетки остеосаркомы MG63 среди четырех растворителей: воды, диметилсульфоксида, метанола и уксусной кислоты было обнаружено, что низин в 0,05 % уксусной кислоты при концентрациях  $\geq 800$

мкг/мл способствовал апоптозу MG-63. При этом в уксусной кислоте, ДМСО и метаноле при концентрации 0,05 % более 90% клеток сохраняли жизнеспособность [240].

Исследования безопасности бактериоцинов показали их низкую токсичность и гемолитическую активность. Например, цитотоксичность низина в несколько раз превышает минимальную ингибирующую концентрацию [148]. Турицин Н, проявляющий ингибирующую активность в отношении *B. cereus*, *Bt Cry - B*, *E. faecium* дикого типа и *E. faecium* ATCC, но не против *Bt Cry- B/pThurH* и *Bt Cry -B/pThurHΔThnA* не обладает гемолитической активностью при концентрации 20 мкг/мл, в четыре раза превышающей минимальную ингибирующую концентрацию. Полученные данные закладывают основу для потенциально безопасного использования турицина Н в качестве антибактериального пептида для медицинского применения [644].

Большинство бактериоцинов нетоксичны для эукариотических клеток, однако, было установлено, что при высоких концентрациях энтерококковый цитолизин проявляет токсичность. Бактериоцин Ba49, из *Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain Ba49*, обитающих на репчатом луке *Allium cepa*, демонстрирует низкую токсичность на трех клеточных линиях млекопитающих HEK 293T, RAW 264.7 и L929 в концентрациях, в несколько раз превышающих МИК [134].

Другой бактериоцин AS-48, продуцируемый *Enterococcus faecalis* и активный в отношении ряда грамположительных бактерий, в том числе в отношении *Mycobacterium tuberculosis*, не проявляет цитотоксичность в отношении клеточных линий макрофагов THP-1, MHS и J774.2 в концентрациях, близких к его МИК [604].

Таким образом, необходимы исследования токсичности бактериоцинов для разработок лекарственных средств на их основе. Также важно установление потенциальной резистентности к бактериоцинам при многократном использовании.

#### 1.4.4 – Иммуномодулирующая активность бактериоцинов

Проведены многочисленные исследования бактерицидных, бактериостатических, противовирусных, противопаразитарных и противоопухолевых свойств бактериоцинов [135]. В то же время иммуномодулирующая активность бактериоцинов представлена отдельными исследованиями, не позволяющими в целом охарактеризовать их иммуномодулирующее и аллергизирующее действие [135, 171]. Тем не менее, проведенные исследования дают основание предполагать, что биологическая активность бактериоцинов может быть в некоторой степени сходна механизмом действия антимикробных пептидов человека на основании сходных физико-химических свойств [301].

Например, было обнаружено, что лантибиотик низин Z индуцирует секрецию хемокинов MCP-1, Gro- и IL-6 в мононуклеарных клетках периферической крови человека дозозависимым образом (концентрации низина Z 50, 100, 150 г/мл), при этом низин Z значительно снижает индукцию TNF- в ответ на бактериальный ЛПС (концентрация 2 нг/мл) РВМС [425]. Опосредованная низином Z секреция IL-6 заметно снижается после ингибирования сигналов передачи от митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) и специфического рецептора тирозинкиназы. Ингибирование p38 (SB-202190), киназы МАРК (МЕК) (U-0126), компонентов МАРК, регулируемых внеклеточными сигналами (ERK1/2) (с-Raf) ZM 336372, а также киназы семейства Src (PP1 и PP2) значительно снижает продукцию IL-6 под действием низина Z. Это предполагает сильную корреляцию между передачей сигналов ERK/МАРК и индукцией иммуномодулирующих ответов низином Z [425].

При этом в моделях заражения мышей низин Z обеспечивает защиту как от грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, так и грамотрицательных *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium* и *Escherichia coli*. Авторы делают вывод, что низин Z модулирует иммунитет хозяина с помощью механизмов, сходных с природными защитными пептидами хозяина, задействуя множественные пути передачи сигнала и рецепторы факторов роста [425].

У мышей при кратковременном приеме низина с пищей наблюдается повышение уровня CD4 и CD8 Т-лимфоцитов при одновременном снижении уровня В-лимфоцитов. После длительной диеты количество Т-клеток вернулось к контрольному уровню [110]. Период применения низина составлял 30, 75 или 100 дней. Кроме того, показано, что низин разрушает патогенные биопленки полости рта и восстанавливает состав микробиома до здорового уровня в условиях периимплантита [110]. Авторы приходят к выводу, что низин является перспективным средством в лечении воспалений пародонта и периимплантита [110].

Низин эффективен при местном применении на слизистых оболочках благодаря своей способности восстанавливать структуру эндометрия на крысиной модели и нормализовать количество нейтрофилов до контрольного уровня, повышать уровни IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-8 и ингибируют образование биопленок *Staphylococcus aureus* [110].

Кроме того, оказалось, что низин значительно снижает не только уровни некоторых пародонтальных патогенов, но и потерю альвеолярной кости, а также местную и системную воспалительную реакцию хозяина. При этом низин увеличивает популяцию фибробластов и остеобластов и опосредует пролиферацию клеток периодонтальной связки человека дозозависимым образом за счет увеличения маркера пролиферации Ki-67 [481].

Было обнаружено, что низин значительно увеличивает выживаемость мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из костного мозга человека *in vitro* [385]. Мезенхимальные стволовые клетки применяются для трансплантации, но их низкая выживаемость после трансплантации является существенным недостатком [385]. Выживаемость и противовоспалительное действие низина оценивали путем культивирования МСК на фоне воздействия H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> или в бессывороточной среде с использованием МТТ-анализа, ИФА и ПЦР в реальном времени. Установлено, что 250 и 500 МЕ/мл низина оказывает значительное антиапоптотическое воздействие на МСК, увеличивая жизнеспособность и пролиферацию клеток. Повышается экспрессия генов IL-10, FGF-2 и TGF- $\beta$ , что

указывает на то, что низин может обладать противовоспалительным действием [385]. При лечении ран мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) важным ограничением является то, что МСК чувствительны и недолговечны в условиях стресса [385]. Предварительное кондиционирование эффективно для повышения клеточной резистентности и выживаемости, а низин является хорошим выбором, поскольку низин улучшает стабильность МСК. Долгоживущие МСК производят больше противовоспалительных и меньше воспалительных цитокинов и факторов роста, которые помогают восстановлению клеток и дифференцировке в фибробласты в месте повреждения ткани [385].

Низин демонстрирует противоположные провоспалительные эффекты на не стимулированные и стимулированные РВМС свиней [422]. Низин в концентрации 50 мкг/мл проявлял пролиферативную активность, увеличивая продукцию IL-1 $\beta$  и IL-6 и увеличивая процентное содержание CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Т в РВМС свиней. После стимуляции клеток *E. coli* низин проявляет антипролиферативную активность, уменьшает фагоцитоз и ингибировал синтез IL-6 [422].

Зоонозный патоген *Staphylococcus pseudintermedius* 222, способный инфицировать человека, продуцирует немодифицированную форму бактериоцидина BacSp222, а также две посттрансляционно модифицированные формы посредством сукцинилирования и расщепления формилметионина [133]. Продукция таких модифицированных форм происходит в ответ на изменения окружающей среды, защищает клетки бактерий-продуцентов от аутоксичности секретируемого бактериоцидина и ограничивает патогенность штамма. В исследовании изучалось влияние этих трех бактериоцинов и низина А, использованного в качестве эталона, на мышинные моноцитарно-макрофагоподобные и мышинные линии эндотелия головного мозга, а также на полиморфно-ядерные нейтрофилы человека [133]. Результаты показали, что все протестированные соединения BacSp222 увеличивают выработку NO и экспрессию индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) в сочетании с IFN- $\gamma$  в моноцитарно-макрофагоподобных клеточных линиях P388.D1 и RAW 264.7, но не потенцируют выработку NO эндотелиальными клетками. Более того, все

природные формы BacSp222, как отдельно, так и вместе с IFN- $\gamma$  стимулируют выработку TNF- $\alpha$ , MCP-1 и IL-1 $\alpha$  [133].

Эти исследования на мышинных моноцитарно-макрофагальных клетках показали, что бактериоцин BacSp222 и его формы активируют фактор транскрипции NF- $\kappa$ B, что приводит к увеличению экспрессии белков, связанных с воспалением, таких как iNOS и TNF $\alpha$  [133]. Напротив, продукция IFN- $\beta$  увеличивается после воздействия на клетки всех форм бактериоцина в присутствии IFN- $\gamma$ . Однако низин А не вызывает каких-либо изменений в продукции изученных цитокинов (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-23, IL-27, GMCSF), IFN- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) и не влияет на продукцию NO и экспрессию iNOS независимо от присутствия или отсутствия IFN- $\gamma$  на мышинных моноцито-макрофагоподобных клеточных линиях. В нейтрофилах человека все формы бактериоцина BacSp222 повышают экспрессию IL-8, но не индуцируют продукцию АФК или образование нейтрофильных внеклеточных сетей. Напротив, низин А (1 мкМ низина А в течение 4 ч) не стимулирует выработку IL-8 РВМС человека, а также не индуцирует продукцию АФК или образование нейтрофильных внеклеточных сетей. BacSp222 усиливает экспрессию iNOS только в макрофагах, но не в эндотелиальных клетках. Примечательно, что во всех экспериментах деформированный бактериоцин проявляет меньшую активность по сравнению с другими формами пептида. BacSp222 и его сукцинилированная форма могут быть признаны новым пептидным индуктором продукции NO иммунными клетками [133].

Интересно, что влияние низина А на активацию нейтрофилов в эксперименте других исследователей выявляет способность образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (NETs) [348].

В частности, анализ цитотоксичности на основе МТТ демонстрирует цитотоксичность низина в отношении клеток Jurkat Т-клеточной лимфомы человека, клеток Molt-4 и свежекультивированных лимфоцитов человека при концентрации более 200 мкМ. С помощью сканирующего электронного микроскопа и флуоресцентной микроскопии продемонстрирована способность

низина А в концентрациях 75 мкМ и 150 мкМ активировать нейтрофилы с образованием сетей, хорошо известных своей способностью нейтрализовать факторы вирулентности и уничтожать бактериальные патогены. Кроме того, присутствие низина также повышает внутриклеточный уровень супероксида, который обычно вырабатывается активированной НАДФН-оксидазой и является предпосылкой для образования NETs [348].

Таким образом, сравнение данных, полученных J. Śmiałek и D. Begde с коллегами, показывает, что низин А в концентрации 1 мкМ не оказывает влияния на образование NETs, тогда как в концентрациях 75 мкМ и 150 мкМ наблюдается образование NETs [133, 348].

В исследовании по изучению иммуномодулирующей активности субланцина, выделенного из *Bacillus subtilis* 168, в мышинных макрофагах и нейтрофилах наблюдается повышение уровней хемокинов CXCL1 и MCP-1 и снижение продукции TNF- $\alpha$  [599]. Однако субланцин увеличивает выработку IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , оксида азота, фагоцитарную и микробицидную активность против метициллин-устойчивых *Staphylococcus aureus* (MRSA) в мышинных перитонеальных макрофагах и клетках RAW264.7 [248].

Пероральное введение субланцина (1,0 мг/кг массы тела) приводит к увеличению экспрессии мРНК IL-1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$  в селезенке мышей BALB/c, включая мышей с иммуносупрессией, получавших циклофосфамид, и ускоряет восстановление периферических лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина и тромбоцитов при одновременном повышении фагоцитарной активности макрофагов, которая снижается после лечения циклофосфамидом [674]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что субланцин играет решающую роль в защите от иммуносупрессии у мышей, получавших циклофосфамид, и может быть потенциальным кандидатом для использования в иммунотерапии [674]. В результате исследования выяснилось, что активация макрофагов субланцином в некоторой степени осуществляется через TLR4 при участии NF- $\kappa$ B и MAPK. При пероральном введении мышам субланцин увеличивает количество Т-лимфоцитов CD4 и CD8 в мезентериальных

лимфатических узлах, что указывает на его способность оказывать иммуномодулирующее действие путем активации макрофагального и Т-клеточного иммунитета [674].

При исследовании бактериоцин-продуцирующих штаммов *Lactiplantibacillus plantarum* было обнаружено, что *L. plantarum* YRL45 значительно снижает повышенные уровни IL1 $\beta$ , IL6, TNF $\alpha$ , оксида азота и простогландина E2, индуцированных липополисахаридом в клетках RAW264.7, уменьшая таким образом тяжесть воспалительного процесса [568]. Кроме того, *L. plantarum* F3-2 значительно повышает в поврежденных клетках кишечного эпителия уровни экспрессии ZO-1, окклюдина и клаудина 1, участвующих в образовании межклеточных контактов, что необходимо для поддержания целостности эпителия [568].

Другой бактериоцин, AS-48, продуцируется разными штаммами *Enterococcus*, снижает выработку оксида азота, индуцированную ЛПС (до 13,5 мкМ) (>96,51 мкг/мл) на макрофагах RAW, и демонстрирует отсутствие провоспалительных эффектов [212].

Энтероцин DD14 (Ent DD14), продуцируемый штаммом *Enterococcus faecalis* 14, выделенным из мекония новорожденных, оказывает противовоспалительное действие на секрецию провоспалительных интерлейкинов, в том числе IL-6 и IL-8. Результаты показывают, что EntDD14 способен значительно снижать секрецию обоих интерлейкинов на клетках Caco-2 после их обработки ЛПС [104].

Тиострептон представляет собой рибосомально синтезируемый и посттрансляционно модифицированный пептид (RiPP), продуцируемый бактериями рода *Streptomyces*. Сообщалось, что тиострептон проявляет активность против грамположительных бактерий и различных раковых клеток человека [297]. Этот бактериоцин охарактеризован как мощный химический ингибитор онкогенного фактора транскрипции FoxM1, который часто сверхэкспрессируется при раке или других заболеваниях [637]. Механизм действия был определен посредством активации белков теплового шока HspA1A,

Hsp70, Hsp90 $\alpha$  или Hsp105 и запуска апоптоза в раковых клетках человека [641]. Тиострептон ингибирует активацию TLR7-9 в дендритных клетках мыши и не ингибирует активацию NF- $\kappa$ B, индуцированную TNF- $\alpha$ , IL-1 и другими TLR, поскольку он ингибирует локализацию TLR9 в эндосомах посредством ингибирования протеасом и эндосомального закисления. Более того, в различных моделях на мышах тиострептон ослабляет псориазоподобное воспаление, вызванное LL37 и имихимодом. Исследователи пришли к выводу, что тиострептон является новым ингибитором TLR7-9, что указывает на потенциальное терапевтическое применение тиострептона при иммунологических нарушениях, вызванных активацией TLR7-9 [340].

В дополнение к исследованиям *in vitro* и *in vivo* иммуномодулирующая активность бактериоцинов исследуется с помощью сравнительного геномного анализа. Генетический анализ генов, изученных из четырех штаммов *Lactobacillus*, показал, что *L. plantarum SK151* показывает наибольшее количество генов с потенциальной иммуномодулирующей активностью - 74. В *L. johnsonii PF01* идентифицировано 41 ген, охватывающей как иммунную активацию, так и иммуносупрессию, по сравнению с *L. mucosae LM1* и *L. fermentum SK152*, которые могут быть более эффективными в активации иммунных клеток и провоспалительного каскада, чем в его подавлении [349].

Иммуномодулирующая активность бактериоцинов определяется их структурными особенностями, а наличие N-формилметионина способствует проявлению провоспалительной активности. В то же время наличие N-формилметионина не является существенным для микробицидной активности [411, 581].

Действие бактериоцинов на иммунокомпетентные клетки находится в прямой зависимости от концентрации. На примере бактериоцина низина показано изменение профиля активности от нейтрального к провоспалительному с увеличением концентрации.

Разнообразие эффектов бактериоцинов на иммунные клетки зависит не только от структуры и концентрации, но и от контекста их применения [104, 425].

Так, бактериоцин низин в отсутствие дополнительных стимулов не влиял на продукцию IL-8 и TNF $\alpha$ , тогда как в присутствии ЛПС TNF $\alpha$  снижался, а IL-8 повышался. В то же время совместное действие низина и IFN $\gamma$  не влияло на продукцию TNF $\alpha$  [425]. Большинство бактериоцинов, в том числе и низин, теряют активность под действием ферментов желудка и кишечника. Однако оказалось [386], что пероральное введение бактериоцина низина оказало влияние на соотношение Т- и В-клеток в селезенке и лимфатических узлах мышечной ткани [110]. Объяснение могло заключаться в том, что бактериоцин начинает действовать уже в полости рта, воздействуя на иммунные органы [110].

Таким образом, анализ иммуномодулирующей способности показал, что бактериоцины оказывают влияние на врожденный иммунитет. Например, некоторые бактериоцины могут индуцировать продукцию активных форм кислорода, оксида азота, фагоцитоз и образование NETs; другие не влияют и даже подавляют воспаление [104, 348, 523, 674].

Способность бактериоцинов увеличивать количество Т-лимфоцитов, одновременно уменьшая количество В-лимфоцитов и индуцируя выработку цитокинов и хемокинов, позволяет также модулировать приобретенный иммунитет [110, 248]. Более того, очевидно, что бактериоцины могут регулировать воспаление, индуцируя провоспалительные факторы при инфекции или иммуносупрессии и подавляя провоспалительные цитокины в условиях чрезмерного воспаления [104, 133, 523, 568, 674].

Обнаруженные свойства бактериоцинов оказывать модулирующее действие на иммунокомпетентные клетки раскрывает их потенциал как возможных иммуномодуляторов, а цитотоксическая активность против некоторых опухолей и открывает перспективы их применения в составе комплексной терапии в онкологии [297]. Преимуществами бактериоцинов перед другими лекарственными средствами является высокая активность в наномолярном диапазоне, низкая токсичность, стабильность некоторых бактериоцинов при низком рН, высокой температуре и специфические механизмы действия [135, 350, 358].

Кроме того, бактериоцины могут продуцироваться пробиотиками, регуляция состава которых в желудочно-кишечном тракте может предотвратить распространение кишечных инфекций, представляющих серьезную проблему в медицинских стационарах [156, 677]. Для получения бактериоцинов могут использоваться прокариотические системы, методы биоинженерии, что заметно сокращает стоимость производства в сравнении с антимикробными пептидами эукариот [171]. Существование бактериоцинов, как широкого, так и узкого спектра действия, может служить платформой для разработки комплексных и персонализированных способов терапии [144].

Широкое применение бактериоцинов в пищевой промышленности, низкая токсичность, наличие соединений с широкой и узкой специфической является серьезным основанием для привлечения внимания исследователей к иммуномодулирующим свойствам бактериоцинов с целью поиска возможностей их медицинского применения. Для определения направлений медицинского применения бактериоцинов необходимо подробно изучить их действие на клетки – мишени, а также иммуномодулирующую активность на различных популяциях иммунокомпетентных клеток.

Важным аспектом является также вопрос безопасности применения микробных компонентов или продуктов их метаболизма в качестве лекарственных средств. Необходимо тщательное изучение возможных побочных эффектов и долгосрочных последствий для обеспечения их безопасности и эффективности.

Таким образом, биорегуляторы бактериального происхождения играют ключевую роль в поддержании здоровья и гомеостаза организма человека, участвуя в широком спектре физиологических процессов. Они являются неотъемлемой частью сложной сети взаимодействий между различными системами организма, включая пищеварительную, эндокринную, иммунную и нервную системы.

Существует большое количество публикаций, объясняющих противoinфекционную защиту компонентов клеточных стенок бактерий

формированием «тренированного иммунитета» [658], способного быстро и адекватно среагировать на патоген с целью обеспечения гомеостаза. Однако внимание в них уделяется активации провоспалительных факторов клеточного и гуморального иммунитета, в то время как их противовоспалительная активность остается необъясненной [707]. Также остается невыясненным механизм уменьшения выраженности аллергического воспаления при использовании мурамилпептидов и ЛПС при аллергической астме [45, 49, 127]. Требуется объяснения и обнаруженная противоопухолевая активность мурамилпептидов и ЛПС [2, 12, 13, 37, 40, 61, 78, 375, 412, 447, 455, 548, 640]. На основании вышеизложенного выявление механизмов регуляции разнонаправленных процессов при воздействии фрагментов клеточных стенок бактерий является актуальной задачей для объяснения их клинической эффективности и для понимания способов воздействия бактериальных биорегуляторов на организм хозяина. Антимикробные пептиды бактерий, обитающих в норме на коже и слизистых человека, оказывают воздействие на клетки хозяина и способны модулировать иммунные реакции, что также требует изучения.

Бактериальные биорегуляторы представляют собой мощный инструмент для воздействия на здоровье человека, открывающий новые возможности для профилактики, диагностики и лечения широкого спектра заболеваний. Продолжение исследований в этой области и разработка новых технологий для изменения и анализа микробиома могут привести к значительным прорывам в медицине и здравоохранении.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 1 ГЛАВЕ

*Статьи в журналах, индексируемых в SCOPUS, и в рекомендованных ВАК:*

1. Guryanova, S.V. Strategies for Using Muramyl Peptides - Modulators of Innate Immunity of Bacterial Origin - in Medicine / S.V. Guryanova, R.M. Khaitov // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – № 12. – P. 607178.

2. Гурьянова, С.В. Глюкозаминилмурамилдипептид – ГМДП: воздействие на мукозальный иммунитет (к вопросу иммунотерапии и иммунопрофилактики) / С.В. Гурьянова, Р.М. Хаитов // Иммунология. – 2020. – № 41(2). – С. 174-183.
3. Гурьянова, С.В. Глюкозаминилмурамилдипептид в терапии и профилактике инфекционных заболеваний / С.В. Гурьянова, Р.М. Хаитов // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 9, № 3. С. 79–86.
4. Guryanova, S.V. Immunomodulation, Bioavailability and Safety of Bacteriocins / S. V. Guryanova // Life. – 2023. – № 13. – P. 1521.
5. Guryanova, S.V. Immunomodulatory and Allergenic Properties of Antimicrobial / S.V. Guryanova, T.V. Ovchinnikova // Peptides. Int. J. Mol. Sci. 2022. – № 23. – P. 2499.
6. Guryanova, S.V. How Do Pollen Allergens Sensitize? / S.V. Guryanova, E.I. Finkina, D.N. Melnikova et al. // Front. Mol. Biosci. 2022. – № 9. – P. 900533.
7. Guryanova S.V. Innate Immunity Mechanisms in Marine Multicellular Organisms / S.V. Guryanova, T. V. Ovchinnikova // Marine Drugs. 2022. – № 20(9). – P. 549
8. Guryanova, S.V. Regulation of Immune Homeostasis via Muramyl Peptides-Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin / S.V. Guryanova // Microorganisms. - 2022. - № 10. - P. 1526.
9. Гурьянова, С.В. Разработка и валидация методики определения глюкозаминил-мурамилдипептида в водных растворах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / С.В. Курсаков, Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А., С.В. Гурьянова и др. // Иммунология. – 2020. - № 1. - Т. 41. - С. 74–82.
10. Гурьянова, С.В. Подходы системной биологии и биоинформатики в методологии диагностических исследований аллергических заболеваний / С.В. Гурьянова // Медицинская иммунология. 2017. – Т. 19. – № 5. – С. 124.
11. Гурьянова, С.В. Клинико-иммунологическая эффективность и перспективы использования мурамилдипептидов в лечении atopических

заболеваний / Н.В. Колесникова, И.Г. Козлов, С.В. Гурьянова и др. // Медицинская иммунология. 2016. – Т.18. – № 1. – С. 15-20.

12. Guryanova, S. Community-reviewed biological network models for toxicology and drug discovery applications / Namasivayam A.A., Bobbili D.R., Androsova G. et al. // Gene Regulation and Systems Biology. 2016. – № 10. - P. 51-66.

13. Guryanova, S. Enhancement of COPD biological networks using a web-based collaboration interface / J. Hoeng, S. Boue, M.C. Peitsch et al. // F1000Research. 2015. № 4. – P. 32.

14. Guryanova, S. sbv IMPROVER: Modern Approach to Systems Biology / S. Guryanova, A. Guryanova // Methods Mol Biol. 2017. – № 1613. – P. 21-29.

*Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:*

1. Гурьянова, С.В. Интегрированные подходы в диагностике и терапии аллергических заболеваний / С. В. Гурьянова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2018. – Т. 22. – № 1. – С. 75-85.

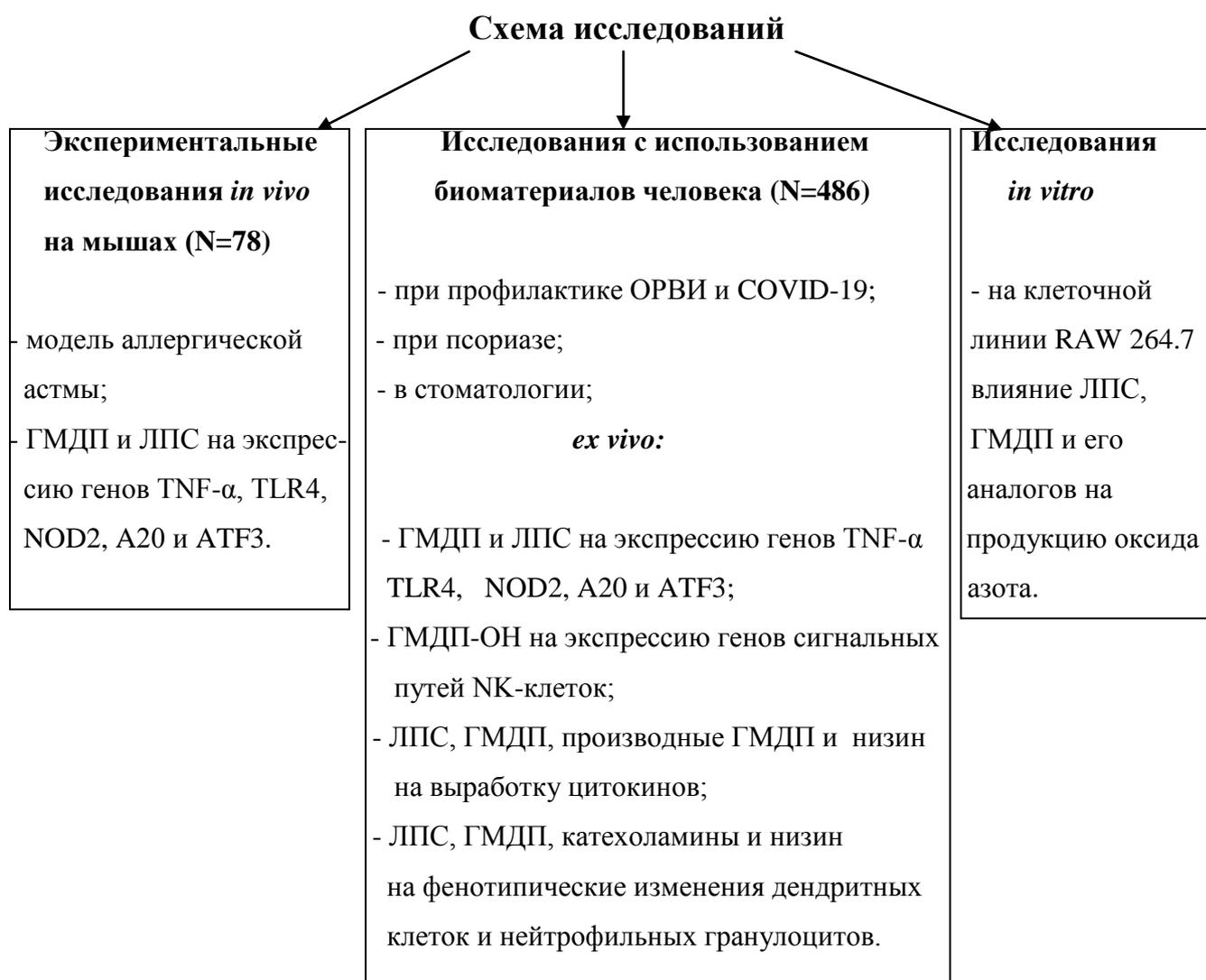
2. Гурьянова, С.В. Вторичные иммунодефициты мелких домашних животных и их коррекция мурамилдипептидами / Н.В. Колесникова, А.Г. Кощачев, С.В. Гурьянова // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2017. – № 131. – С. 559-571.

3. Гурьянова, С.В. Мурамилпептиды и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в комплексной терапии аллергических заболеваний / И.Г. Козлов, С.В. Гурьянова, Н.В. Колесникова и др. // Российский аллергологический журнал. 2015. – № 5. – С. 59-67.

4. Гурьянова, С.В. Влияние компонентов микроэмульсионной системы на трансдермальный перенос иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида / Е.Г. Кузнецова, О.М. Курылева, Л.А. Саломатина, С.В. Курсаков, С.В. Гурьянова // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – № 22(3). – С. 149-155. <https://doi.org/10.15825/1995-1191-2020-3-149-155>.

## ГЛАВА 2 – МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

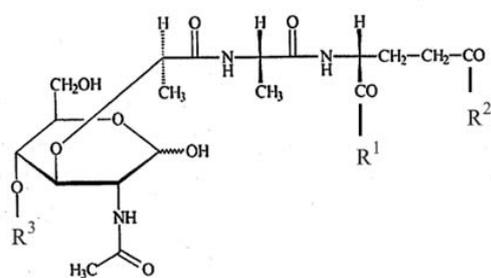
Исследование проводилось на лабораторных животных, клеточных линиях, на мононуклеарных клетках и в цельной периферической крови человека и животных, а также изучались результаты клинических наблюдений. Схема исследования представлена на *Рисунке 2.1*.



**Рисунок 2.1 – Общая схема исследований**

В качестве биорегуляторов бактериального происхождения (ББП) применяли лекарственное средство ликолипид на основе N-ацетил-глюкозаминил-N-ацетил-мурамилдипептида (ГМДП) и *ex vivo* его производные, полученные

согласно описанным методам [70], а также ЛПС *E. coli* (Ultra-pure, InvivoGen, Калифорния, США) и бактериоцин низин (Мерк, Германия) (рисунки 2.2; 2.3; 2.4).



М г/моль	Мурамил- пептид	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
495	МДП	NH <sub>2</sub>	ОН	H
695	ГМДП	NH <sub>2</sub>	ОН	GlcNAcβ1
696	ГМДП-ОН	ОН	ОН	GlcNAcβ1
839	ГМДП-Lys	NH <sub>2</sub>	Lys	GlcNAcβ1
695	ГМДП-LL	NH <sub>2</sub>	ОН	GlcNAcβ1

Рисунок 2.2 – Структура мурамилпептидов

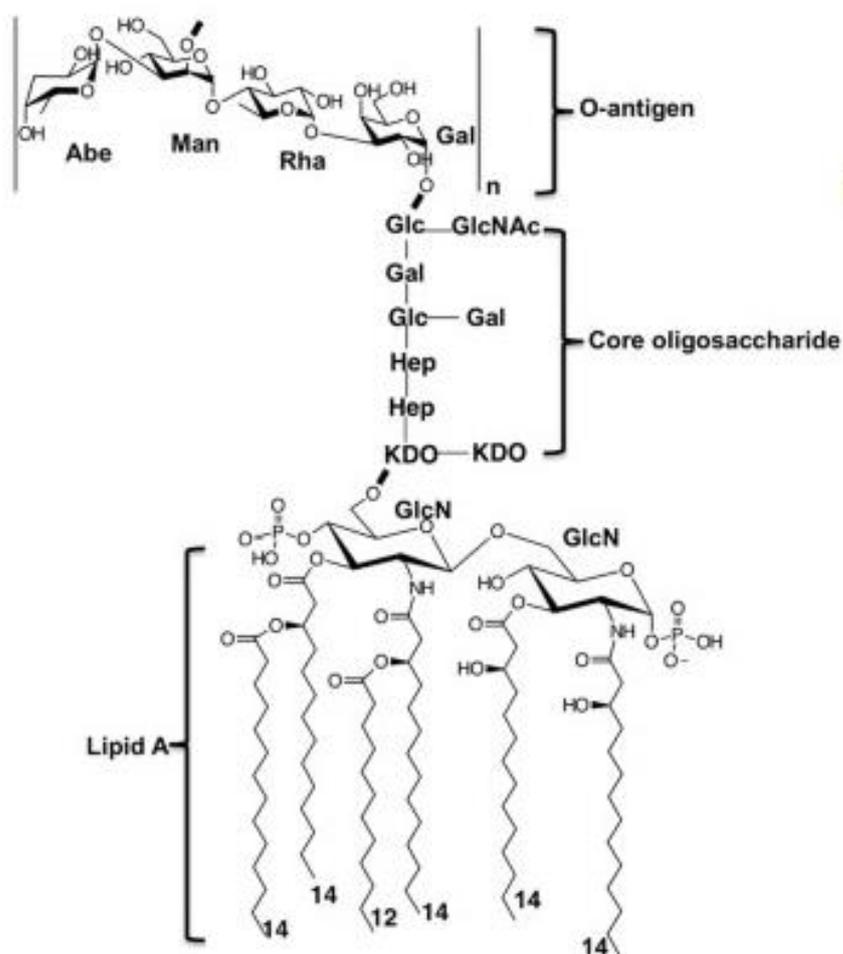
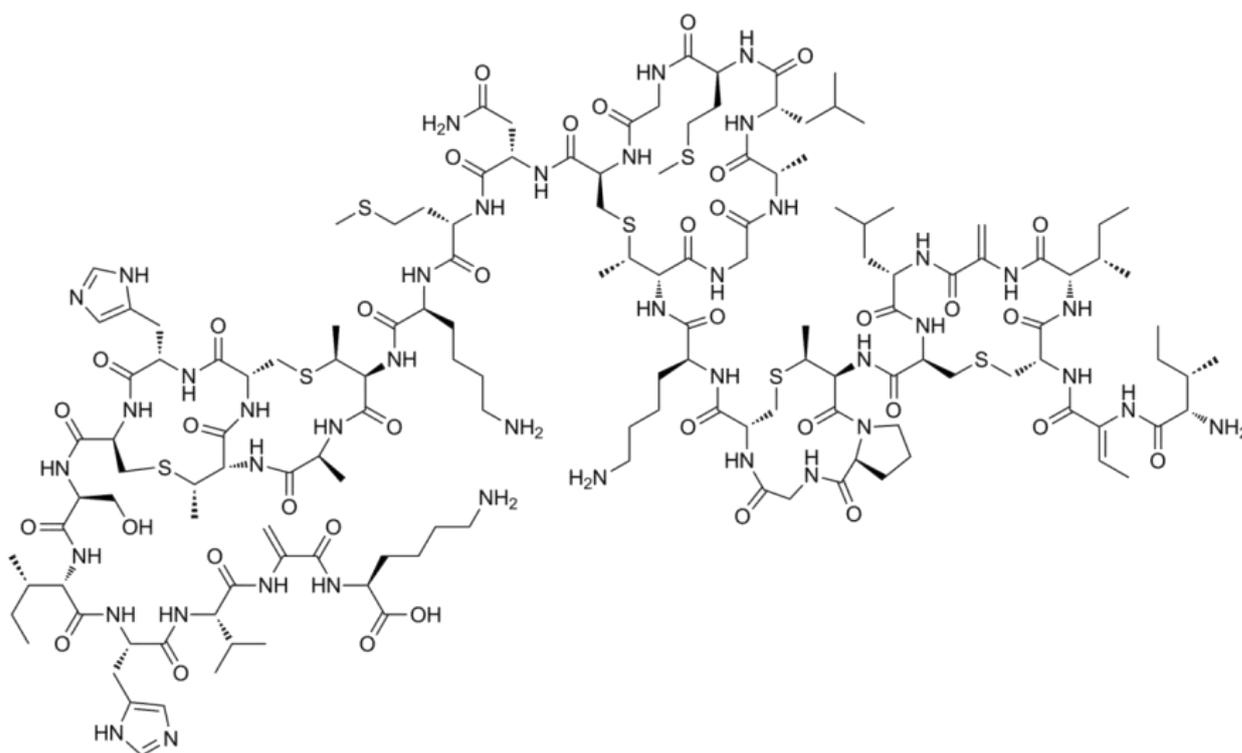


Рисунок 2.3 – Структура липополисахарида *E. coli*



**Рисунок 2.4 – Структура бактериоцина низина**

## **2.1– Исследования с использованием лабораторных животных**

В экспериментальных исследованиях были использованы самцы мышей линии BALB/c (N=78) (г. Пущино, Россия), все работы проводились в соответствии с Хельсинской декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации о гуманном отношении к животным и Женевской конвенцией (Geneva, 1990).

### **2.1.1 – Экспериментальная модель аллергического воспаления**

У мышей линии BALB/c индуцировали аллергическое воспаление дыхательных путей с использованием модели аллергической бронхиальной астмы [38].

Мыши линии BALB/c были рандомизированы на 8 групп (6 животных в каждой группе). На этапе сенсибилизации в 200 мкл фосфатного буфера (PBS, Панэко, Россия) вводили внутривентриально (i/p) 20 мкг овальбумина (OVA, Merck, Германия), с 1 мг гидроксида алюминия (Merck, Германия) в дни 0, 14 и 21, после чего на 27, 28 и 35 дни им интраназально (i/n) вводили 80 мкг OVA в 50 мкл стерильного PBS (таблица 2.1).

**Таблица 2.1 – Исследование влияния глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида в модели овальбумин-индуцированной аллергической астмы**

День	Группы животных							
	1 Астма (OVA), N=6	2 ЛПС перед OVA, N=6	3 ГМДП перед OVA, N=6	4 ЛПС и OVA, N=6	5 ГМДП и OVA, N=6	6 ЛПС N=6	7 ГМДП, N=6	8 Фосфат- ный буфер (PBS), N=6
-5		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-4		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-3		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
-2		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i /p
-1		ЛПС i/p	ГМДП i/p			ЛПС i/p	ГМДП i/p	PBS i/p
0	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ ГМДП i/p			PBS i/p
1								
14	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ ГМДП i/p			PBS i/p
21	OVA i/p			OVA+ЛПС i/p	OVA+ ГМДП i/p			PBS i/p
27	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
28	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
35	OVA i/n					PBS i/n	PBS i/n	PBS i/n
37	Выделение БАЛ, легких и крови							

*Примечания:* OVA - овальбумин; ГМДП - глюкозаминилмурамилдипептид; ЛПС – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; i/p - внутрибрюшинное введение; i/n – интраназальное введение; БАЛ - бронхоальвеолярный лаваж.

Во 2, 3, 6 и 7 группах животным внутрибрюшинно за 5 дней до сенсibilизации вводили по 5 мкг/животное ГМДП (ЗАО Пептек, г. Москва, Россия) в PBS или 1 мкг/животное ЛПС (Ultra-pure, InvivoGen, Калифорния, США) в PBS. Во 2 и 3 группах затем вводили овальбумин аналогично группе 1 (астма). В 4 и 5 группах ГМДП и ЛПС животным внутрибрюшинно во время

сенсibilизации вводили по 5 мкг/животное ГМДП в PBS или по 1 мкг/животное ЛПС в PBS совместно с 20 мкг OVA и 1 мг гидроксид алюминия в 0,2 мл стерильного физиологического раствора. Контрольной группе мышей № 8 внутрибрюшинно и интраназально вводили стерильный PBS (*таблица 2.1*).

#### **2.1.1.1 – Получение бронхоальвеолярного лаважа**

Через 48 ч после последнего введения OVA животных умерщвляли с помощью цервикальной дислокации, образцы жидкости бронхоальвеолярного лаважа собирали путем интратрахеальной инстилляцией 700 мкл PBS трехкратно. БАЛ центрифугировали для сбора целых клеток в осадок с 0,5 мл PBS, супернатанты осторожно удаляли и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.1.2 – Получение сыворотки крови в модели астмы**

Кровь из сердца 30 мин. содержали при  $24^{\circ}\text{C}$ , центрифугировали 15 минут при 1000 g, затем отделяли сыворотку и определяли общий IgE и OVA-специфические IgG1 и IgG2a.

#### **2.1.1.3 – Получение образцов легких**

Легкие мышей фиксировали в 10% растворе параформальдегида в течение часа при комнатной температуре и готовили срезы толщиной 4 микрометра. Визуализацию образцов проводили при помощи инвертированного светового микроскопа (Nikon Eclipse E200, Япония).

#### **2.1.1.4 – Количественный и качественный анализ клеток в бронхоальвеолярном лаваже**

Суммарное количество моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов, и эозинофилов в 1 мл БАЛ определяли на гематологическом счетчике (Beckman Coulter LH 750, США). Подсчет и анализ клеток производили с помощью световой микроскопии высушенных мазков, окрашенных по Романовскому – Гимза (красители Гемстандарт, Россия; микроскоп Nikon Eclipse E200, Япония).

#### **2.1.1.5 – Анализ содержания иммуноглобулинов**

Количественное определение sIgA в БАЛ мышей, а также OVA-специфических IgG1 (IgG1 Mouse ELISA Kit, ThermoFisher, США) и IgG2a (IgG2a Mouse ELISA Kit, ThermoFisher, США) и общего IgE (IgE Mouse ELISA Kit,

ThermoFisher, США) в сыворотке крови животных измеряли с использованием наборов для ИФА мышей (ThermoFisher, США) на спектрофотометре Multiskan (ThermoFisher, США).

#### **2.1.1.6 – Гистологические исследования легких животных**

Легкие мышей фиксировали в 10% растворе параформальдегида в течение часа при комнатной температуре и готовили срезы толщиной 4 микрометра (Микротом НМ 3250, Thermo FS, Китай). Визуализацию образцов проводили при помощи инвертированного светового микроскопа (Nikon Eclipse E200, Япония).

#### **2.1.1.7 – Выделение крови животных для ПЦР анализа**

Образцы крови отбирали из сердца в пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster Austria) с 0.1 мл  $K_2EDTA$ . Мононуклеарные клетки выделяли с помощью Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Burlington, ON, Canada), жизнеспособность клеток оценивали с помощью трипанового синего (Панэко, Россия).

#### **2.1.2 – Исследование влияния биорегуляторов бактериального происхождения на экспрессию генов *TNF- $\alpha$* , рецепторов *TLR4* и *NOD2*, регуляторных факторов *A20* и *ATF3***

Мыши линии BALB/c (N=30) были случайным образом разделены на две группы по 15 животных в каждой группе (*таблица 2.2*).

Предварительно до инъекций ЛПС (Merck, Германия) и ГМДП (ЗАО Пептек, Россия) у 6 мышей производили отбор крови. В день 1, 2, 3, 4 и 5 всем животным вводили внутривенно (i/p) 200 мкл стерильный PBS. В группе 1 i/p вводили ЛПС (1 мкг/на животное в 200 мкл PBS). В группе 2 в аналогичный период i/p вводили ГМДП (5 мкг/животное в 200 мкл PBS). Отбор крови производили до введения ЛПС и ГМДП (день 0), на 2, 6, 11 и 21 день (*таблица 2.2*).

**Таблица 2. 2 – Исследование влияния глюкозаминилмурамилдипептида и липополисахарида на экспрессию генов *TNF- $\alpha$* , *TLR4*, *NOD2*, *A20* и *ATF3***

День	Группы животных		Выделение крови
	1 ЛПС i/p N=15	2 ГМДП i/p N=15	
0	-	-	N=6
1	N=12	N=12	
2	N=12	N=12	N=6
3	N=9	N=9	
4	N=9	N=9	
5	N=9	N=9	
6			N=6
11			N=6
21			N=6

*Примечание:* ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид; ЛПС – липополисахарид; PBS – фосфатно-солевой буфер; i/p – внутрибрюшинное введение.

#### **2.1.2.1– Выделение РНК и реакция обратной транскрипции**

РНК выделяли с помощью тризола (Trizol Reagent, Invitrogen, США). Обратную транскрипцию и реакцию ПЦР осуществляли с помощью наборов компании «Евроген» (Москва, Россия).

#### **2.1.2.2 – Исследование экспрессии генов**

Экспрессию генов исследовали методом RT-PCR с использованием реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) в термоциклере СХ96 (BioRad, США). Протокол амплификации: 1 цикл 10 мин при 94°C, далее 38

циклов: 20 с при 94°C, 20 с при 60°C для отжига праймеров с матрицей и 40 с при 72°C. Расчет относительного уровня мРНК генов-мишеней проводили методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [408]. Относительную концентрацию субстрата нормировали по средним данным амплификации GAPDH и экспрессии этого гена в контрольном образце (нестимулированные клетки). Все реакции проводили в трех повторах и включали отрицательный контроль. Относительные различия в экспрессии генов более чем в 2 раза считались достоверными. В НК-клетках уровни экспрессии генов определяли на приборе Illumina iScan (Illumina, США) с использованием Illumina HumanHT-12v4 Expression BeadChip.

## **2.2 – Исследования с использованием биоматериалов человека**

Исследования проводили с использованием биоматериалов (периферическая кровь, ротовая жидкость) условно здоровых добровольцев (357 человек), пациентов с хроническим псориазом (86 человек), с кариесом (43 человека) в системе *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* (таблица 2.3) на различных клинических базах при участии врача-дерматолога д.м.н. Уджуху В.Ю. в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии департамента здравоохранения г. Москвы, врача-стоматолога медицинского центра Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы Лежава Н.Л., врача-терапевта медицинского центра Кыргызской государственной академии физической культуры и спорта Б.Т. Орозбековой (г. Бишкек, Кыргызстан).

Все участники дали добровольное согласие на обработку персональных данных и участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (таблица 2.3).

**Таблица 2.3 – Исследования с использованием биоматериалов человека**

Исследование профилактической и клинико-иммунологической эффективности ГМДП при вирусных и бактериальных инфекциях	Исследование модулирующих эффектов ГМДП в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе	Исследование иммуотропных эффектов ББП (ГМДП и ЛПС) при аутоиммунном воспалительном процессе
<p>1. Оценка эффективности ГМДП в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период (N=309)</p> <p>2. Исследование влияния ГМДП на иммунологические показатели ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов (N=43)</p>	<p>1. Исследование влияния ГМДП на количественные показатели и разнообразие микрофлоры в ротовой жидкости здоровых добровольцев и пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов (N=91)</p>	<p>1. Исследование эффектов ГМДП в монотерапии псориаза (N=86)</p>

### **2.2.1 – Выделение моноклеарных клеток человека и подготовка их к культивированию**

Для исследования использовали венозную кровь, которую собирали в пробирки (Vacuette, Greiner Bio-One, Austria) с антикоагулянтом (0,1 мл раствора 2,7% соли  $K_2$ ЭДТА; pH 7,2-7,4 на 1 мл крови).

Цельную кровь разводили в соотношении 1:3 раствором фосфатно-солевого буфера PBS (Панэко, Россия), наслаивали на Cell separation media Lympholyte CL 5015 (Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Канада) и центрифугировали 40 минут при 400 G.

Моноклеарные клетки (МНК) дважды отмывали в полной среде RPMI 1640 (Merk, Германия), содержащей 10% эмбриональной коровьей сыворотки (Merk, Германия), 100 ед/мл пенициллина (Merk, Германия), 100 мкг/мл стрептомицина (Merk, Германия) и 10 мМ Хепес-буфера (Merk, Германия). Жизнеспособность клеток определяли окрашиванием трипановым синим (Панэко, Россия).

### **2.2.2 – Определение цитокинов в моноклеарных клетках человека**

Культивировали МНК человека в присутствии мурамилпептидов, ЛПС и бактериоцина низина в 96-луночных планшетах (Costar, г. Вашингтон, США) из расчета  $2 \times 10^5$  клеток на лунку в 200 мкл среды RPMI 1640 (Merk, Германия). Предварительно были установлены наиболее эффективные концентрации МП, ЛПС и бактериоцина низина, которые составили в конечной концентрации для МП 5 мкг/мл, ЛПС - 1 мкг/мл, бактериоцина низина 1 нг/мл [70].

Планшеты инкубировали в течение 4 часов при 37°C в атмосфере 5%  $CO_2$  (Инкубатор CellXpert® C170i Eppendorf, Германия), отбирали супернатант и тестировали цитокины с использованием магнитных шариков с антителами для определения цитокинов/хемокинов человека с использованием оборудования и программного обеспечения Luminex 200, Merck (Millipore) (г. Берлингтон, Массачусетс, США).

### **2.2.3 – Выделение НК-клеток из моноклеарных клеток человека методом магнитной сепарации**

НК-клетки выделяли с помощью стандартного комплекта реактивов NK Cell Isolation Kit (Human, Miltenyi Biotec, Германия), центрифугировали при 200g в течение 8 минут, переносили  $5 \times 10^5$  клеток в 1 мл полной среды RPMI-1640 в 24-луночный стерильный плоскодонный планшет (Corning-Costar, США). Чистоту (95%) выделенной популяции НК-клеток (CD3-CD19-CD56+) оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии (CytoFLEX, Beckman Coulter LS, США).

#### **2.2.4 – Оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на НК-клетки**

ГМДП-ОН в концентрации 10 мкг/мл вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Corning-Costar, США), клетки инкубировали в течение 6 и 16 ч (экспериментальная группа) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> [12]. В контрольную группу ГМДП-ОН не вносили. Оценка влияния ГМДП-ОН на НК-клетки осуществлялась с участием д.м.н. Козлова И.Г. и к.м.н. Гапонова А.М. Исследуемые гены представлены в *таблице 2.4*.

**Таблица 2.4 – Исследуемые гены**

<b>Гены</b>	<b>Описание кодируемого продукта</b>
<i>CRK</i>	Член семейства белков, связывающих тирозинфосфорилированные белки
<i>CRKL</i>	Crk-подобный белок – субстрат тирозинкиназы BCR-ABL
<i>FYN</i>	Тирозинкиназа семейства Src
<i>SYK</i>	Нерецепторная тирозинкиназа
<i>ZAP70</i>	Ассоциированная с ζ-цепью (TCR) протеинкиназа 70 кДа
<i>RAC3</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC2</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAC1</i>	Малый ГТФ-связывающий белок семейства Rho
<i>RAP1A</i>	Член семейства Ras малых ГТФ-связывающих белков
<i>RAPGEF1</i>	Фактор обмена Раpаn-гуаниновых нуклеотидов (GEF) 1
<i>RAP2A</i>	RAP2A, член семейства онкогенов РАН

## Продолжение таблицы 2.4

<b>Гены</b>	<b>Описание кодируемого продукта</b>
<i>VAV1</i>	Vav-1 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV2</i>	Vav-2 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>VAV3</i>	Vav-3 – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов
<i>PLCB1</i>	Фосфолипаза C, $\beta$ 1 (фосфоинозитид-специфичная)
<i>FCGR3A</i>	FcRIIIa, рецептор Fc-фрагмента IgG, низкое сродство (CD16a)
<i>PLCG1</i>	Фосфолипаза C, $\gamma$ 1
<i>PLCG2</i>	Фосфолипаза C, $\gamma$ 2
<i>PIK3R3</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 3 ( $\gamma$ )
<i>PIK3R1</i>	Фосфоинозитид-3-киназа, регуляторная субъединица 1 ( $\alpha$ )
<i>PIK3C2G</i>	Фосфатидилинозитол-4-фосфат-3-киназа, каталитическая субъединица типа 2 $\gamma$
<i>IFNA1</i>	ИФН- $\alpha$ 1
<i>IFNA6</i>	ИФН- $\alpha$ 6
<i>IFNAR1</i>	Рецептор ИФН ( $\alpha$ , $\beta$ и $\omega$ ) 1
<i>IFNA21</i>	ИФН- $\alpha$ 21
<i>STAT2</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 2, 113 кДа
<i>STAT5A</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5A
<i>STAT6</i>	Преобразователь сигнала и активатор транскрипции 6, индуцированный ИЛ-4
<i>MAPK8IP1</i>	МАРК 8, взаимодействующий белок 1
<i>MAP2K7</i>	МАРК-киназа 7
<i>MAP4K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP3K6</i>	МАРК-киназа 6
<i>MAPKAPK5</i>	МАРК 5
<i>MAPK8</i>	МАРК 8
<i>MAP3K14</i>	МАРК-киназа 14

*Продолжение таблицы 2.4*

<b>Гены</b>	<b>Описание кодируемого продукта</b>
<i>MAPKAPK3</i>	МАРК 3
<i>MAPK13</i>	МАРК 13
<i>MAP3K10</i>	МАРК-киназа 10
<i>MAPK10</i>	МАРК 10
<i>MAP2K2</i>	МАРК-киназа 2
<i>MAP4K3</i>	МАРКкиназа 3
<i>TNFRSF9</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 9
<i>TNFRSF10B</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 10
<i>TNFRSF13C</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 13
<i>TNFRSF14</i>	Суперсемейство рецепторов ФНО, член 14
<i>TNFSF18</i>	Суперсемейство ФНО (лиганд), член 18
<i>TNFAIP6</i>	ФНО $\alpha$ -индуцированный белок 6

### **2.2.5 – Регистрация выделения оксида азота под действием мурамилпептидов и липополисахарида**

Для количественного определения оксида азота использовали стабильную клеточную культуру линии RAW264.7 (Институт цитологии РАН, Россия) и наборы Griess Reagent System (Promega, г. Мадисон, США). В 96-луночном планшете к 100 тыс клеток линии RAW264.7 в шести повторностях добавляли мурамилпептиды (0,144 мМ) и ЛПС (2,5 мкг/мл), инкубировали 24 ч, затем на спектрофотометре MicroScan (Beckman Coulter, США) при 540 нм измеряли в супернатанте количество выделившегося оксида азота в мкМ, согласно инструкции производителя.

### **2.2.6 – Фенотипирование дендритных клеток человека**

Регистрацию степени активации дендритных клеток (ДК) осуществляли с помощью проточной цитометрии, определяя процент клеток, экспрессирующих маркеры дифференцировки ДК CD80, CD83, CCR7 с использованием реагентов

«BD Biosciences», USA на приборе NovoCyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences Inc., США).

Использовалась комбинация нескольких маркеров. Фенотипирование производили по маркерам HLA-DR PE-Cy5, CD11c APC, CD123 APC-eFluor780, CCR7 PE-Cy7. Популяции миелоидных дендритных клеток определяли по HLA-DR+CD14-CD3-CD20-CD123-CD11c+; плазмоцитоидные дендритные клетки определяли маркерами HLA-DR+CD14-CD3-CD20-CD11c+CD123+ («BD Biosciences», США).

### **2.2.7 – Исследование влияния адреналина и норадреналина на изменение фенотипа дендритных клеток**

Для выявления вклада адреналина и норадреналина в изменение фенотипа ДК было изучено их влияние на изменение маркеров ДК. Для этого образцы цельной крови добровольцев инкубировали 1 час с катехоламином норадреналином (2 мг/мл) и адреналином (1 мг/мл) отдельно и совместно с ГМДП в конечной концентрации 5 мкг/мл, ЛПС (1 мкг/мл), бактериоцином низин (1 нг/мл) при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В контрольные лунки добавляли PBS в адекватном объеме.

### **2.2.8 – Характеристика пациентов с псориазом**

Обследовали 86 пациентов с псориазом (50 женщин и 36 мужчин, возраст 19-63 года), наблюдавшихся в Московском научно-практическом центре дерматовенерологии и косметологии департамента здравоохранения г. Москвы у врачей-дерматологов д.м.н. Уджуху В.Ю. и Кубылинского А.А. Длительность заболевания на момент начала исследования варьировала от 6 месяцев до 45 лет. Среди провоцирующих факторов чаще всего наблюдались психоэмоциональный стресс, обострения хронических заболеваний, острые респираторные вирусные инфекции. Частота рецидивов составила в среднем 2–3 в год.

Критерии включения в исследование: вульгарный псориаз, добровольное информированное согласие пациента на участие в исследовании и обработку персональных данных.

Критерии исключения: онкологические заболевания, аллергические заболевания, хроническая сердечная недостаточность, острая и хроническая почечная и печеночная недостаточность.

В группе сравнения обследованы 50 практически здоровых лиц аналогичного пола и возраста.

У 67 человек диагностирована вульгарная разновидность псориаза, представленная различными бляшками и папулами розового цвета с серебристо-белыми чешуйками на поверхности. У 14 больных при первичном осмотре выявлена экссудативная разновидность заболевания, при которой наблюдались явления выраженного вторичного мокнутия. У 5 больных определялась хроническая форма заболевания, характеризующаяся длительно существующими бляшками со значительной папулезной инфильтрацией. У большинства больных псориаз находился в прогрессирующей стадии, протекая как недифференцированный тип заболевания. Для оценки тяжести течения патологического процесса и эффективности проводимых лечебных мероприятий использовали индекс PASI (Psoriasis Area and Severity Index). В соответствии с полученными значениями индекса PASI у 9 пациентов выявлена легкая степень тяжести течения заболевания ( $PASI = 7,3 \pm 1,8$ ). Из них у 5 - вульгарный псориаз, у 2 - экссудативная и у 2 - хроническая формы псориаза. У 60 пациентов (51 с вульгарным, 6 с экссудативным и 3 с хроническим псориазом) со средней степенью тяжести псориаза средний показатель PASI составил  $26,6 \pm 4,2$ . У 17 больных (11 больных вульгарным и 6 экссудативным псориазом) с тяжелым течением кожно-воспалительного процесса средний показатель PASI составил  $43,6 \pm 3,9$ .

Период наблюдения составил четыре года. Клиническая эффективность лечения псориаза ГМДП оценивалась как «излечение» при отсутствии клинических проявлений заболевания в течение четырех лет.

### **2.2.9 – Определение цитокиновых биомаркеров в сыворотке крови пациентов с псориазом**

Уровни растворимых антигенов CD54 (sCD54, sICAM-1), IL-4, IL-12, IL-10, TNF- $\alpha$  и фактора торможения миграции макрофагов (МИФ) определяли иммуноферментным методом с использованием соответствующих наборов, в том числе набора Human sICAM-1/CD54 ELISA для определения уровня sICAM-1 в сыворотке крови (R&D Systems, Миннеаполис, США). В качестве контроля использовали результаты лабораторных исследований сыворотки крови 50 доноров в возрасте 19–60 лет. Кровь отбирали в утренние часы натощак.

### **2.2.10 – Характеристика пациентов, принимавших участие в исследовании ротовой жидкости**

В исследовании принимали участие 91 человек в возрасте 19 - 22 года. Из них у 43 пациентов (26 женщин и 17 мужчин) диагностирован при осмотре кариес окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов и 48 человек (28 женщин и 20 мужчин) составляли группу здоровых добровольцев. Исследование проходило в Медицинском центре РУДН на кафедре биологии и общей генетики и кафедре челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии при участии врача-стоматолога Медицинского института РУДН к.м.н. Лежава Н.Л. У всех участников исследования получено добровольное согласие на участие в исследовании согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации и обработку персональных данных в соответствии с протоколом (Протокол № 11 от 31.10.2019), одобренным решением Комитета по этике Медицинского института РУДН, ), так как в инструкции к препарату ликолипид нет показаний к применению в стоматологической практике.

*Критерии включения в группу здоровых добровольцев:* отсутствие заболеваний ротовой полости в том числе кариеса и пародонтита, ЛОР-органов; все пациенты не употребляли антибиотики в последние 2 месяца до проведения исследования и во время эксперимента, не курили, не употребляли продукты, содержащие алкоголь.

*Критерии включения в группу пациентов с кариесом:* возраст 19-22 года, наличие кариозных полостей боковых поверхностей зубов, состояние относительного здоровья, согласие на участие в исследовании и отказ от употребления алкоголя и табакокурения во время исследования.

*Критерии невключения в группу пациентов с кариесом:* хронические, аутоиммунные или аллергические заболевания в анамнезе, использование антибиотиков, кортикостероидов и других лекарственных средств за три месяца до начала исследования, наличие гингивита и пародонтита.

*Критериями исключения из группы пациентов с кариесом были:* употребление алкоголя и табакокурение, инфекционные заболевания.

В терапию кариеса входило пломбирование кариозных полостей боковых поверхностей зубов с использованием светоотверждаемых композитных материалов, рекомендации по кратности приема пищи. Участники исследования в течение срока наблюдения применяли одинаковые методы ухода за полостью рта.

Группа здоровых добровольцев (48 человек - 28 женщин и 20 мужчин) и 21 пациент (12 женщин и 9 мужчин) с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов принимали препарат на основе ГМДП в течение 10 дней. Группу сравнения составляли 22 человека (14 женщин, 8 мужчин), прошедших лечение кариозных полостей и не принимавших препарат ликолипид. Отбор ротовой жидкости осуществляли в Медицинском центре РУДН, тестирование осуществлялось на кафедре биологии и общей генетики медицинского института РУДН.

### **2.2.11 – Лабораторные исследования ротовой жидкости**

Ротовую жидкость (1 мл) отбирали стерильными одноразовыми шприцами из подъязычной области и помещали в стерильные одноразовые пробирки 1,5 мл (Диа-М, Россия) в утренние часы через 2-3 часа после еды у 43 пациентов в возрасте 19 - 22 года (26 женщин и 17 мужчин) с кариесом боковых поверхностей зубов до применения препарата ликолипид 1 мг (ГМДП, АО Пептек, Москва, Россия) и через 4 дня после 10-дневного курса препарата. Препарат применяли согласно инструкции для профилактики и снижения сезонной заболеваемости

ОРЗ сублингвально 1 раз в день за 30 мин до еды в течение 10 дней. Основным исходом исследования была оценка количества в ротовой жидкости дефенсинов и sIgA, а также состава микрофлоры и сопоставлений указанных показателей с таковыми группы пациентов, прошедших терапию кариесом и не употреблявших препарат ликопад. Микробиологическое исследование РЖ выполняли с помощью стандартного метода газовой хромато-масс-спектрометрии и набора реагентов «Канд-ген» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), Дентофлор («ДНК-технология», Москва). Идентификацию микроорганизмов - с помощью программы Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch&BLAST\\_SPEC=MicrobialGenomes](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes)) по базе данных NCBI GenBank. Для NGS-секвенирования ДНК на приборе Illumina MiSeq (Illumina, США) использовали праймеры V6 16S рДНК (Евроген, Россия). Анализ дефенсинов HNP1-3 и содержание sIgA в сублингвальной слюне исследовали методом иммуноферментного анализа с помощью реагентов «Нускулт Биотек» (США) и «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия).

#### **2.2.12 – Выделение ДНК, РНК и реакция обратной транскрипции**

Бактериальную ДНК из ротовой жидкости выделяли с использованием наборов «Проба-ГС» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Выделение РНК из клеток осуществляли с помощью Trizol Reagent (Invitrogen, США), либо с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Для обратной транскрипции использовали комплекты реагентов Ambion Total-Prep cRNA Amplification Kit (Invitrogen, США), «Синтол» (Россия) и «Евроген» (Россия) согласно инструкциям производителей.

#### **2.2.13 – Оценка эффективности глюкозаминилмурамилдипептида в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период**

На первом этапе открытого контролируемого исследования 42 условно здоровых участника (22 девушки и 20 юношей) с целью профилактики респираторных инфекции в соответствие с инструкцией сублингвально

принимали лекарственное средство на основе ГМДП (ликопид) 1 мг в течение 10 дней по 1 таблетке 3 раза в день.

На втором этапе исследования оценивалась эффективность использования препарата на основе ГМДП для профилактики респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период с января 2020 года у 267 человек (возраст 20-22 года), занимавшихся физической культурой, из которых 124 добровольца основной группы принимали препарат на основе ГМДП, а 143 участника (группа сравнения) не принимали препарат ликопид. Диагностика COVID-19 осуществлялась на основании ПЦР анализа материала, полученного при проведении назофарингеального мазка в лаборатории «Гемотест», г.Бишкек (Набор реагентов Вектор-Бест, Россия). Количество и тяжесть эпизодов ОРВИ и COVID-19 оценивалось в течение 12 месяцев, и сравнивались с количеством эпизодов ОРВИ за предшествующие 12 месяцев.

### **2.3. – Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Критерий Шапиро-Уилка использовали при  $n < 50$  для определения нормальности распределения значений. Для оценки статистически значимых различий между группами использовали непарный t-критерий Стьюдента. При нормальном распределении разности между значениями в зависимых группах использовали парный t-критерий Стьюдента. Числовые данные выражали как среднее арифметическое с указанием стандартной ошибки. Статистически значимыми считали различия, при  $p \leq 0,05$ . Данные ПЦР анализировали с использованием однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста множественного сравнения Ньюмана Кеулса.

### ГЛАВА 3 – ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ БИОРЕГУЛЯТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

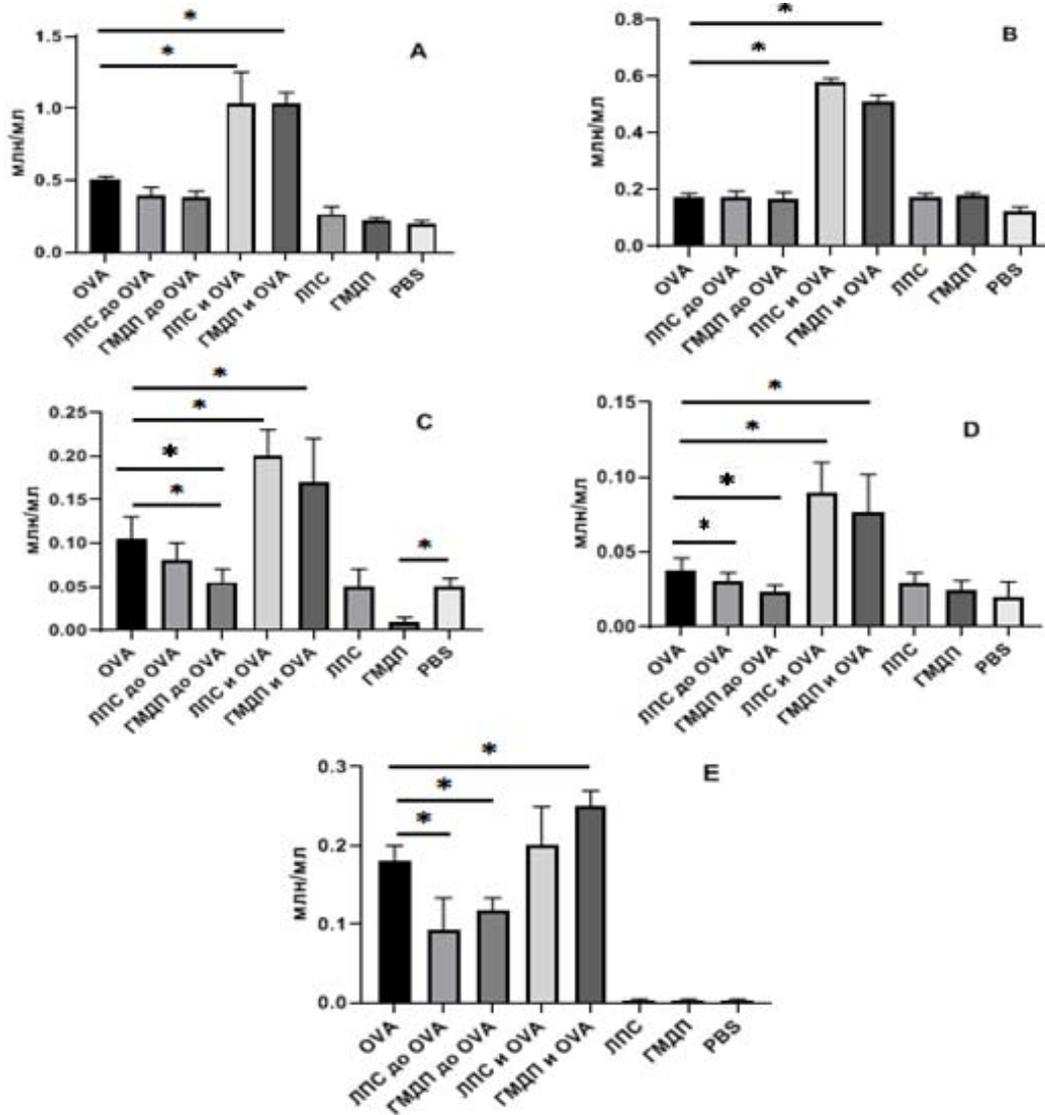
Исследование влияния ББП на содержание в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) нейтрофилов, эозинофилов, макрофагов, лимфоцитов и секреторного IgA, а также IgG1 и IgG2 в сыворотке крови проводили с использованием половозрелых самцов мышей линии BALB/C в модели аллергической астмы.

Мыши были распределены на ряд экспериментальных групп (*таблица 2.1*): у мышей 1 группы индуцировали аллергическое воспаление дыхательных путей овалбумином (OVA); во 2, 3, 6 и 7 группах животным внутрибрюшинно за 5 дней до иммунизации OVA вводили по 5 мкг/животное ГМДП или 1 мкг/животное ЛПС на основе PBS; в 4 и 5 мышам вводили по 5 мкг/животное ГМДП в PBS или по 1 мкг/животное ЛПС в PBS совместно с 20 мкг OVA и 1 мг гидроксида алюминия в 0,2 мл стерильного физиологического раствора; мышам контрольной 8 группы внутрибрюшинно и интраназально вводили стерильный PBS.

Выявлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение мышам ГМДП или ЛПС за 5 дней до сенсibilизации OVA (группа 2 и группа 3 соответственно) статистически значимо уменьшало число нейтрофилов, эозинофилов и лимфоцитов в БАЛ по сравнению с таковыми у мышей 1 группы (*рисунок 3.1*).

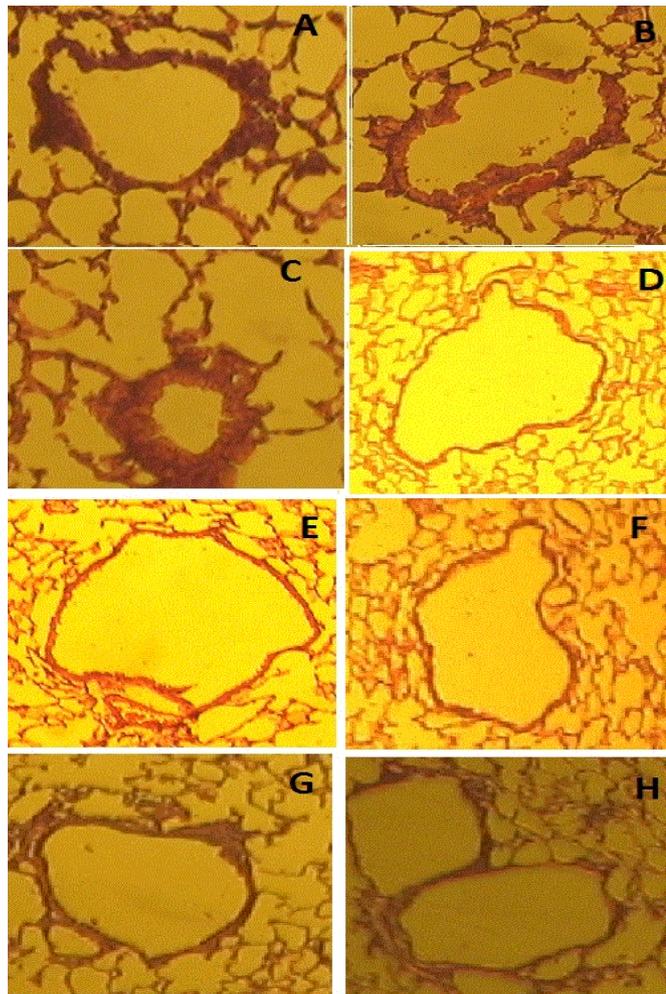
Обнаруженное снижение выраженности локальной нейтрофилии и эозинофилии в БАЛ при внутрибрюшинном введении мышам ЛПС и ГМДП до сенсibilизации OVA (группы 2,3) сочеталось с гистологически установленным снижением содержания бокаловидных клеток в легочной ткани (*рисунок 3.2*), что в случае аллергического воспаления уменьшало степень его выраженности.

Между тем, при сочетанном внутрибрюшинном введении OVA с ГМДП или ЛПС (группа 4, группа 5) наблюдалось значительное увеличение общего количества клеток БАЛ за счет статистически значимого ( $p < 0,05$ ) увеличения числ клеток всех исследуемых видов по отношению к таковым в группе 1.



**Рисунок 3.1 – Клеточный состав бронхоальвеолярного лаважа мышей с индуцированной астмой при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А – общее количество клеток; В – количество макрофагов; С – количество нейтрофилов; D – количество лимфоцитов; Е – количество эозинофилов; \* –  $p < 0,05$ .



**Рисунок 3.2 – Изменения в легких мышей с овальбумин-индуцированной астмой при интраперитонеальном введении липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А – OVA-индуцированная астма; В – OVA и ЛПС; С – OVA и ГМДП; D – контроль; E – введение ЛПС до сенсibilизации; F – введение ГМДП до сенсibilизации; G – только ЛПС; H – только ГМДП.

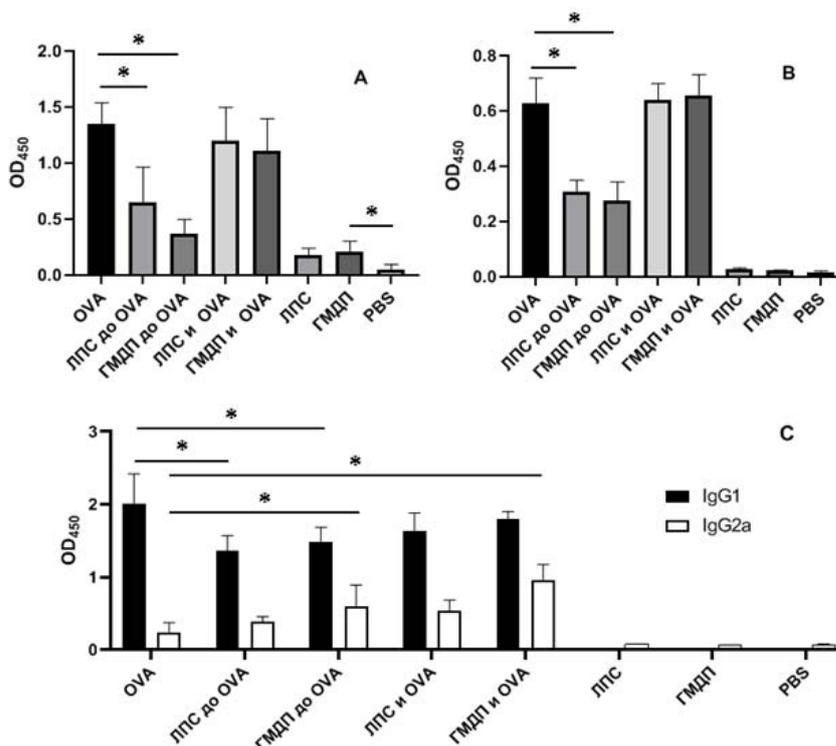
Сравнительная оценка результатов введения в течение 5 дней ГМДП или ЛПС (группа 6, группа 7) интактным мышам (без экспериментального аллергического воспаления) относительно животных контрольной группы (группа 8), получавших PBS, показала отсутствие статистически значимого влияния БП на число клеток БАЛ за исключением содержания нейтрофилов, содержание которых было достоверно ( $p < 0,05$ ) снижено под влиянием ГМДП.

В то время как у интактных мышей в БАЛ обнаруживались лишь следовые количества sIgA (группа 8), то при экспериментальной OVA-индуцированной астме выявлено значительное возрастание его концентрации.

Кроме того, внутрибрюшинное введение ГМДП интактным мышам приводило к статистически значимому ( $p < 0,05$ ) увеличению sIgA (группа 7), тогда как инъекции ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA способствовали достоверному снижению повышенного при аллергическом воспалении в БАЛ sIgA (в 2,6 раза и 2,1 раза соответственно,  $p < 0,05$ ).

Отмечено также, что в условиях OVA-индуцированной аллергической астмы уровень сывороточного IgE существенно возрастал, однако внутрибрюшинное введение ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA (группы 2,3) сопровождалось статистически значимым снижением содержания в сыворотке крови IgE в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ) и 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (*рисунок 3.3*). При этом важно, что ГМДП более эффективно снижал уровень иммуноглобулина класса IgE, в то время как ЛПС более выражено снижал содержание эозинофилов в БАЛ (*рисунки 3.2; 3.3*), что указывает на различные способы воздействия ЛПС и ГМДП на клеточный и гуморальный иммунитет в экспериментальной модели аллергической астмы.

Оценка содержания сывороточных IgG1 и IgG2a в модели аллергического воспаления показывала значительное увеличение концентрации IgG1, но в случае введения ЛПС и ГМДП перед введением аллергена отмечалось незначительное снижение концентрации IgG1 на 33% ( $p < 0,05$ ) и 29% ( $p < 0,05$ ) соответственно и значительное увеличение уровня IgG2a на 60% ( $p < 0,05$ ) и 110% ( $p < 0,05$ ) соответственно, обеспечивающего основной гуморальный иммунный ответ на антигены у мышей. Кроме того, сочетанное введение мышам аллергена и ГМДП способствовало максимальному увеличению содержания IgG2a по сравнению со всеми группами ( $p < 0,05$ ) (*рисунок 3.3*).



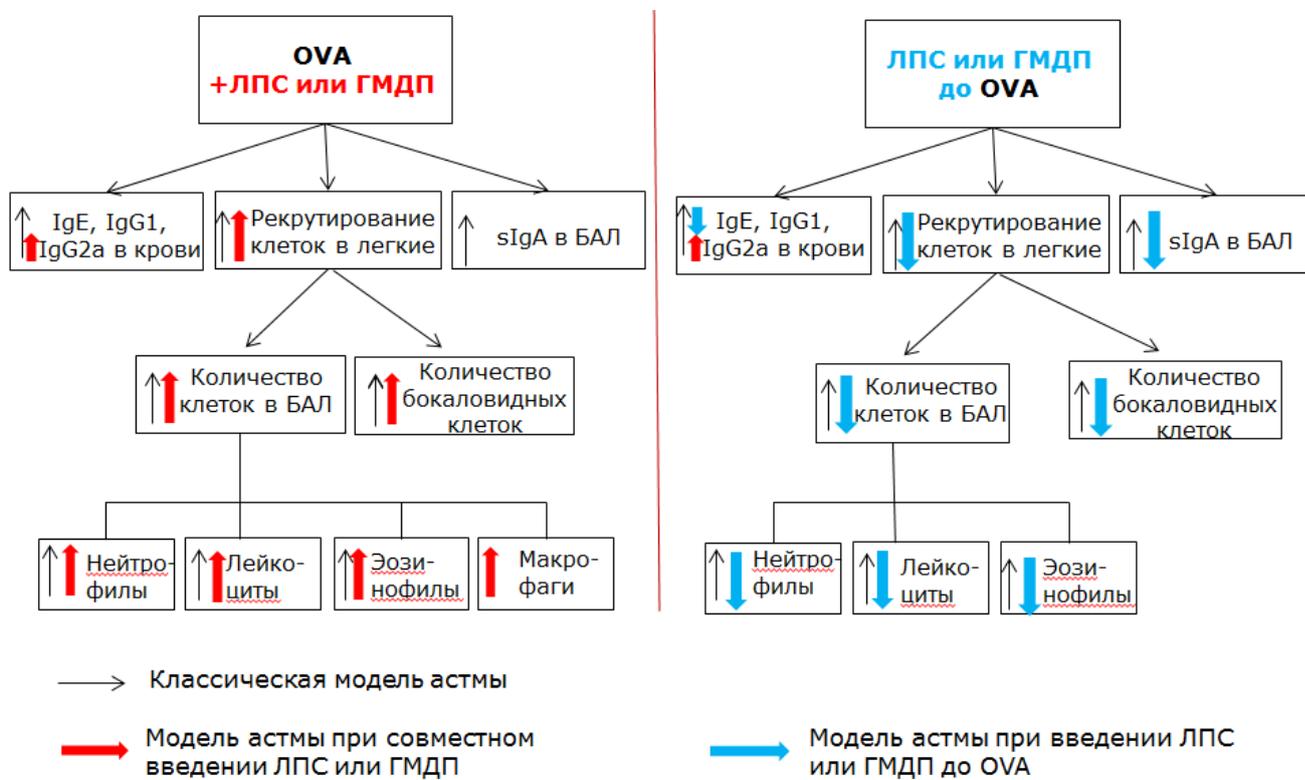
**Рисунок 3.3 – Изменение концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови и бронхоальвеолярном лаваже мышей с аллергической астмой при воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* А – содержание IgA в БАЛ; В – содержание IgE в сыворотке крови; С – содержание IgG1 и IgG2a в сыворотке крови; \* -  $p < 0,05$ .

### Резюме

Таким образом, в модели аллергического воспаления (OVA-индуцированная астма у мышей) установлена способность ЛПС и ГМДП влиять как на клеточный, так и на гуморальный иммунитет, продемонстрировано ключевое значение предварительного многократного воздействия низкомолекулярных биорегуляторов бактериального происхождения в защите от аллергического воспаления, выразившееся в снижении локальной нейтрофилии, эозинофилии и лимфоцитоза в бронхоальвеолярном лаваже при внутрибрюшинном введении мышам ЛПС и ГМДП до сенсibilизации OVA. При гистологическом исследовании легочной ткани установлено снижение содержания числа бокаловидных клеток при предварительном введении ББП, что в случае аллергического воспаления уменьшало степень его выраженности. В то же время при совместном введении

ББП и OVA наблюдалось увеличение числа бокаловидных клеток в гистологических срезах легких, а также содержания IgG2a в сыворотке крови (рисунок 3.4).



**Рисунок 3.4 – Механизм регуляции глюкозаминилмурамилдипептидом или липополисахаридом аллергического воспаления в OVA - индуцированной экспериментальной астме**

*Примечание:* OVA-овальбумин; ЛПС -липополисахарид; ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В ГЛАВЕ 3

*Статья в журнале, индексируемом в SCOPUS, и в рекомендованных ВАК:*

Guryanova, S.V. Dual Effect of Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin in Experimental Model of Asthma / S.V. Guryanova, O.B. Gigani, G.O. Gudima, A.M. Kataeva, N.V. Kolesnikova // Life. – 2022. - № 12. – P. 192.

## ГЛАВА 4 – ИССЛЕДОВАНИЕ КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЛЮКОЗАМИНИЛМУРАМИЛДИПЕПТИДА ПРИ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

### 4.1 – Оценка эффективности глюкозаминилмурамилдипептида в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период

При анализе эффективности препарата на основе ГМДП в профилактике респираторных заболеваний в неблагоприятный эпидемиологический период с января 2020 года у 267 человек (возраст 20-22 года), занимавшихся физической культурой, сравнивали результаты основной группы, в которых 124 добровольца принимали препарат на основе ГМДП, и группы сравнения, в которой 143 участника не принимали препарат ликопад. Количество и тяжесть эпизодов ОРВИ и COVID-19 оценивались в течение 12 месяцев и сравнивались с количеством эпизодов ОРВИ за предшествующие 12 месяцев.

Обнаружено, что применение препарата ГМДП (ликопад 1 мг) способствовало снижению в 3,7 ( $p < 0,05$ ) раза количества эпизодов ОРВИ в основной группе, участники которой принимали препарат на основе ГМДП (таблица 4.1).

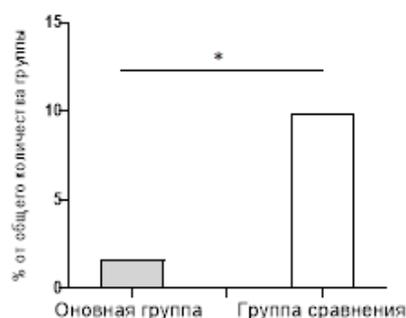
Особо следует отметить, что за весь период наблюдения случаи заболевания COVID-19 в обеих группах были легкими, среднетяжелыми и тяжелыми, и без смертельных исходов. При этом в группе студентов, принимавших ГМДП, 48,4 % участников контактировали с больными COVID-19, и при этом у подавляющего большинства (98,4%) участников исследования не было выявлено заболевания COVID-19.

В группе студентов-спортсменов, принимавших ГМДП, лишь у 2 человек (1,6 %) в анамнезе был подтвержденный COVID-19 легкого течения (степень установлена на основе Методических рекомендаций Минздрава России, версия

7 от 03.06.2020), тогда как в группе сравнения, не получавшей ГМДП, этот показатель в 6 раз выше — 9,8 % (14 человек, 4-м из которых потребовалась медицинская помощь и лечение в стационаре) (рисунки 4.1).

**Таблица 4.1 – Количество эпизодов острой респираторной вирусной инфекции в год в анамнезе в основной группе (N=124)**

Вид спорта	За 12 месяцев до приема ликопид			В течение 12 месяцев после приема ликопид			Всего
	1-2 раза в год	Более 3 раз в год	Не болели за год	1 раз в год	2 раза в год	Не болели за год	
Легкая атлетика	9	5	2	1	1	14	16
Бокс	7	2	9	1	1	16	18
Волейбол	6	4	14	2	0	22	24
Баскетбол	5	5	18	3	1	24	28
Фехтование	2	1	16	0	2	17	19
Единоборцы	6	1	12	1	1	17	19
Всего (n)	35	18	71	8	6	110	124
% от общего числа (N=124)	28.2	14.5	57.3	6.6	4.8	88.6	100



**Рисунок 4.1 – Применение глюкозаминилмурамилдипептида влияет на частоту эпизодов подтвержденного заболевания COVID-19 в течение 12 месяцев наблюдения**

Примечание: \* –  $p < 0,01$ .

#### 4.2 – Исследование эффектов глюкозаминилмурамилдипептида на локальный иммунитет у пациентов с кариесом

Проведено исследование изменения альфа-дефенсинов (HNP1-3) и секреторного IgA (sIgA) у 43 пациентов (возраст 20 - 22 года) с боковым кариесом жевательных зубов при использовании препарата ликолипид (21 человек) после традиционного лечения, тогда как участники группы сравнения (22 человека) получали только традиционную терапию.

Анализ содержания sIgA и альфа-дефенсинов HNP1-3 в ротовой жидкости (РЖ) изучали методом ИФА до приема препарата ликолипид и через 14 дней после начала приема (*таблица 4.2*).

**Таблица 4.2 – Концентрация нейтрофильных пептидов человека HNP1-3 в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида (M±m)**

Показатель	Традиционная терапия (N=22)	Традиционная терапия +ГМДП, (N= 21)	p
HNP1-3, пг/мл, 1-й день	249, 91± 42,78	252,12± 43,14	>0,05
HNP1-3, пг/мл, 14-й день	210,14± 24,32	152,29± 18,84	<0,05

Установлено, что прием препарата ГМДП (ликолипид 1 мг) после проведения традиционной терапии привел к достоверным изменениям параметров локального иммунитета. Так при оценке содержания альфа-дефенсинов (HNP1-3) в РЖ у пациентов с боковым кариесом зубов до лечения фиксировалось значительное возрастание концентрации HNP1-3 относительно нормы, а через 14 дней после традиционной терапии снижение было на 16 % ( $p>0,05$ ) относительно первоначальных значений в этой группе. Между тем, при применении препарата ГМДП в течение 10 дней в составе комплексной терапии имело место более существенное снижение уровня дефенсинов HNP1-3 на 40 % ( $p<0,05$ ) относительно первоначальных значений в этой группе (*таблица 4.2*).

Известно, что при адаптации организма к стрессу и к неблагоприятным условиям концентрация в биологических жидкостях секреторного IgA (sIgA) может в значительной степени изменяться и компенсаторно повышается продукция sIgA [560, 633]. В результате проведенных исследований у пациентов с кариесом исходно установлен повышенный уровень sIgA в РЖ, который после традиционной терапии снижался лишь на 12%, а после применения препарата ГМДП - на 37 % ( $p < 0,05$ ), что соответствовало значениям здоровых лиц без кариеса (*таблица 4.3*).

**Таблица 4.3 – Концентрация sIgA в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида ( $M \pm m$ )**

Показатель	Группа сравнения (N= 22)	Основная группа (N= 21)	<i>p</i>
sIgA, мг/мл; 1 день	247,18±48,65	258,81±47,81	0,05
sIgA, мг/мл; 14 день	208,55±29,42	165,51±21,19	<0,05

Таким образом, в результате исследований обнаружены позитивные иммуностропные эффекты препарата ГМДП в составе комплексной терапии пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей зубов в виде нормализации содержания в РЖ антимикробных факторов врожденного иммунитета и локального содержания sIgA.

#### **4.3 – Исследование модулирующих эффектов глюкозаминилмурамилдипептида в отношении микрофлоры слизистой полости рта в норме и при инфекционном процессе**

При исследовании влияния препарата ГМДП на состав микробного пейзажа РЖ здоровых добровольцев изменения были зарегистрированы у 30 человек (62,5%) (*таблица 4.4*).

**Таблица 4.4 – Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости здорового человека**

Вид микроорганизма	До приема ГМДП (N = 48)		После приема ГМДП (N = 48)	
	абс.	% от группы	абс.	% от группы
<i>Streptococcus spp.</i>	48	100	48	100
<i>Streptococcus mutans</i>	47	97,92	48	100
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	44	91,66	47	97,92
<i>Veillonella spp.</i>	40	83,33	43	89,58
<i>Candida albicans</i>	28	58,33	5	10,41*
<i>Neisseria spp.</i>	18	37,5	16	33,33
<i>Bifidobacterium spp.</i>	29	60,41	35	72,92*
<i>Eubacterium spp.</i>	5	10,41	7	14,58
<i>Lactobacterium spp.</i>	27	56,25	41	85,42*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	6	12,5	2	4,17*
<i>Clostridium spp.</i>	39	81,25	21	43,75*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	64,58	25	58,14*
<i>Actinomyces spp.</i>	19	39,58	26	54,17*

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Наблюдалось значительное снижение встречаемости грамотрицательной микрофлоры, *Firmicutes* и *Candida albicans*, в то же время увеличилась встречаемость лактобактерий и бифидобактерий.

Поскольку увеличение разнообразия микробиоты способствует формированию нормобиоценоза, препятствуя заселению ротовой полости патогенной микрофлорой, следует отметить повышение разнообразия микрофлоры у 73% добровольцев, у которых основная доля микроорганизмов ротовой жидкости была представлена бактериями *Streptococcus*, *Veillonella*, *Lactobacterium*, *Bifidobacterium* (таблица 4.4).

В то же время анализ состава микробного пейзажа роторой жидкости 43 пациентов с кариесом показал, что через 14 дней после традиционного лечения он изменился у девяти человек, и статистически значимым оказалось лишь уменьшение частоты встречаемости *Porphyromonas gingivalis* (таблица 4.5).

**Таблица 4.5 – Частота встречаемости микроорганизмов в ротовой жидкости пациентов с кариесом окклюзионных поверхностей боковых зубов до и после приема препарата глюкозаминилмурамилдипептида**

Виды микроорганизмов	Традиционная терапия (N= 22)		Традиционная терапия + ГМДП (N=21)	
	До терапии абс. (% от группы)	После терапии абс. (% от группы)	До терапии абс. (% от группы)	После терапии абс. (% от группы)
<i>Streptococcus spp.</i>	22 (100)	22 (100)	21 (100)	21 (100)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	19 (86,3)	20 (90,8)	18 (85,7)	18 (85,7)
<i>Veillonella spp.</i>	22(100)	21 (95,5)	21 (100)	21 (100)
<i>Neisseria spp.</i>	12 (54,5)	12 (54,5)	10 (47,6)	8 (38,8)
<i>Bifidobacterium spp.</i>	14 (63,6)	18 (81,7)	14 (66,6)	18 (85,7) *
<i>Eubacterium spp.</i>	12 (54,5)	12 (54,5)	12 (57,2)	12 (57,2)
<i>Lactobacterium spp.</i>	9 (40,9)	11 (50)	9 (42,3)	18 (85,7)*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	18 (81,7)	12 (54,5) *	17 (80,9)	2 (9,5)*
<i>Clostridium spp.</i>	21 (95,5)	21 (95,5)	21 (100)	8 (38,8)*
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13 (59)	13 (59)	15 (71,4)	10 (47,6)*
<i>Actinomyces spp.</i>	19 (86,3)	18 (81,7)	18 (85,7)	20 (95,2)

Примечание: \* –  $p < 0,05$ .

Между тем в группе пациентов, получавших наряду с традиционной терапией ГМДП, состав микрофлоры РЖ изменился у всех участников

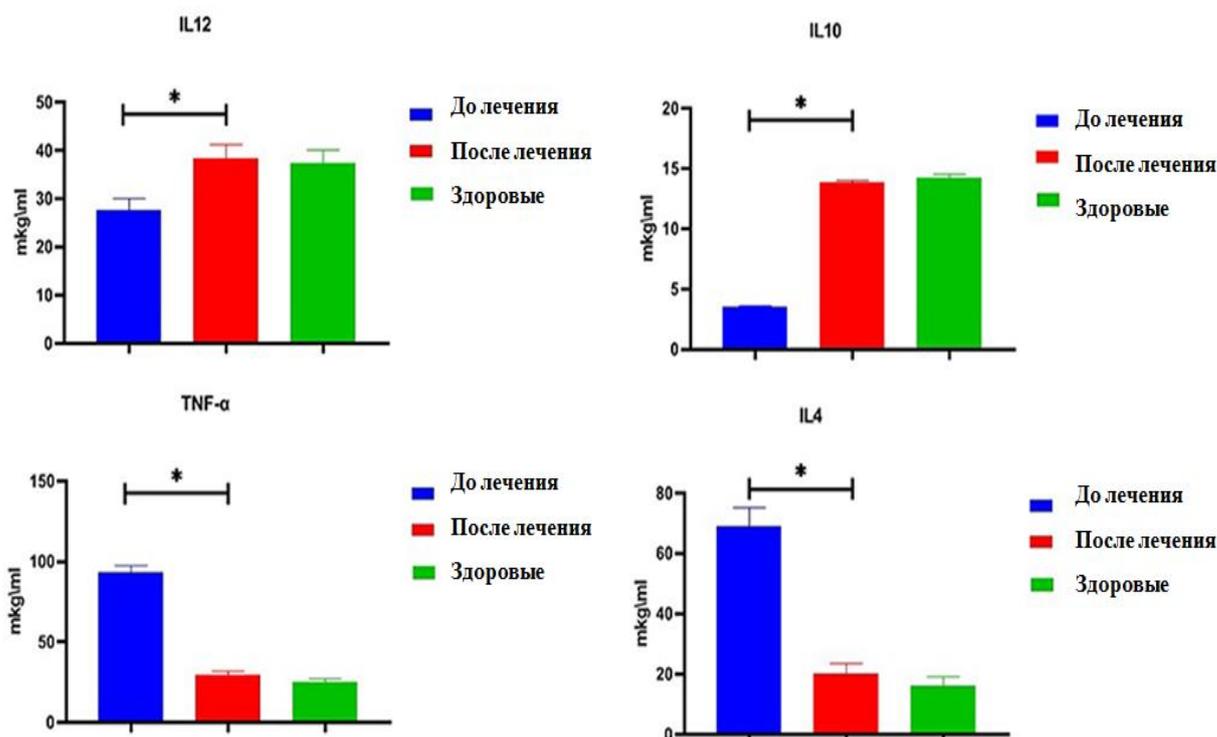
исследования (100%), у 85,7 % пациентов разнообразие микрофлоры повысилось за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*.

Наряду с этим, на фоне приема ГМДП более чем в 8 раз уменьшилась обсемененность ротоглотки *P. gingivalis* ( $p < 0,05$ ), а также достоверно уменьшилось содержание в ротовой жидкости *St. epidermidis* ( $p < 0,05$ ).

Поскольку таксоны *Proteobacteria* (род *Neisseria*, *Haemophilus*), *Firmicutes* (род *Streptococcus*; семейство *Veillonellaceae*, род *Granulicatella*), *Actinobacteria* (род *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*) и *Bacteroidetes* формируют основу здорового микробиоценоза ротовой жидкости, полученные данные свидетельствуют о позитивном влиянии препарата ликолипид на микрофлору слизистой полости рта.

#### **4.4 – Клинико-иммунологическая эффективность глюкозаминилмурамилдипептида при псориазе**

Исследования клинико-иммунологической эффективности ГМДП при псориазе проведены у 86 пациентов с псориазом, характеризующимся длительно существующими бляшками со значительной папулезной инфильтрацией. В соответствии с полученными значениями индекса PASI у 9 пациентов выявлена легкая степень тяжести течения заболевания ( $PASI = 7,3 \pm 1,8$ ). Из них у 5 вульгарный псориаз, у 2 – экссудативная и у 2 – хроническая формы псориаза. У 60 пациентов (51 с вульгарным, 6 с экссудативным и 3 с хроническим псориазом) со средней степенью тяжести псориаза средний показатель PASI составил  $26,6 \pm 4,2$ . У 17 больных (11 больных вульгарным и 6 экссудативным псориазом) с тяжелым течением кожно-воспалительного процесса средний показатель PASI составил  $43,6 \pm 3,9$ . Анализ полученных результатов выявил наличие дисбаланса в цитокиновой системе относительно таковой у 50 доноров в возрасте 18–60 лет (рисунок 4.2). В частности, сывороточные концентрации IL-12 ( $27,6 \pm 2,4$  пг/мл) были значительно ниже значений доноров ( $37,4 \pm 2,6$  пг/мл).



**Рисунок 4.2 – Изменение концентрации цитокинов в сыворотке крови пациентов с псориазом при использовании глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* Данные представлены как среднее  $\pm$  SEM; \* –  $p < 0,05$ .

Сходное снижение наблюдалось в отношении уровня IL-10 ( $3,5 \pm 0,1$  пг/мл) при значениях доноров  $14,1 \pm 0,2$  пг/мл, в то время как уровень TNF- $\alpha$  и IL-4 в сосудистом русле достоверно повышался до  $93,4 \pm 3,7$  пг/мл и до  $69,1 \pm 2,8$  пг/мл, соответственно, при значениях цитокинов у доноров  $25,0 \pm 2,0$  пг/мл и  $16,1 \pm 1,3$  пг/мл (рисунок 4.2). Применение ГМДП достоверно повышало содержание противовоспалительного IL-10 в периферической крови до  $13,8 \pm 0,9$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), что может быть причиной наблюдаемого снижения продукции провоспалительных цитокинов. В частности, уровень сывороточного TNF- $\alpha$  снизился до  $29,6 \pm 2,1$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), IL-4 – до  $17,5 \pm 1,4$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Наряду с этим, после использования ГМДП содержание IL-12 в крови достоверно увеличилось до  $38,4 \pm 2,8$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), приближаясь к значениям доноров. Учитывая, что фактор торможения миграции макрофагов (MIF) является ключевым регулятором начальных этапов развития иммунного ответа,

представлялось целесообразным изучения влияния препарата ГМДП на его концентрацию в сыворотке крови. Проведенные исследования показали, что исходная концентрация MIF в крови пациентов с псориазом была достоверно выше ( $31,5 \pm 3,6$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) значений у доноров (таблица 4.6).

**Таблица 4.6 – Изменение медиаторов воспаления в сыворотке крови больных псориазом на фоне проводимой терапии глюкозаминилмурамилдипептидом**

Группы (количество пациентов)	MIF (ng/ml) (M±m)	CD54 <sup>+</sup> cells (%) (M±m)	sCD54 (ng/ml) (M±m)	NO (μmol/L) (M±m)
До лечения (N=86)	$31,5 \pm 3,6^*$	$75,1 \pm 8,4^*$	$266,1 \pm 16,0^*$	$34,1 \pm 1,5^*$
После лечения (N=86)	$5,9 \pm 0,7^*$	$62,5 \pm 7,2^*$	$186,1 \pm 14,3^*$	$19,9 \pm 1,3^*$
Здоровые (N=50)	$5,5 \pm 0,6$	$60,6 \pm 4,1$	$162,1 \pm 10,4$	$19,4 \pm 1,4$

*Примечание:* \* - сравнение значений показателей между группами до и после лечения с использованием парного t-критерия Стьюдента,  $p < 0,05$ .

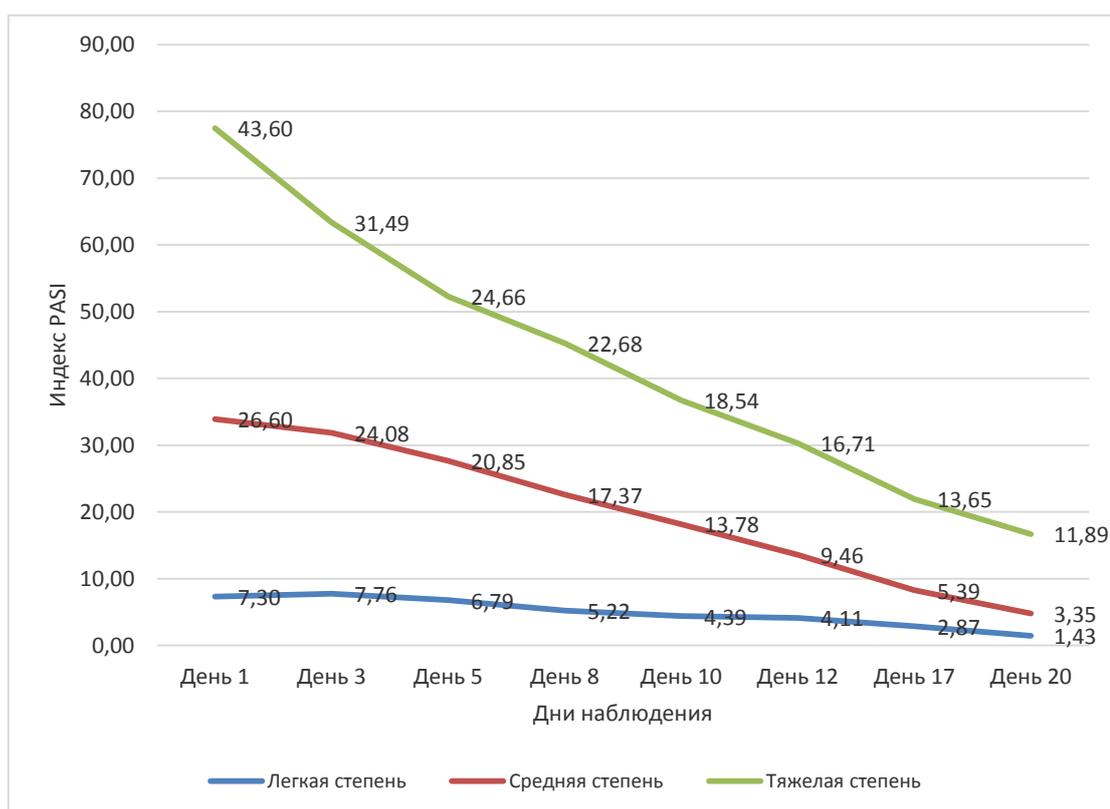
Применение ГМДП в терапии пациентов с псориазом приводило к снижению концентрации MIF до уровня такового у доноров ( $5,9 \pm 0,7$  нг/мл).

При псориазе в периферической крови зарегистрировано повышение количества CD54<sup>+</sup> клеток, а также растворимых форм молекул адгезии sCD54, или Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), которые представляет собой молекулы клеточной адгезии, широко распространенные в нормальных и неопластических тканях. Повышенные уровни CD54<sup>+</sup> клеток обнаруживаются при лимфопролиферативных и онкогематологических заболеваниях, а также при псориазе [422]. Применение ГМДП позволило уменьшить количество CD54<sup>+</sup> клеток, а также растворимую форму молекулы клеточной адгезии-1 и устранить дисбаланс в этой важной системе иммунитета и стабилизировать процессы миграции клеток и активации иммунокомпетентных клеток (таблица 4.6).

Кроме того, при псориазе обнаружено также увеличение производства оксида азота, однако после терапии с ГМДП уровень оксида азота в

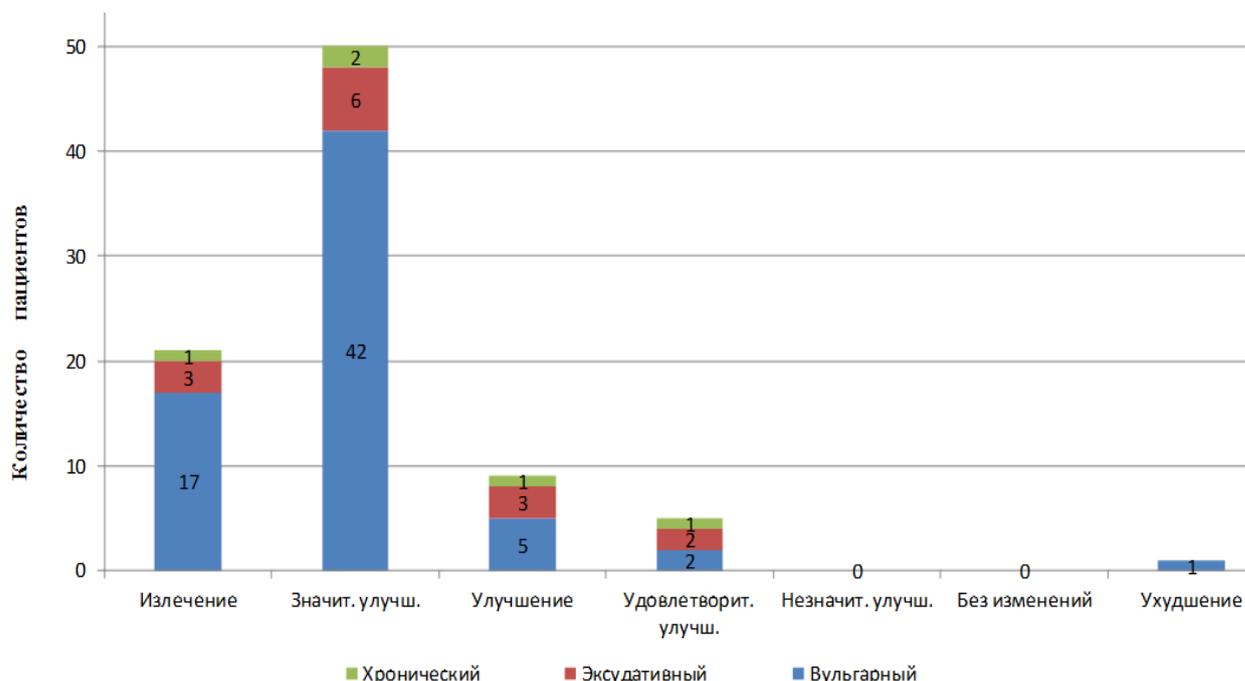
периферической крови снизился, что может свидетельствовать о стабилизации иммунных метаболических процессов.

Важно отметить, что у пациентов с псориазом тяжелой степени индекс PASI снизился с  $43,6 \pm 3,1$  до  $11,89 \pm 1,5$  ( $p < 0,01$ ), при псориазе средней степени – с  $26,6 \pm 2,2$  до  $3,4 \pm 2,4$  ( $p < 0,01$ ), при псориазе легкой степени – от  $7,3 \pm 2,49$  до  $1,43 \pm 0,6$  ( $p < 0,037$ ) (рисунок 4.3).



**Рисунок 4.3 – Изменение индекса PASI у пациентов с псориазом различной степени тяжести при использовании глюкозаминилмурамилдипептида**

Наряду с этим при лечении пациентов с псориазом лекарственным средством на основе ГМДП в период ремиссии значительное улучшение отмечено у 50 (58,1%) человек, пациентов, улучшение всех клинических признаков и симптомов по сравнению с исходным состоянием было характерно для 9 (10,4%) пациентов, у 5 (5,9%) пациентов результаты терапии были определены как удовлетворительные; ухудшение состояния наблюдалось у 1 (1,2%) пациента, ранее получавшего системное лечение метотрексатом (рисунок 4.4).



**Рисунок 4.4 – Клиническая эффективность лечения псориаза глюкозаминилмурамилдипептидом в период ремиссии**

Таким образом, впервые проведенное исследование влияния мурамилпептида на изменение относительного количества CD54+клеток, содержания sCD54, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  и оксида азота в сыворотке крови пациентов с псориазом показало, что монотерапия мурамилпептидом в период ремиссии купирует клинические проявления псориаза, нормализует синтез цитокинов IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , уменьшает количество клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы и сывороточные антигены sCD54 до контрольных значений.

Клиническое улучшение было обнаружено у 98,2% пациентов в виде статистически значимого увеличения безрецидивного периода, среди которых у 24,4% имело место отсутствие клинических проявлений псориаза в течение четырех лет наблюдений.

### **Резюме**

Таким образом, исследование клинико-иммунологической эффективности ГМДП в профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период выявило снижение числа эпизодов ОРВИ (в 3,7

раза), а также эпизодов COVID -19 (в 6 раз) - у контактировавших с больными коронавирусной инфекцией, что свидетельствует о высокой профилактической эффективности мурамилпептида. Исследование влияния ГМДП на микробный пейзаж полости рта в норме и при инфекционном процессе (у пациентов с кариесом) показало изменение у 62,5% здоровых добровольцев, получавших профилактический курс препарата глюкозаминилмурамилдипептида, тогда как у всех (100%) пациентов с кариесом, получавших глюкозаминилмурамилдипептид, имело место изменение состава микрофлоры в виде увеличения встречаемости *Lactobacterium spp*, уменьшения *Clostridium spp* (более чем в 2 раза), *P. gingivalis* (в 8 раз), а также повышения разнообразия микрофлоры у 85,7 % пациентов за счет появления *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*.

Монотерапия препаратом на основе ГМДП (ликопид) пациентов с псориазом на этапе ремиссии привела к клиническому улучшению состояния у 98,2% пациентов и с катamnестически установленным увеличением безрецидивного периода, что может быть обусловлено способностью ГМДП уменьшать дисбаланс цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), снижать количество клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы, плазменную концентрацию растворимых молекул межклеточной адгезии-1 и фактора торможения миграции макрофагов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ, ИЗЛОЖЕННЫМ В 4 ГЛАВЕ

1. Гурьянова, С.В. Динамика иммунологических и микробиологических показателей ротовой жидкости при терапии кариеса / С.В. Гурьянова, Н.В. Колесникова, Г.О. Гудима и др. // Иммунология. – 2021. – № 42(4). – С. 386–394.

2. Guryanova, S.V. Novel approaches to increase resistance to acute respiratory infections / S.V. Guryanova, N.A. Kudryashova, A.A. Kataeva, B.T. Orozbekova, N.V. Kolesnikova, A.G. Chuchalin // Вестник Российского

университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2021. – Т. 25. – № 3. – С. 181—195.

3. Гурьянова, С.В. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости / С.В. Гурьянова, О.Ю. Борисова, Н.В. Колесникова и др. // Иммунология. – 2019, 40 (6). – С. 34–40.

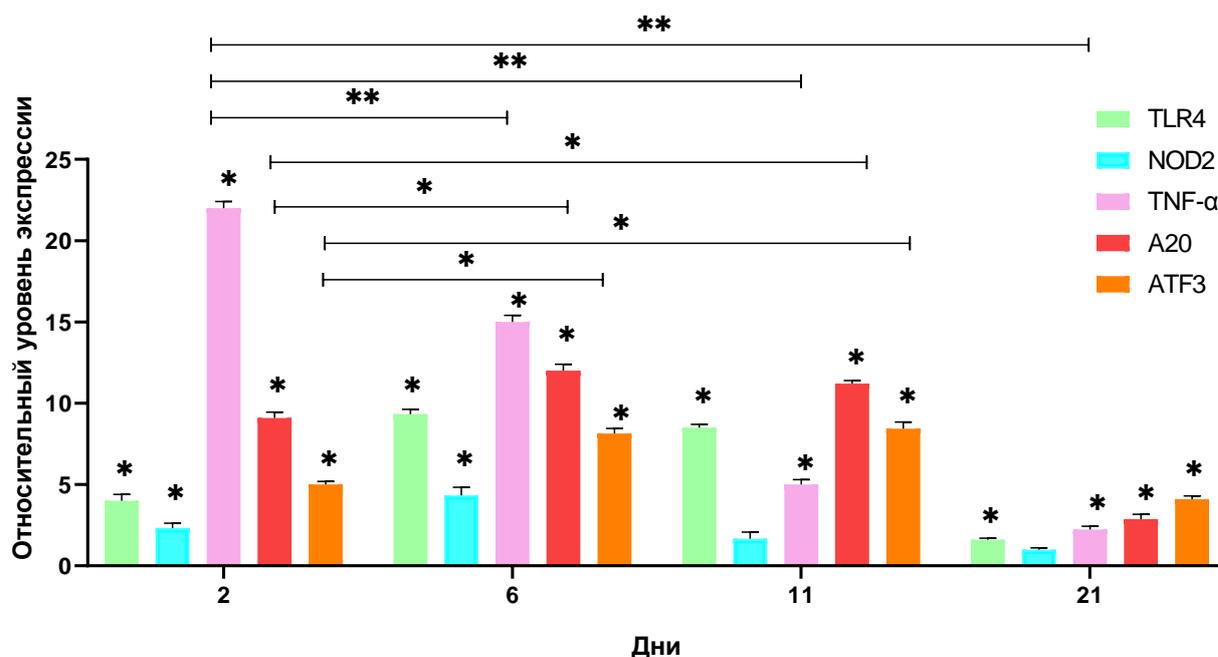
4. Guryanova, S. Pathogenetic Therapy of Psoriasis by Muramyl Peptide / S. Guryanova, V. Udzhukhu, A. Kubylinisky // Front. Immunol. 2019. - № 10. – P. 1275.

## ГЛАВА 5 –ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ИММУНОТРОПНЫХ ЭФФЕКТОВ БИОРЕГУЛЯТОРОВ БАКТЕРИАЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

### 5.1– Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на экспрессию генов регуляторных факторов на уровне сигнальных путей

С целью объяснения механизма выявленного двойного эффекта низкомолекулярных биорегуляторов бактериального происхождения (ЛПС и ГМДП), усиливающих и ограничивающих аллергическое воспаление, был проведен анализ экспрессии генов регуляторных элементов на трех уровнях сигнальных путей: а) на уровне рецепторов (TLR4, NOD2); б) на уровне транскрипционных факторов (A20, ATF3); в) на уровне экспрессии провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  в системе *in vivo* и *in vitro*.

При анализе экспрессии генов учитывали, что разница относительной их экспрессии более чем в 2 раза считалась значительной, данные представлены как среднее значение трех независимых тестов. Исследованиями показано, что уже через 24 часа после внутрибрюшинного введения мышам ЛПС в мононуклеарах мышей заметно увеличивалась экспрессия всех изученных генов: максимальный уровень экспрессии гена *TNF- $\alpha$*  ( $21,9 \pm 0,9$ ;  $p \leq 0,001$ ) был отмечен через 24 часа после введения ЛПС, а гена *A20* – на 6-е сутки ( $12,1 \pm 0,4$ ;  $p \leq 0,01$ ) с сохранением высоких значений ( $11,0 \pm 0,4$ ;  $p \leq 0,01$ ) на 11-е сутки. В то же время, высокие уровни экспрессии гена *TLR4* сохранялись на 6 и 11 дни наблюдения ( $9,1 \pm 0,3$ ;  $p \leq 0,01$ ) и ( $8,7 \pm 0,3$ ;  $p \leq 0,01$ ). Высокий уровень экспрессии *TLR4* и *TNF- $\alpha$*  сохранялся на протяжении последующих пяти дней, но к 21 дню уровень *TLR4* снижался до исходных значений, а уровень *TNF* уменьшался в 9 раз в сравнении с максимальным (рисунки 5.1).



**Рисунок 5.1 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* в мононуклеарах мышей на 2, 6, 11, 21 при внутрибрюшинном введении липополисахарида**

*Примечание:* \* –  $p \leq 0,01$ ; \*\* –  $p \leq 0,001$ .

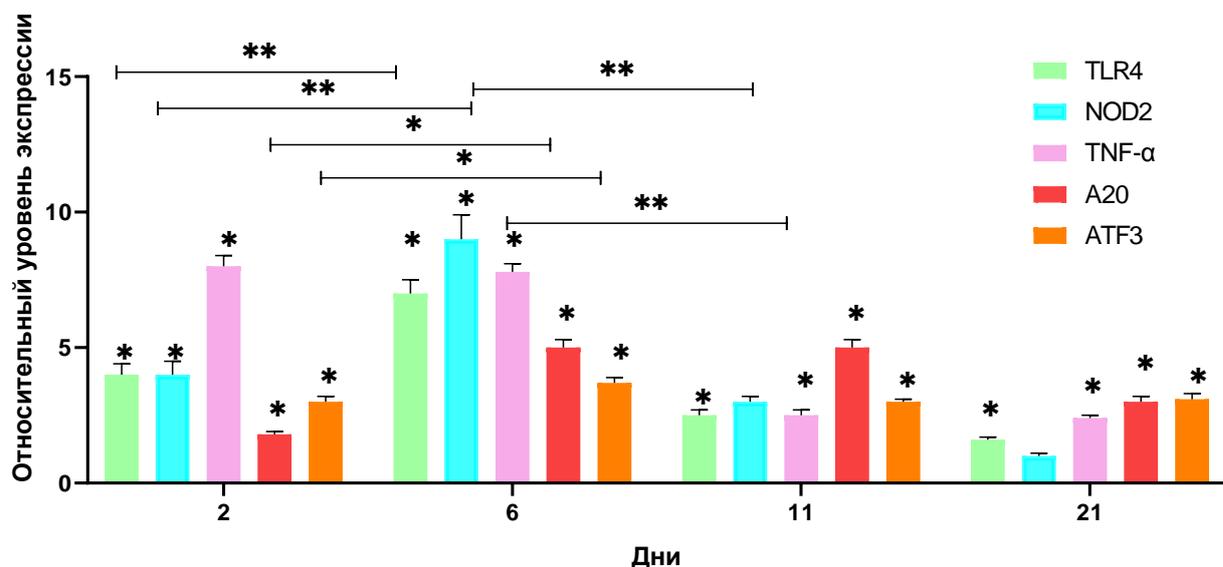
В результате воздействия ЛПС наблюдалось также увеличение экспрессии *NOD2*, максимальное значение которого ( $4,4 \pm 0,2$ ;  $p \leq 0,01$ ) было отмечено на 6-й день, но к 11 дню значения экспрессии гена *NOD2* снизились ( $1,5 \pm 0,15$ ;  $p > 0,05$ ). Таким образом, ЛПС, являющийся фрагментом клеточных стенок грамотрицательных бактерий стимулирует экспрессию не только собственного рецептора *TLR4*, но и рецептора *NOD2*, который детектирует фрагменты пептидогликана грамположительных бактерий.

Активирующий фактор транскрипции (*ATF3*) за 24 ч достоверно увеличился до 4,9 раза ( $4,9 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), а на 11-е сутки значения достигли максимума в 8,4 раза ( $8,4 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), а повышенные в 4,1 раза значения ( $4,1 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) сохранялись до 21-го дня.

Анализ полученных данных показал, что введение ЛПС мышам значительно увеличивало экспрессию генов как рецепторов *TLR4*, так и *NOD2*, а также *TNF-α*.

Кроме того, сразу возрастала и экспрессия деубиквитиназы *A20*. Экспрессия *ATF3* задерживалась, но сохраняла высокие значения в течение 11 дней после инъекции.

Введение ГМДП мышам в гораздо меньшей степени, чем ЛПС стимулировало экспрессию генов, но уровень *NOD2* повышался в 4.3 раза ( $4,3 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) уже на первые сутки, также, как и *TLR4*, уровень которого повышался в 4.2 раза ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ), и их максимальные значения также наблюдались к 6 дню: в 8,7 раза ( $8,7 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) для *TLR4* и в 9,5 раз ( $9,5 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) для *NOD2*. Достоверные изменения экспрессии *A20* в 5,1 раз ( $5,1 \pm 0,15$ ;  $p < 0,01$ ) наблюдались лишь к 6 дню и сохранялись повышенными в течение 15 дней после последней инъекции. Примечательно, что ГМДП стимулировал экспрессию не только собственного рецептора (*NOD2*), но и *TLR4* (рисунок 5.2).



**Рисунок 5.2 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* в мононуклеарах мышей на 2, 6, 11, 21 дни при внутрибрюшинном введении глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

При внутрибрюшинном введении животным ГМДП максимальный уровень экспрессии гена *TNF-α* был отмечен на 2-е и 6-е сутки наблюдения, а в последующие сроки (11-й и 21-й день) выраженность экспрессии была заметно сниженной. Относительная экспрессия гена *NOD2* и *TLR4* была максимальной к 6-му дню наблюдения, генов *A20* и *ATF3* – на 6-е и 11-е сутки наблюдения. При

этом обращает на себя внимание факт наиболее выраженного стимулирующего влияния ГМДП в отношении экспрессии генов *NOD2*, *TNF- $\alpha$* .

Эти данные показывают, что максимальные значения и экспрессия рецепторов (*TLR4*, *NOD2*) и *TNF- $\alpha$* , а также фактора транскрипции *ATF3* и деубиквитиназы *A20* достигали максимальных значений к 6-м суткам, после чего экспрессия *TLR4*, *NOD2* и *TNF- $\alpha$*  заметно снижалась, а экспрессия *A20* и *ATF3* все еще была повышена.

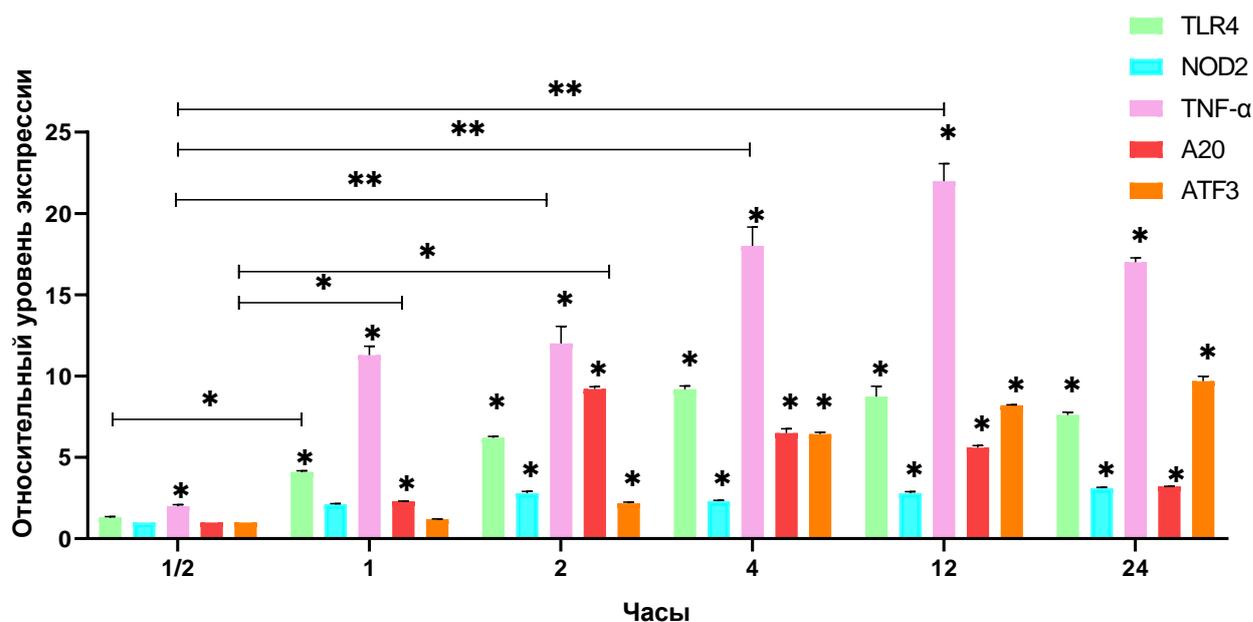
Оценка экспрессии генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF- $\alpha$* , *A20* и *ATF3* в мононуклеарах человека проводилась и в самые ранние сроки наблюдения после введения ЛПС и ГМДП в системе *in vitro* (рисунки 5.3 и 5.4).

Исследования *in vitro* показали, что стимуляция мононуклеаров человека ЛПС в течение 30 минут привела к увеличению *TNF- $\alpha$*  в 2 раза ( $2,0 \pm 0,06$ ;  $p < 0,01$ ), через час — в 11 раз ( $11,1 \pm 0,3$ ;  $p < 0,001$ ), через 2 часа — в 12 раз ( $12,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ), а к 12 часам достигла максимума в 22 раза ( $22,1 \pm 0,5$ ;  $p < 0,001$ ), а затем уменьшалась (рисунок 5.3).

Экспрессия генов *TLR4* увеличивалась в 4 раза ( $4,2 \pm 0,2$ ;  $p < 0,01$ ) через час, достигла максимума в 9 раз ( $9,2 \pm 0,4$ ;  $p < 0,01$ ) через 4 часа и сохранялась на этом уровне до 12 ч и оставалась повышенной в 7,5 раза ( $7,5 \pm 0,25$ ;  $p < 0,01$ ) до 24 часов.

Экспрессия генов *NOD2* увеличилась через час, достигла через 2 часа максимальных значений – увеличение в 3,1 ( $3,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ) раза и сохранялась повышенной в течение 24 часов.

Экспрессия регуляторных факторов — *A20* и *ATF3* к 30 минутам оставалась неизменной и увеличивалась значительно медленнее, чем *TNF- $\alpha$* . Максимальное значение 9,2 ( $9,2 \pm 0,45$ ;  $p < 0,01$ ) экспрессия *A20* достигла через 2 часа, а *ATF3* — 9,7 раза ( $9,7 \pm 0,25$ ;  $p < 0,01$ ) через 24 часа после стимуляции. Таким образом, *A20* и *ATF3* экспрессируются позже, чем *TNF- $\alpha$*  и *TLR4*, после стимуляции LPS *in vitro*.

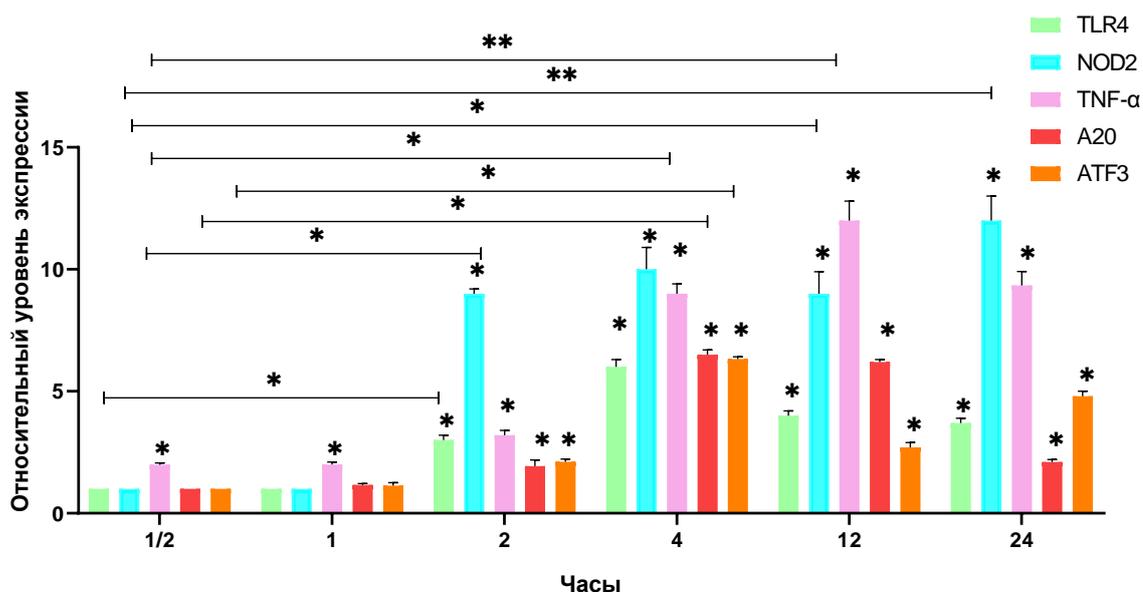


**Рисунок 5.3 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* при стимуляции липополисахаридом *in vitro* в мононуклеарных клетках человека через 30 мин, 1, 2, 4, 12 и 24 часа**

*Примечание:* \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

При стимуляции мононуклеарных клеток человека ГМДП через 30 минут экспрессия только *TNF-α* достоверно возрастала в 2,2 раза ( $2,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ), экспрессия *TLR4* увеличивалась в 3,2 раза ( $3,2 \pm 0,15$ ;  $p < 0,01$ ), через 2 часа достигла максимального значения в 6,1 раза ( $6,1 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) к 4 часам, затем снижалась в течение 24 часов и достигла значений 3,7 ( $3,7 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) (рисунок 5.4).

Экспрессия гена рецептора *NOD2* оставалась неизменной в течение часа, увеличивалась в 9 раз ( $9,05 \pm 0,35$ ;  $p < 0,01$ ) через 2 часа и оставалась повышенной в течение 24 часов. *TNF-α* увеличивался с первых минут после стимуляции, достигая максимального значения увеличения в 12,1 раза ( $12,1 \pm 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) через 12 часов и сохраняя высокие значения в течение 24 часов. *A20* начал увеличиваться через 2 часа после стимуляции и достиг максимальных значений увеличения в 6,5 раза ( $6,5 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) через 4 часа, а высокие значения увеличения в 6,2 раза ( $6,2 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) сохранялись в течение 12 часов и уменьшались в 2,2 раза ( $2,2 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ) через 24 часа.



**Рисунок 5.4 – Относительная экспрессия генов *TLR4*, *NOD2*, *TNF-α*, *A20* и *ATF3* при стимуляции глюкозаминилмурамилдипептидом *in vitro* в мононуклеарных клетках человека через 30 минут, 1, 2, 4, 12 и 24 часа**

*Примечание:* \* –  $p < 0,01$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

Экспрессия *ATF3* увеличивалась гораздо медленнее; только через 2 часа повышалась в 2,1 раза ( $2,1 \pm 0,1$ ;  $p < 0,01$ ), максимальные значения повышения в 6,3 раза ( $6,3 \pm 0,3$ ;  $p < 0,01$ ) имели место через 4 часа, а повышенный уровень экспрессии сохранялся в течение 24 часов.

При этом наибольшая чувствительность к стимуляции мононуклеаров с помощью ЛПС и ГМДП выявлена в отношении *TNF-α*, экспрессия генов которого отчетливо нарастала, начиная с 1 часа с максимумом через 12 часов.

В целом изучение динамических изменений экспрессии генов деубиквитиназы *A20* и фактора транскрипции *ATF3*, ограничивающих воспаление, и генов рецепторов врожденного иммунитета (*TLR4* и *NOD2*) показало, что на начальном этапе воздействия ББП увеличивается экспрессия *TLR4*, *NOD2* и *TNF-α*, что способствует появлению петли положительной обратной связи и поддержанию воспаления, тогда как гены *ATF3* и *A20* - регуляторов воспаления - экспрессируются с задержкой по времени и формируют петлю отрицательной обратной связи.

На основании обнаруженного механизма регуляции воспалительного процесса можно сделать вывод, что предварительное воздействие фрагментов бактериальных клеточных стенок мурамилпептида и липополисахарида модулирует защиту от острого воспаления. При этом критически важными параметрами являются время и концентрация ББП. Таким образом, в результате исследования сигнальных путей при активации ББП были получены новые данные о динамических изменениях, ответственных за ограничение воспалительных реакций.

## **5.2 – Влияние глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на внутриклеточные сигнальные пути НК-клеток *in vitro***

Для определения механизмов цитотоксического и цитостатического действия производного мурамилдипептида ГМДП-ОН на линии опухолевых клеток, обнаруженного ранее [12], проведена сравнительная оценка экспрессия генов, мембранных рецепторов, цитокинов и белков, контролирующих проявление функциональной активности НК-клеток. НК-клетки выделяли из суспензии мононуклеаров 5 доноров, инкубировали с ГМДП-ОН (10 мкг/мл) (экспериментальная группа) и без ГМДП-ОН (контрольная группа) в течение 6 и 16 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> (таблицы 2.4; 5.1). Результаты исследования выражены в виде соотношения натуральных логарифмов экспериментального образца с ГМДП-ОН к контрольному образцу без ГМДП-ОН.

В результате исследований выявлено, что экспрессия под действием ГМДП-ОН гена *CRKL*, продукт которого активирует киназы RAS и JUNK, а также трансформирует фибробласты, достоверно повышалась на 48-70% в первые 6 часов ( $p < 0,05$ ), сохраняя повышенные значения на протяжении 16 часов, тогда как экспрессии гена *FYN*, кодирующего тирозинкиназу семейства CRK, которая участвует в перфорин-зависимом киллинге инфицированных клеток, оставалась на прежнем уровне под действием ГМДП-ОН (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Экспрессия генов в НК-клетках под влиянием ГМДП-ОН

Гены	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Образец 4		Образец 5	
	время инкубации с ГМДП-ОН (10 мкг/мл), ч									
	6	16	6	16	6	16	6	16	6	16
<i>CRKL</i>	1,67*	1,41*	1,56*	1,26	1,72*	1,41*	1,70*	1,48*	1,47*	1,37
<i>CRK</i>	1,06	1,19	1,06	1,12	1,11	1,13	1,23	1,20	1,06	0,95
<i>FYN</i>	1,05	1,21	0,93	1,17	0,98	1,19	1,16	1,28	0,87	1,08
<i>SYK</i>	0,47*	0,87	0,45*	0,71	0,61*	0,82	0,50*	0,98	0,49*	0,84
<i>ZAP70</i>	0,82	1,56*	0,82	1,44*	0,94	1,61*	1,04	1,67*	0,83	1,45*
<i>RAC3</i>	1,26	1,63*	0,98	1,58*	1,10	1,62*	1,28	1,82*	0,93	1,39
<i>RAC2</i>	1,21	1,06	1,11	1,06	1,13	1,14	1,34	1,07	1,17	1,03
<i>RAC1</i>	0,78	0,79	0,69	0,60	0,74	0,65	0,93	0,91	0,72	0,74
<i>RAP1A</i>	1,19	1,68*	1,05	1,62*	1,31	1,67*	1,40	1,79*	1,22	1,68*
<i>RAPGEF1</i>	1,21	1,46*	1,16	1,37	1,34	1,47*	1,28	1,47*	1,01	1,15
<i>RAP2A</i>	1,48*	1,41	1,29	1,33	1,30	1,44*	1,72*	1,42*	1,41*	1,34
<i>VAV3</i>	0,84	1,91*	0,81	1,89*	0,84	1,97*	0,99	1,98*	0,72	1,91*
<i>VAV2</i>	1,31	1,56*	1,29	1,51*	1,31	1,78*	1,32	1,58*	1,27	1,38
<i>VAV1</i>	0,54*	0,59*	0,47*	0,37*	0,58*	0,43*	0,55*	0,67	0,36*	0,46*
<i>PLCB1</i>	1,07	2,38*	0,95	2,21*	0,99	2,44*	1,11	2,43*	0,91	2,14*
<i>FCGR3A</i>	1,13	2,02*	0,98	1,82*	1,02	1,94*	1,18	2,11*	0,97	1,77*
<i>PLCG1</i>	0,82	1,29	0,78	1,14	0,98	1,17	0,95	1,30	0,84	1,14
<i>PLCG2</i>	0,55*	0,39*	0,46*	0,37*	0,46*	0,41*	0,55*	0,44*	0,41*	0,20*
<i>PIK3R3</i>	1,92*	2,07*	1,79*	2,04*	1,85*	2,09*	1,94*	2,09*	1,75*	2,04*
<i>PIK3R1</i>	1,06	1,66*	1,03	1,54*	1,11	1,55*	1,21	1,66*	1,04	1,57*
<i>PIK3C2G</i>	1,46*	1,37	1,34	1,24	1,44*	1,29	1,67*	1,40	1,47	1,21
<i>IFNA1</i>	1,45*	2,34*	1,26	2,23*	1,26	2,28*	1,48*	2,36*	1,32	2,25*
<i>IFNA6</i>	1,52*	2,02*	1,47*	1,99*	1,55*	2,18*	1,54*	2,13*	1,47*	2,04*
<i>IFNAR1</i>	1,24	1,83*	1,21	1,72*	1,43*	2,00*	1,43*	1,85*	1,19	1,78*
<i>IFNA21</i>	0,65	1,70*	0,45*	1,69*	0,60	1,76*	0,67	1,74*	0,52*	1,72*
<i>STAT6</i>	1,04	2,33*	0,81	2,30*	0,91	2,32*	1,10	2,41*	0,93	2,31*
<i>STAT5A</i>	1,29	1,64*	1,00	1,49*	1,00	1,72*	1,42*	1,74*	1,18	1,52*

## Продолжение таблицы 5.1

Гены	Образец 1		Образец 2		Образец 3		Образец 4		Образец 5	
	время инкубации с ГМДП-ОН (10 мкг/мл), ч									
	6	16	6	16	6	16	6	16	6	16
<i>STAT2</i>	0,92	1,47*	0,92	1,44*	1,08	1,52*	1,08	1,50*	0,97	1,43*
<i>MAPK8IP1</i>	1,10	2,74*	0,87	2,55*	0,96	2,65*	1,15	2,76*	0,90	2,51*
<i>MAPK2K7</i>	2,32*	2,37*	2,21*	2,26*	2,26*	2,51*	2,41*	2,42*	2,22*	2,23*
<i>MAP4K2</i>	1,22	2,16*	1,20	2,15*	1,25	2,40*	1,28	2,18*	1,23	1,95*
<i>MAP3K6</i>	1,79*	2,13*	1,76*	2,10*	1,84*	2,13*	1,92*	2,19*	1,82*	2,14*
<i>MAPKAPK5</i>	0,59	2,03*	0,54	2,01*	0,57	2,01*	0,72	2,10*	0,43*	1,95*
<i>MAPK8</i>	0,66	1,84*	0,45*	1,74*	0,61	1,77*	0,78	1,86*	0,48*	1,75*
<i>MAP3K14</i>	0,76	1,84*	0,71	1,75*	0,94	1,82*	1,03	1,88*	0,74	1,83*
<i>MAPKAPK3</i>	1,38	1,80*	1,37	1,76*	1,38	1,81*	1,39	1,88*	1,38	1,71*
<i>MAPK13</i>	1,51*	1,79*	1,49*	1,74*	1,57*	1,81*	1,60*	1,81*	1,51*	1,77*
<i>MAP3K10</i>	0,89	1,59*	0,75	1,52*	0,79	1,52*	0,91	1,66*	0,78	1,54*
<i>MAPK10</i>	1,08	1,53*	0,95	1,36*	1,12	1,36*	1,11	1,61*	0,79	1,34*
<i>MAP2K2</i>	0,84	1,46*	0,84	1,37*	1,04	1,45*	0,96	1,48*	0,91	1,22*
<i>MAP4K3</i>	1,19	1,41*	1,09	1,32*	1,11	1,36*	1,34	1,53*	1,06	1,34*
<i>TNFRSF9</i>	0,80	3,32*	0,56*	3,30*	0,58*	3,37*	0,92	3,32*	0,58	3,23*
<i>TNFRSF14</i>	1,61*	2,29*	1,53*	2,23*	1,55*	2,25*	1,65*	2,46*	1,44*	2,28*
<i>TNFSF18</i>	2,11*	1,63*	2,11*	1,58*	2,12*	1,65*	2,20*	1,79*	2,11*	1,66*
<i>TNFAIP6</i>	0,74	1,61*	0,63	1,55*	0,64	1,69*	0,80	1,66*	0,69	1,62*
<i>TNFRSF13C</i>	0,80	1,59*	0,54	1,57*	0,55*	1,81*	0,82	1,86*	0,59	1,56*
<i>TNFRSF10B</i>	1,00	1,54*	0,82	1,53*	1,04	1,63*	1,18	1,54*	0,85	1,53*

*Примечание:* Представлены значения отношения  $\ln A / \ln K$ , где  $\ln A$  – натуральный логарифм нормализованного значения сигнала в опытной пробе А (инкубация с ГМДП-ОН);  $\ln K$  – то же, но для контрольной пробы К (инкубация клеток в отсутствие ГМДП-ОН). \* –  $p < 0,05$  – достоверность различий в опытной пробе (А) по сравнению с контрольной пробой (К).

Известно, что внутриклеточные киназы, ZAP70 и SYK, обладающие большой степенью гомологии и часто конкурирующие между собой, запускают активацию НК-клеток после связывания их мембранных рецепторов с трансформированными или инфицированными клетками. Активация ZAP70 в НК-клетках приводит к высвобождению гранзима В, посредством которого

реализуется противоопухолевая активность НК-клеток, в частности, при множественной миеломе [347].

ГМДП-ОН в условиях *in vitro* через 16 часов на 50% увеличивал экспрессию гена *ZAP70* ( $p < 0,05$ ), при этом на раннем этапе почти в 2 раза снижалась экспрессия *SYK* ( $p < 0,05$ ) (таблица 5.1).

Снижение экспрессии *SYK* может также способствовать увеличению киназной активности *ZAP70* в связи с отсутствием конкурента за связывание с мишенью, а также может быть объяснено необходимостью запуска в клетке других сигнальных путей.

Наблюдалось усиление экспрессии более чем в 2 раза ( $p < 0,05$ ) изоформ фосфоинозитид-3-киназы PI3K (*PIK3R1* и *PIK3R3*) на ранних (6 часов) и поздних (16 часов) этапах, а также увеличение через 16 часов экспрессии гена *FCGR3A*, который кодирует рецептор Fc-фрагмента IgG (CD16a). Отмечено также более чем двукратное снижение *PLCG2* как на раннем, так и на позднем этапе воздействия ГМДП-ОН ( $p < 0,05$ ) (таблица 5.1).

Наряду с этим, ГМДП-ОН вызывал существенное увеличение экспрессии генов интерферонов 1-го типа и их рецепторов на протяжении всего периода наблюдения, демонстрируя таким образом влияние на основные эффекторные функции НК-клеток (таблица 5.1).

Активируемый внеклеточными стимулами сигнальный путь митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) выполняет в клетке множество функций: контроль транскрипции генов, участвующих в метаболизме, пролиферации и апоптозе. Возрастание экспрессии адаптерных белков сигнального пути МАРК на раннем этапе и более, чем в два раза на позднем этапе является основанием для утверждения, что вызванное ГМДП-ОН увеличение экспрессии генов МАРК пути ускоряет пролиферацию и усиливает функциональную активность НК-клеток. Известно, что *MAP2K7* и *MAP2K4* фосфорилируют *c-Jun*, который активируется под действием стрессорных факторов, поддерживает активность циклина D1, участвуя таким образом в регуляции клеточного цикла [382].

Обнаруженное в настоящем исследовании продолжительное увеличение экспрессии генов адаптерных белков MAPK пути при воздействии ГМДП-ОН выявляет способность мурамилпептида инициировать MAPK-зависимый сигнальный путь, приводящий в итоге к высвобождению цитотоксических гранул и реализации цитотоксических функций.

Известно, что для созревания NK-клеток необходима активация сигнальных путей генов *VAV1* и *VAV2* [705]. Между тем, под влиянием ГМДП-ОН увеличивалась экспрессия гена *VAV2* ( $p < 0,05$ ), и уменьшалась экспрессия *VAV1* ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует об избирательности индуцированной экспрессии и дифференцировки активации сигнальных путей *VAV* под действием мурамилпептида.

ГМДП-ОН в значительной степени уменьшал экспрессии генов  $\beta$ -фосфолипазы *PLCG1* ( $p > 0,05$ ) и  $\gamma$ -фосфолипазы *PLCG2* ( $p < 0,05$ ), участвующих в метаболизме фосфолипидов. Поскольку продукты генов *STAT* способствуют активации и сохранению жизнеспособности NK-клеток в условиях окислительного стресса, выявленные нами эффекты ГМДП-ОН по усилению экспрессии генов *STAT* на более позднем этапе свидетельствуют об увеличении потенциала выживаемости и активности NK-клеток, имеющего первостепенное значение в период развития патологических процессов.

Исследованиями установлено, что инкубация выделенных NK-клеток человека с ГМДП-ОН *in vitro* приводит к 1,5-2,5-кратному увеличению уровня транскриптов следующих генов, ассоциированных с процессами трансдукции сигналов от рецепторов NK-клеток (в скобках указаны контролируемые генами параметры функционирования клеток):

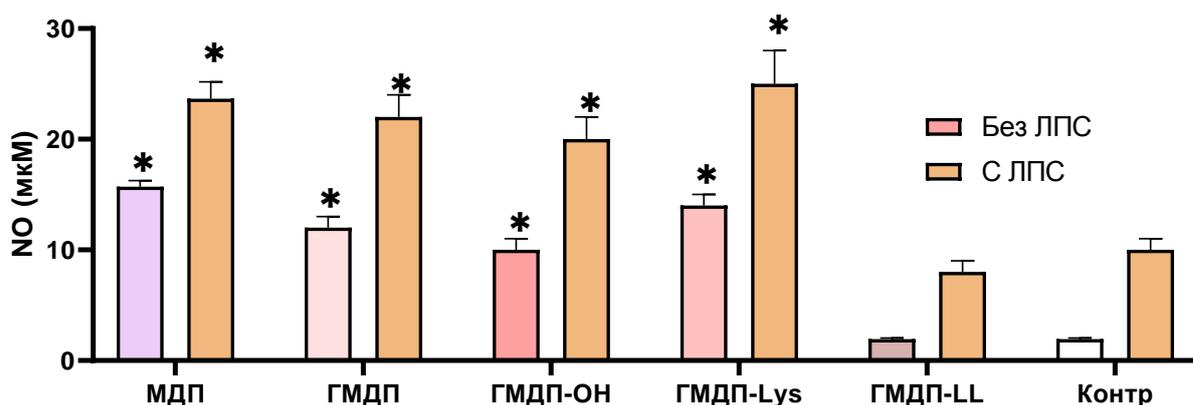
- 1) *STAT5A*, *STAT2* (связаны с выживанием NK-клеток);
- 2) *PLCB1*, *PIK3R1* и *PIK3R3* (связаны с метаболизмом фосфолипидов);
- 3) *STAT6* (связан с продукцией противовоспалительных цитокинов);
- 4) *CRKL*, *VAV-2*, *ZAP70*, *RAP1A*, *PLCB1*, *FCGR3A*, семейство *MAPK*, *IFNA1*, *TNFRSF9*, *TNFSF14* (связаны с цитотоксическими реакциями NK-клеток).

Кроме того, профиль сигнальных путей, определяемый по изменению транскриптома НК -клеток под воздействием ГМДП-ОН, помогает объяснить обнаруженный ранее противоопухолевый эффект препарата.

Таким образом, изучение транскриптома НК-клеток при воздействии ГМДП-ОН выявило способность данного ББП влиять на экспрессию генов НК-клеток человека, регулирующих сигнальные пути, ответственные за реализацию эффекторной активности НК-клеток.

### 5.3 – Роль мурамилпептидов и липополисахарида в регуляции экспрессии оксида азота

Структурно-функциональные исследования мурамилпептидов *in vitro* продемонстрировали значимость D-конфигурации изоглутамина: мурамилпептид ГМДП-LL не проявлял активности (рисунок 5.5).



**Рисунок 5.5 – Выделения оксида азота в клеточной культуре RAW264.7 при воздействии мурамилпептидов и липополисахарида**

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$  – при сравнении с контрольными значениями без мурамилпептидов.

Среди мурамилпептидов с L- аланином и D-изоглутамином замена гидроксильного радикала в положении R<sub>2</sub> на Lys увеличивает биологическую активность, способствуя максимальному освобождению оксида азота. Полученные данные важно учитывать при разработке лекарственных средств на основе мурамилпептидов.

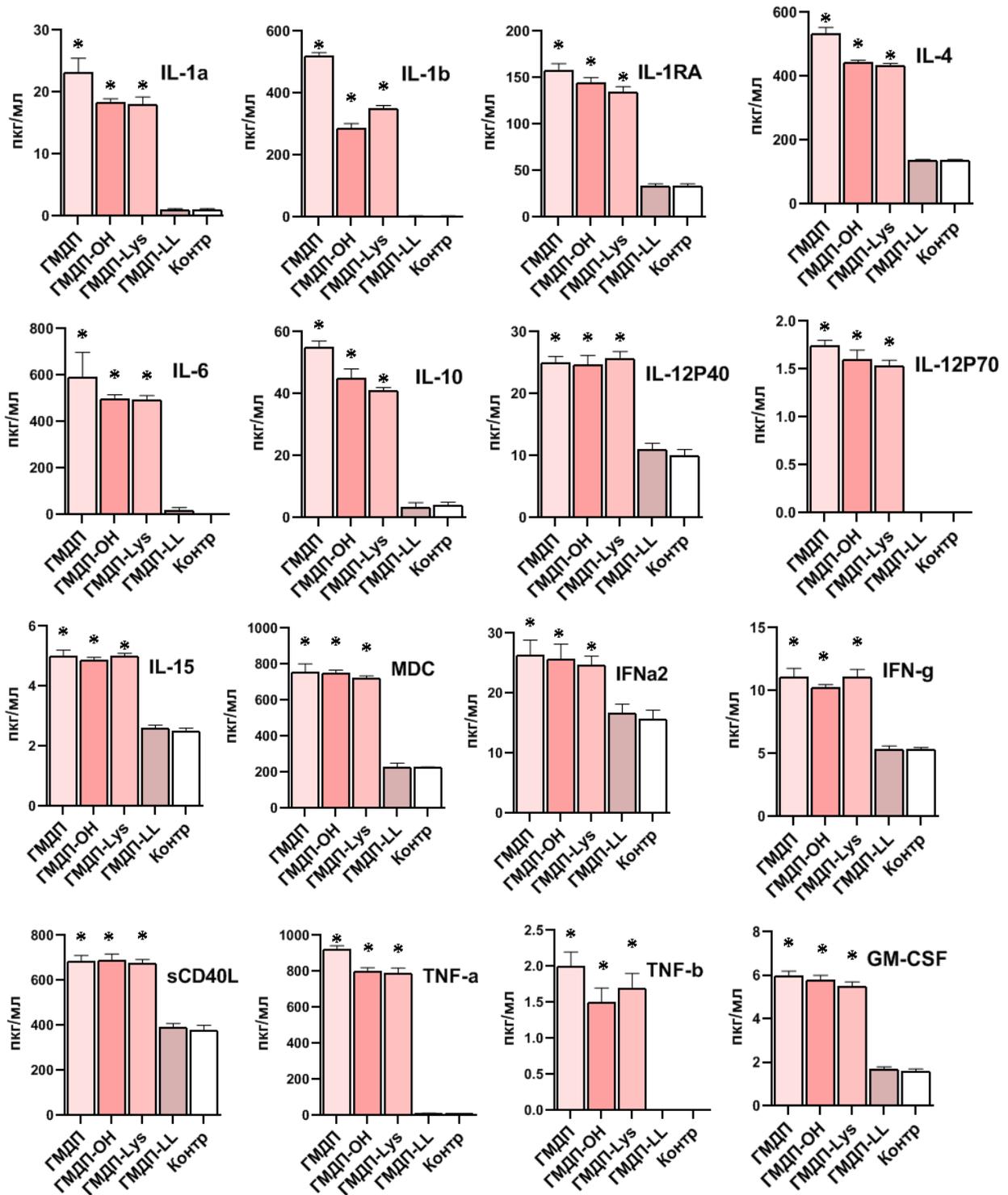
В результате исследования, таким образом, обнаружены структурно-функциональные закономерности, свидетельствующие о том, что L-D-изомерная форма гликопептида необходима для выработки оксида азота, который является универсальным мессенджером многочисленных физиологических процессов (увеличение бактерицидной активности макрофагов, участие в регуляции сосудистого тонуса, давления и поддержания функции эндотелия).

#### **5.4 – Влияние биорегуляторов бактериального происхождения на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов**

##### **5.4.1– Влияние дисахарид содержащих мурамилпептидов на продукцию цитокинов**

Впервые на моноклеарных клетках доноров исследована способность мурамилпептидов ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys и ГМДП-LL влиять на продукцию цитокинов IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF-a, TNF- $\beta$ , GM-CSF (рисунки 5.6).

Обнаружено, что ГМДП-LL не оказывал влияния на продукцию цитокинов, что согласуется с ранее полученными данными по индукции экспрессии оксида азота. При этом мурамилпептиды с L-конфигурацией аланина и D-конфигурацией изоглутамина (L-D мурамилпептиды) не изменяли значения IL-2, IL-3, IL-5, IL-9 (данные не представлены).



**Рисунок 5.6 – Влияние мурамилпептидов на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов**

Примечание: МДП, ГМДП, ГМДП-ОН, ГМДП-Lys ГМДП-LL – мурамилпептиды; \* –  $p < 0,05$  – при сравнении с контрольными значениями.

Исследованиями обнаружено, что L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) стимулируют выработку провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-

1 $\beta$ , IL-6 и TNF- $\alpha$ , участвующих в остром и системном воспалении [93]. При этом максимальный эффект обнаружен при индукции IL-1 $\beta$  (до 520 пкг/мл), IL-6 (до 595 пкг/мл) и TNF- $\alpha$  (до 930 пкг/мл). Наиболее активным из исследованных мурамилпептидов оказался ГМДП

Примечательно, что L-D мурамилпептиды стимулировали выработку не только провоспалительных цитокинов IL-1a и IL-1b, но и их антагониста - антагониста рецептора интерлейкина -1 (IL-1RA), демонстрируя возможность контроля как про- так и противовоспалительных процессов.

Цитокин IL-10, регулирующий баланс иммунного ответа, снижал экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах, он также может подавлять активность макрофагов и дендритных клеток. IL-10 повышался при воздействии ГМДП до 56 мкг/мл, что свидетельствует о возможности его использования в случае потери способности Th17 продуцировать IL-10 и предотвращения приобретения Th17 патогенного фенотипа.

Под действием ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys значительно увеличивалось содержание IL-12P40 и IL-12P70, являющихся субъединицами цитокина IL-12, который играет жизненно важную роль в стимулировании дифференцировки Th1 клеток, усиливает клеточный иммунитет против внутриклеточных патогенов.

L-D мурамилпептиды более чем в 2 раза повышали IL-15, который ответственен за рост и дифференцировку T-, B-, лимфоцитов, естественных киллеров и дендритных клеток. Он также усиливает цитолитическую активность CD8+T-клеток.

Примечательно, что MDC (хемокин, полученный из макрофагов) увеличивался более чем в три раза под действием L-D мурамилпептидов. При этом MDC участвует в формировании и функционировании тимуса, привлекая моноциты, дендритные клетки и естественные клетки-киллеры, а также выполняет функции регулирования иммунных реакций кожи.

L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) увеличивали выработку интерферонов I (IFN $\alpha$ 2) и II типа (IFN $\gamma$ ) на 50% и 100%

соответственно. Интерфероны I и II типа обладает противовирусной, антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью и усиливают экспрессию белков МНС класса I [160, 669].

sCD40L - растворимая форма лиганда CD40, преимущественно экспрессируемая на активированных Т-клетках, необходима для созревания В-клеток и развития гуморального иммунитета, регуляции функции дендритных клеток. Увеличение количества sCD40L на 70% под действием L-D мурамилпептидов демонстрирует потенциал мурамилпептидов влиять на адаптивный иммунитет.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), стимулирующий выработку гранулоцитов и макрофагов из клеток-предшественников костного мозга и усиливающий функциональную активность зрелых лейкоцитов, при действии L-D мурамилпептидов повышался более чем в два раза до 6 пкг/мл.

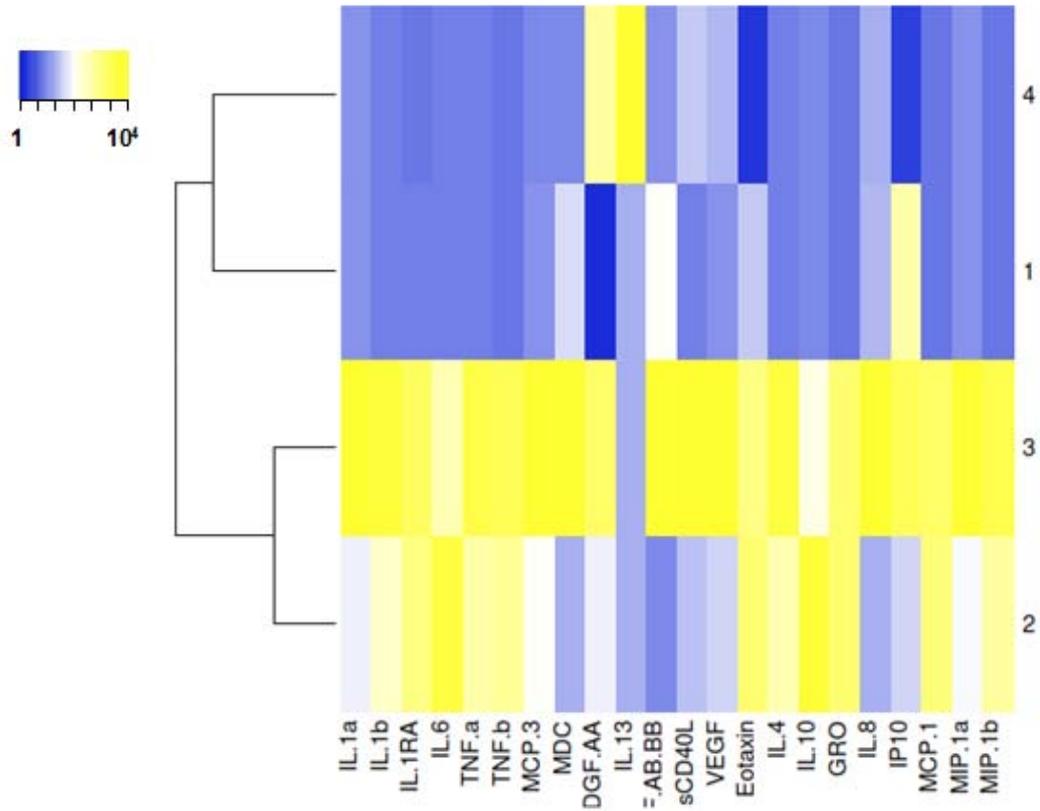
Примечательно, что L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) увеличивали продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, указывая на возможность регулирования разнонаправленных процессов в зависимости от контекста и микроокружения.

#### **5.4.2 – Влияние липополисахарида глюкозаминилмурамилдипептида и бактериоцина низина на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов**

Исследование влияния ЛПС, мурамилпептида и бактериоцина низина на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками доноров флуоресцентным методом показало существенные различия в их активности. Установлено, что самое активное влияние на мононуклеарные клетки оказывали мурамилпептид и липополисахарид (*рисунки 5.7; 5.8*).

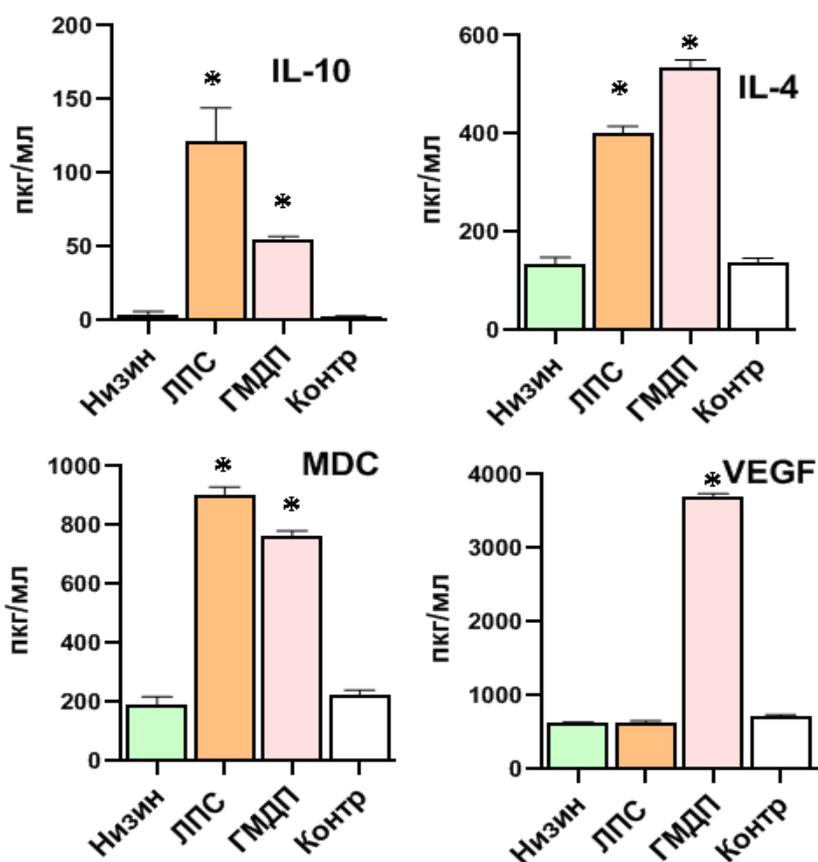
Мурамилпептид повышал уровни всех исследуемых белков: EGF, FGF-2, Eotaxin, FLT-3L, GRO, IL-10, MCP-3, MDC, PDGF-AA, IL-13, PDGF-AB/BB, sCD40L, IL-1RA, IL-1a, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-8, IP10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, TNF-

а, TNF-b, VEGF, за исключением IL-13. Низин показал наименее выраженную активность в увеличении исследованных субстанций, а PDGF-AA понижался при его воздействии в два раза (рисунки 5.7; 5.8).



**Рисунок 5.7 – Изменение выработки цитокинов, хемокинов и факторов роста при воздействии липополисахарида, мурамилпептидов и низина мононуклеарными клетками**

*Примечание:* 1 – образцы с низином; 2 – образцы с ЛПС; 3 – образцы с ГМДП; 4 – контрольные образцы. Значения представлены в диапазоне 1-10<sup>4</sup> пкг/мл.



**Рисунок 5.8 – Изменение выработки IL-10, IL-4, хемокина, полученного из макрофагов (MDC), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) при воздействии липополисахарида, мурамилпептидов и низина мононуклеарными клетками**

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$  – при сравнении с контролем.

В проведенном исследовании ЛПС и ГМДП повышали выработку IL-10 в 42 и 22 раза соответственно, при этом низин также повышал его уровень, но в гораздо меньшей степени, увеличение было в три раза по сравнению с контрольным значением. Противовоспалительный цитокин IL-10 регулирует баланс иммунного ответа, снижает экспрессию цитокинов Th1, антигенов МНС класса II и костимулирующих молекул на макрофагах, может также подавлять активность макрофагов и дендритных клеток.

IL-4 принадлежит ключевая роль в содействии дифференцировке наивных Т-хелперов в Th2, он также стимулирует активированную пролиферацию В- и Т-клеток, усиливает выработку МНС класса II. Известно, что IL-4 избирательно воздействует на продукцию цитокинов и хемокинов стимулированными

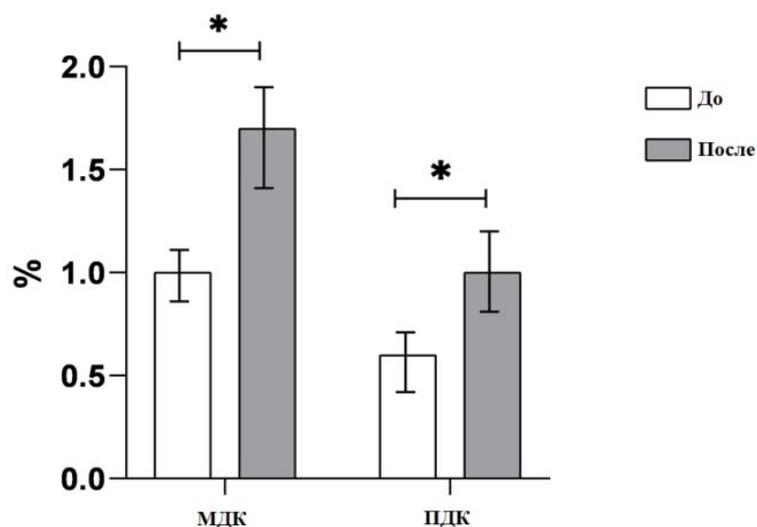
липополисахаридом макрофагах: увеличивает экспрессию TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , макрофагальный воспалительный белок-2, но ингибирует продукцию IL-12p40 и таким образом, изменяя спектр вырабатываемых цитокинов [424]. Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF) повышался при воздействии ГМДП в 4,6 раза.

### **5.5 – Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида, катехоламинов и низина на фенотипические изменения дендритных клеток человека в системе *in vivo* и *ex vivo***

Дендритные клетки (ДК) являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом, координируя иммунный ответ на бактериальные и вирусные инфекции, а также на трансформированные клетки, а оптимальное соотношение их субпопуляций и степень их зрелости является необходимым условием поддержания иммунного гомеостаза [582].

Известно, что под действием активационных стимулов меняется фенотип предшественников дендритных клеток, на их поверхности экспрессируются маркеры CCR7, XCR1 и CD103, что обеспечивает возможность их передвижения в ткани для формирования адекватного ответа на активационный стимул. Кроме того, дендритные клетки обеспечивают толерантность к безвредным антигенам, предотвращают излишнюю реактивность иммунокомпетентных клеток [355].

Проведенное исследование относительного количества и фенотипических характеристик ДК в периферической крови 42 доноров методом цитофлуориметрии показало, что содержание ДК в среднем составляло 1,41% (0,22-1,85%) от общего количества клеток периферической крови. Между тем, после 10-дневного курса применения ГМДП с целью иммунопрофилактики сезонных респираторных заболеваний количество общего пула ДК увеличилось до 2,72% (0,93-2,95%), и, в том числе, уровень миелоидных ДК (МДК) и плазмоцитоидных ДК (ПДК) увеличился в 1,9 раз ( $p < 0,05$ ), а соотношение между этими популяциями оставалось на том же уровне - 1,8 (рисунк 5.9).

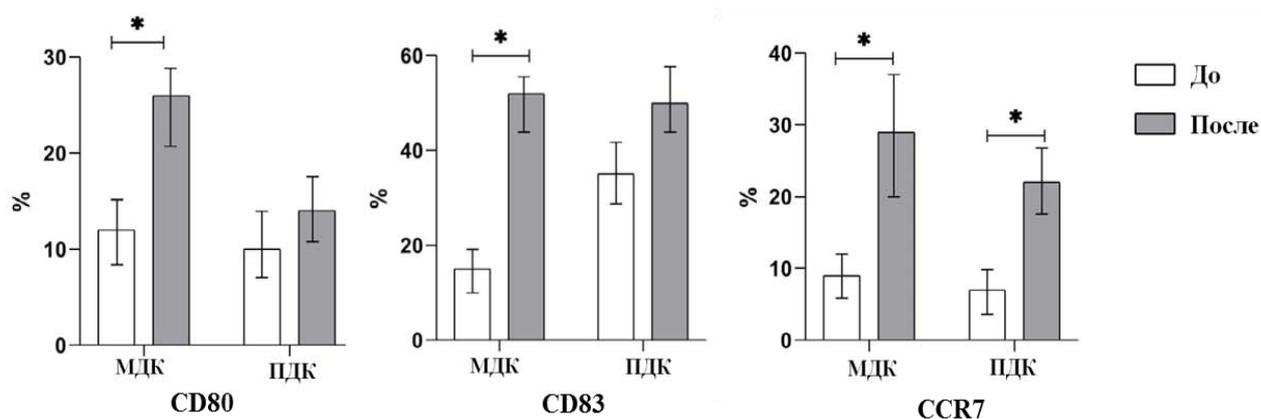


**Рисунок 5.9 – Изменение соотношения субпопуляций дендритных клеток после приема препарата на основе глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$ .

Известно, что основными маркерами, определяющими зрелость ДК, являются рецепторы CD80, CD83 и CCR7, обеспечивающие миграцию ДК в лимфатические узлы и взаимодействие их с Т-клетками [344]. Исследованиями выявлены существенные изменения фенотипов функционально значимых популяций ДК после приема ГМДП в виде статистически значимого повышения экспрессии маркеров дифференцировки CD80, CD83 и CCR7 на всех ДК (*рисунок 5.10*).

Оценка влияния 10-дневного курса ГМДП на уровень транскрипции мРНК генов *XCRI*, *CD11b* и *CD103* в мононуклеарах периферической крови доноров относительно исходного уровня показала тенденцию к возрастанию относительного уровня транскрипции мРНК генов *CD11b* (*рисунок 5.11*).

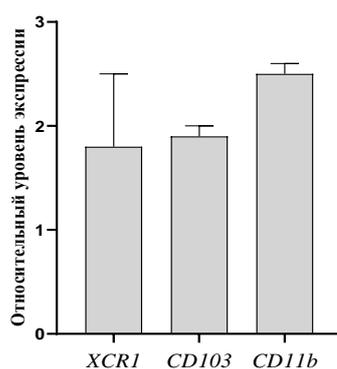


Р

**Рисунок 5.10 – Изменение соотношения субпопуляций и фенотипа дендритных клеток после приема препарата на основе глюкозаминилмурамилдипептида**

*Примечание:* \* –  $p < 0,05$ .

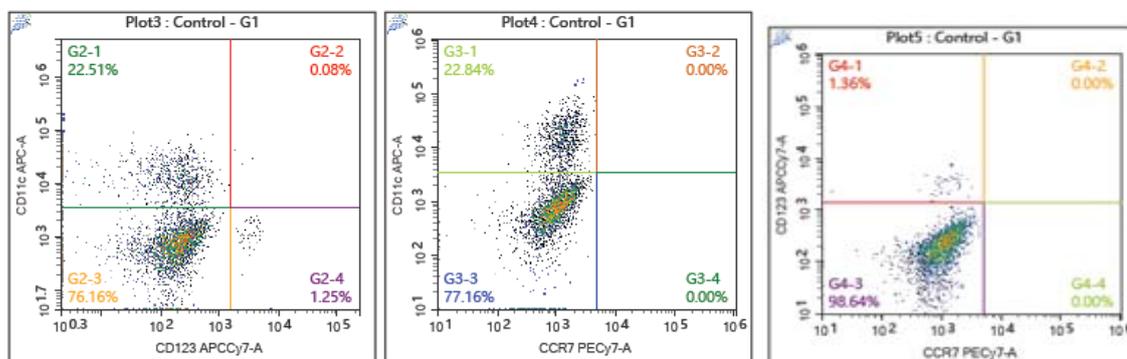
Известно, что интегрин альфа-M (CD11b) участвует в сайт-специфической локализации ДК совместно с Th17, конститутивно поддерживая созревание Th17 [391, 495]. CD11b+ ДК экспрессируют белки, обеспечивающие контакты с эпителиальными клетками с целью захвата дендритами, представителей микроорганизмов просвета кишечника [214]. Рецепторы CD11b, XCR1 и CD103 обеспечивают миграцию во вторичные лимфоидные органы, а затем в зону воспаления.



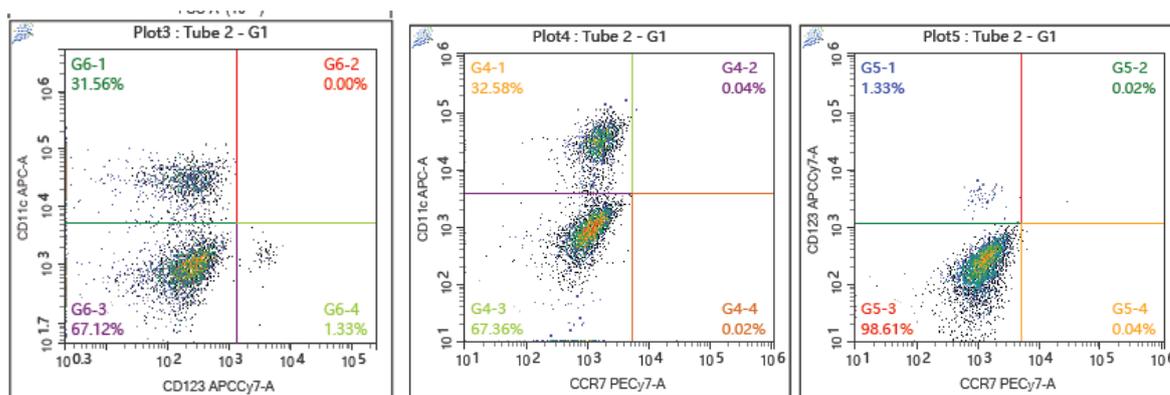
**Рисунок 5.11 – Изменение уровней транскрипции мРНК генов XCR1, CD11b и CD103 в мононуклеарных клетках периферической крови после 10-дневного курса глюкозаминилмурамилдипептида по отношению к исходному уровню**

После того, как была установлена способность ГМДП *in vivo* модулировать экспрессию поверхностных маркерных молекул в функционально значимых популяциях ДК крови студентов-спортсменов, включая маркер CCR7, было проведено исследование влияния ГМДП, а также ЛПС, адреналина и норадреналина в системе *ex vivo*. При занятиях спортом уровень катехоламинов в крови заметно повышается, для выявления вклада адреналина и норадреналина в изменение фенотипа ДК было изучено их влияние на изменение маркеров ДК.

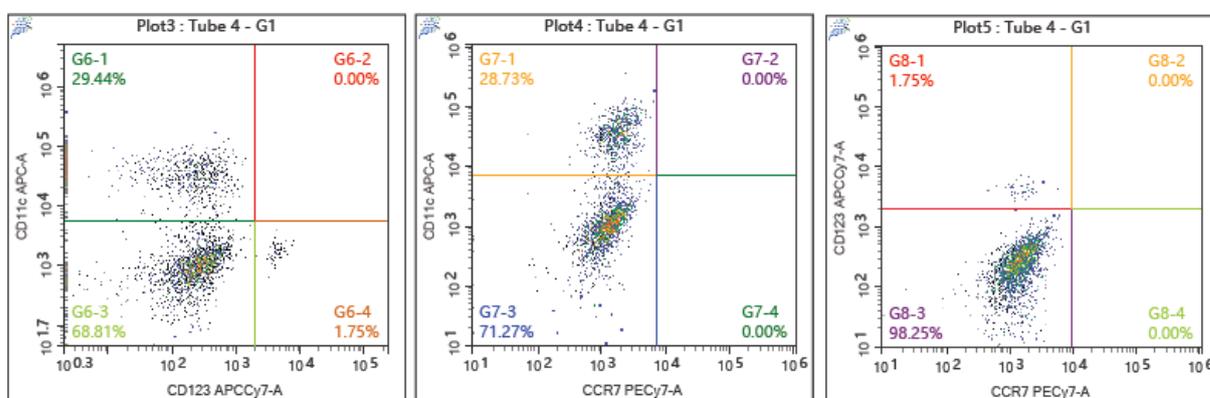
Исследованиями установлено, что внесение ГМДП, ЛПС, низина, адреналина и норадреналина в периферическую кровь доноров *ex vivo* не оказывало влияния на экспрессию гена рецептора хемокинов CCR7, тогда как ЛПС, ГМДП и норадреналин способствовали увеличению количества CD11c(+) ДК (рисунки 5.12-5.17). Важно отметить, что мембранный белок CD11c – это альфа-субъединица интегрин  $\alpha\text{X}\beta 2$ , а также рецептора комплемента 4 (CR4), и интегрин CD11c/CD18 взаимодействует с различными лигандами, в том числе с iC3b системы комплемента, фибриногеном, с молекулами межклеточной адгезии (ICAM) или ЛПС, и обеспечивает участие ДК в перестройке внеклеточного матрикса, фагоцитозе, миграции и клеточной адгезии [617]. Кроме того, ДК, лишенные CD11c, не способны реагировать на хемокины, индуцируемые воспалительными стимулами, такими как MCP, MIP1, MIP3 [212].



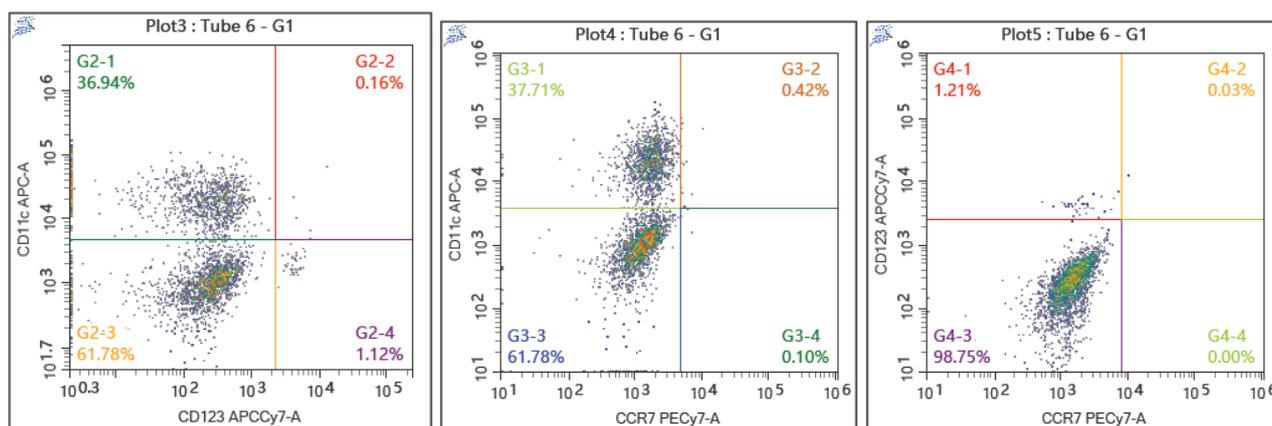
**Рисунок 5.12 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в контрольном образце**



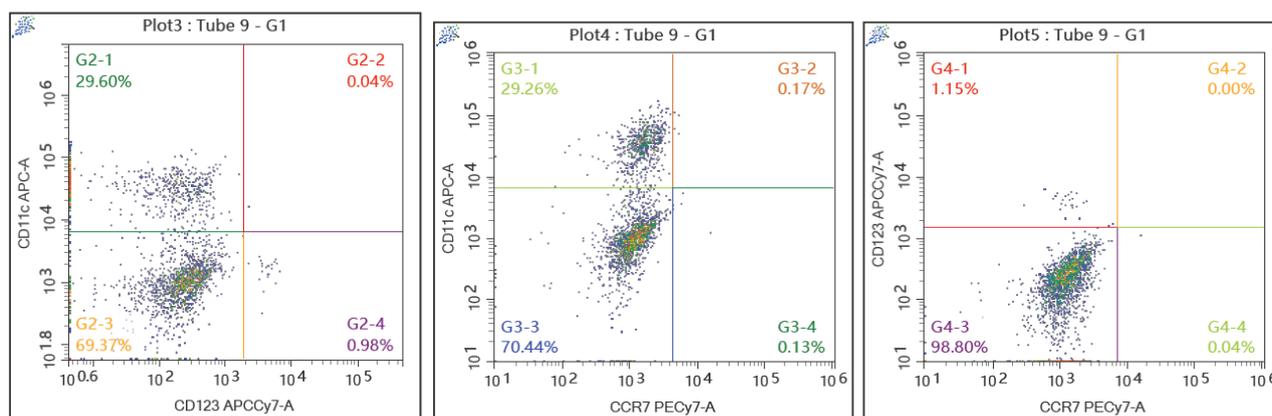
**Рисунок 5.13 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце  
PBMC в присутствии глюкозаминилмурамиддипептида**



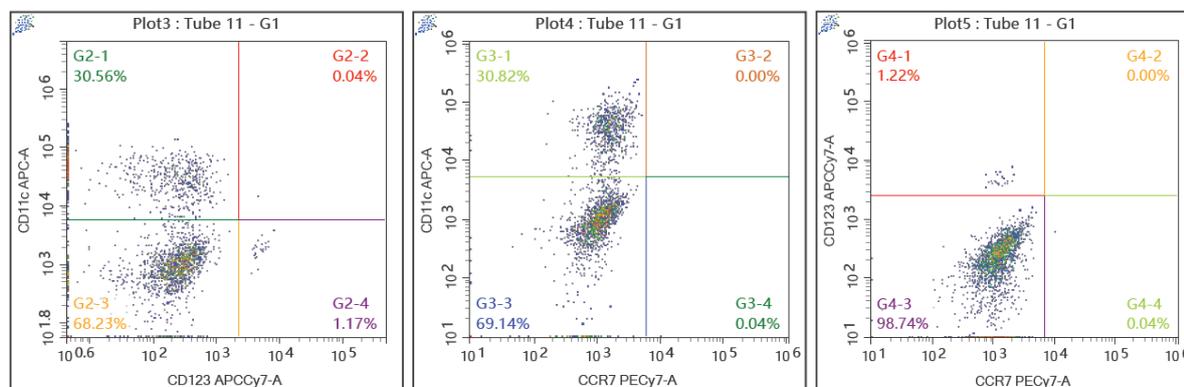
**Рисунок 5.14 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце  
PBMC в присутствии глюкозаминилмурамиддипептида**



**Рисунок 5.15 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце  
PBMC в присутствии норадреналина**



**Рисунок 5.16 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии глюкозаминилмурамилдипептида и норадреналина**



**Рисунок 5.17 – Экспрессия маркеров дендритных клеток в образце РВМС в присутствии глюкозаминилмурамилдипептида и норадреналина**

По результатам исследования ГМДП, ЛПС и норадреналин увеличивали количество CD11c(+)ДК на 29%, 31% и 64%, соответственно, тогда как адреналин и бактериоцин низин не оказывали статистически значимого влияния на исследуемые маркеры ДК (таблица 5.2).

При совместном введении норадреналина с ГМДП или ЛПС увеличение составляло 32% и 36% соответственно, что в значительной степени уступало воздействию только норадреналина (64%). Фактически, совместное введение ГМДП и норадреналина снижало количество CD11c+ДК относительно таковых при введении только норадреналина.

**Таблица 5.2 – Изменение экспрессии CD11c под влиянием липополисахарида, низина, глюкозаминилмурамилдипептида, адреналина и норадреналина, Me(Q0,25-Q0,75)**

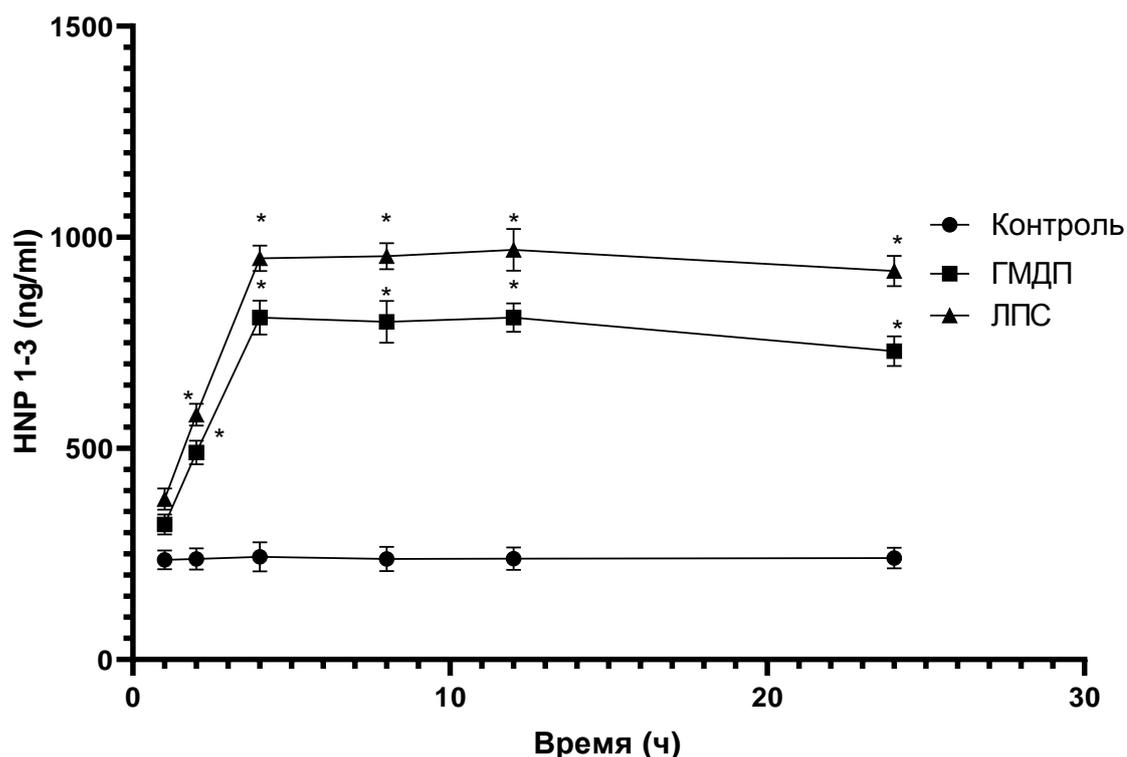
Контроль	ГМДП	ЛПС	Норадреналин	ГМДП+ Норадреналин	ЛПС+ Норадреналин	Адреналин	Низин
100%	129% *	131% *	164%*	132%*	136% *	110%	105%
(91-107)	(119-139)	(119-142)	(150-179)	(120-143)	(122-149)	(99-121)	(95-116)

*Примечание:* \* – достоверность различий в сравнении с контрольными значениями,  $p < 0,05$ .

### **5.6 – Влияние липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и катехоламинов на нейтрофильные гранулоциты человека**

Известно, что эндогенные катехоламины (адреналин и норадреналин), оказывают прямое модулирующее влияние на активность иммунных клеток посредством взаимодействия с  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ - и  $\beta 3$ - адренорецепторами (АР) на их клеточной мембране [428]. При этом  $\alpha 2$ -АР участвуют в стимуляции функций нейтрофилов, а цАМФ, индуцированный  $\beta 2$ -АР, оказывает иммунодепрессивное действие, подавляя Са-зависимые функции нейтрофилов и способность к образованию нейтрофильных внеклеточных ловушек [428]. Поскольку антимикробные альфа-дефенсины 1-3 (HNP1-3) нейтрофилов высвобождаются при активации рецепторов врожденного иммунитета и защите от патогенных бактерий, грибов и простейших [170, 574], интерес представляла оценка влияния ББП в присутствии адреналина и норадреналина на продукцию HNP1-3 нейтрофилами доноров в системе *in vitro*.

Исследование уровня HNP1–3 через 1, 2, 4, 8, 12 и 24 часа после воздействия ЛПС и ГМДП показало значительное увеличение их продукции уже через 4 часа, которое оставалось на высоком уровне до конца наблюдения - до 24 часов (*рисунок 5.18*).

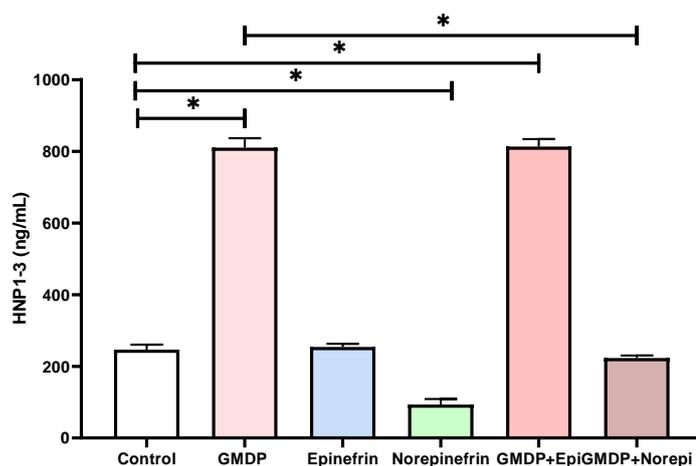


**Рисунок 5.18 – Влияние липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида на уровни HNP 1-3 нейтрофилов в системе *in vitro***

*Примечание:* данные для экспериментов выражены как среднее значение трех экспериментов; \* -  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

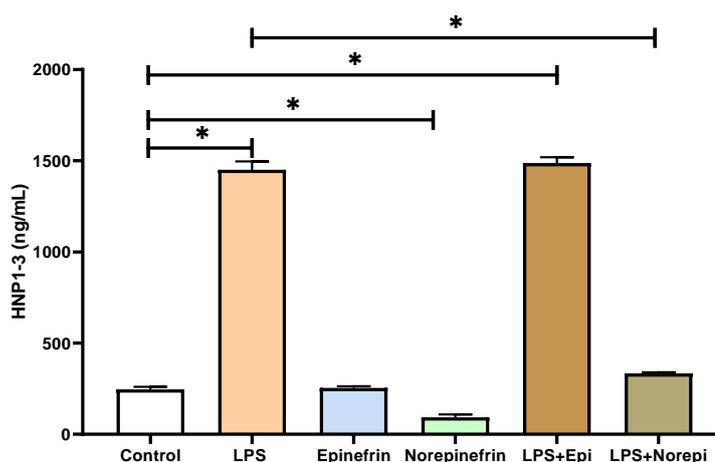
Исследование влияния ЛПС и ГМДП на продукцию альфа-дефенсинов нейтрофилами *in vitro* в присутствии адреналина и норадреналина показало, что ГМДП увеличивал синтез HNP1-3 в 3,2 раза ( $p < 0,05$ ) (рисунок 5.19), а ЛПС - в 5,8 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с нестимулированными клетками (рисунок 5.20).

В то время как адреналин не вызывал достоверных изменений в синтезе HNP1-3, норадреналин (норэпинефрин) снижал уровень дефенсинов HNP1-3 в 3 раза ( $p < 0,05$ ) в нестимулированной культуре клеток. Между тем, если адреналин не отменял стимулирующего действия ЛПС на уровень дефенсинов, то норадреналин достоверно снижал индуцированный ЛПС синтез HNP1-3 в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ).



**Рисунок 5.19 – Уровень пептидов нейтрофилов человека HNP 1-3 при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида, адреналина и норадреналина на нейтрофилы человека *in vitro***

*Примечание:* данные представлены как среднее значение трех измерений; \* -  $p < 0,05$  при сравнении значений соответствующих групп.



**Рисунок 5.20 – Уровень пептидов нейтрофилов человека HNP 1-3 при воздействии липополисахарида, адреналина и норадреналина на нейтрофилы человека *in vitro***

*Примечание:* данные представлены как среднее значение измерений; \* -  $p < 0,05$  при сравнении значений соответствующих групп.

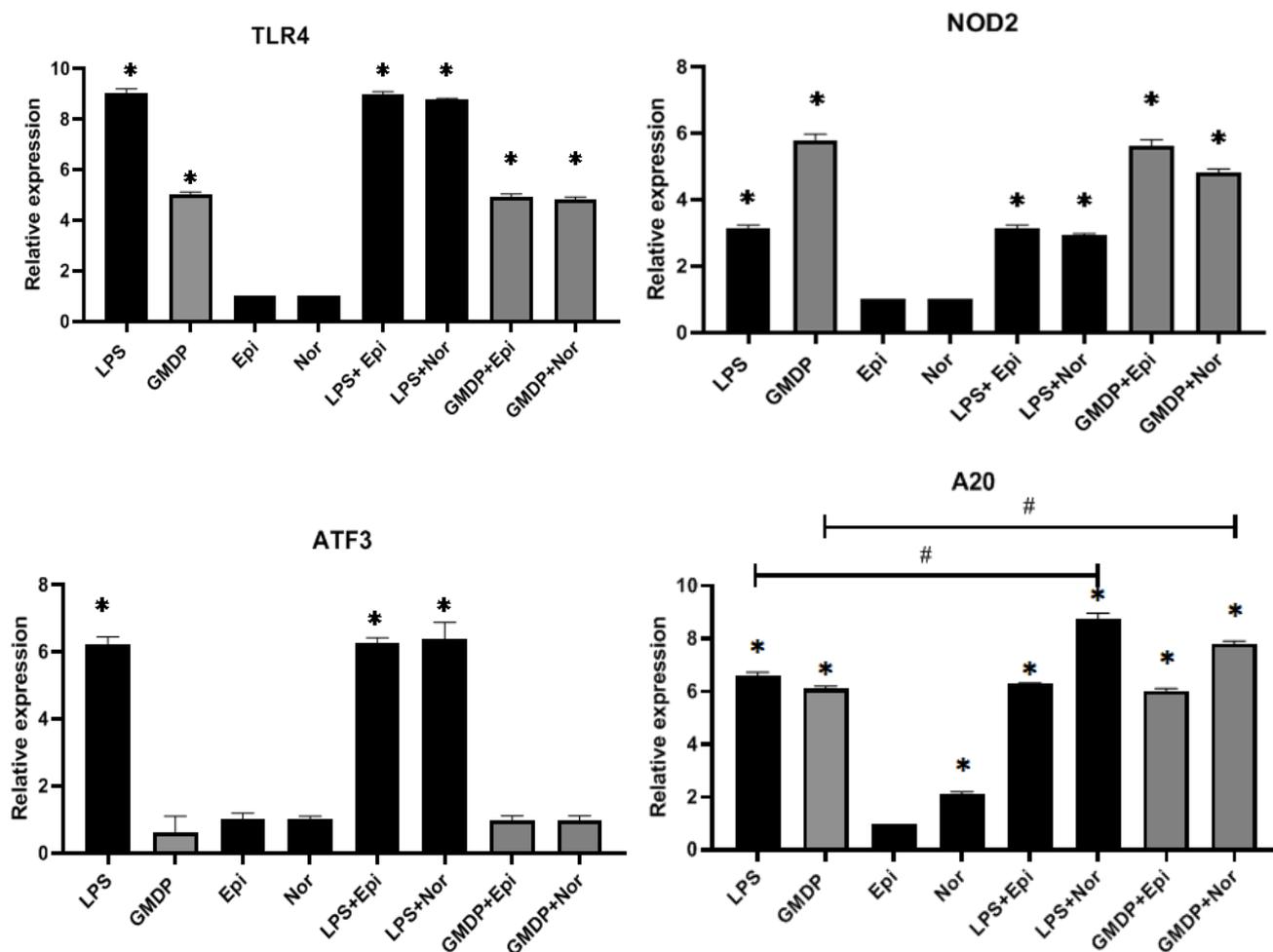
Сходный эффект катехоламинов наблюдался и в культуре нейтрофилов, стимулированных ГМДП: эpineфрин не отменял стимулирующего действия ГМДП, а норадреналин статистически значимо снижал индуцированный ГМДП синтез HNP1-3 в 3,6 раза ( $p < 0,05$ ) (рисунок 5.20). Это наблюдение важно,

поскольку чрезмерная продукция HNP1-3 может иметь патогенетическое значение при инфекционных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях.

С целью выявления возможной связи между изменениями синтеза HNP1-3 и изменениями уровней экспрессии рецепторов, ответственных за связывание ЛПС и ГМДП, исследовано влияние катехоламинов и ББП на уровни экспрессии генов их рецепторов - TLR4 и NOD2, соответственно.

Известно, что рецепторы врожденного иммунитета TLR4 и NOD2 при взаимодействии со своими лигандами не только запускают каскад сигнальных путей для стимуляции провоспалительных ответов, но и повышают экспрессию этих рецепторов, демонстрируя положительную обратную связь. Изучение уровней экспрессии генов рецепторов TLR4 и NOD2 выявило стимулирующее действие фрагментов клеточной стенки бактерий, что согласуется с ранее полученными данными синергизма ЛПС и ГМДП [70]. Причем ЛПС и ГМДП повышали экспрессию не только собственных рецепторов, но и наблюдалось их перекрестное действие: ЛПС повышал экспрессию генов собственного рецептора *TLR4* в 9 раз ( $p < 0,05$ ) и экспрессию рецептора *NOD2* для ГМДП - в 3 раза ( $p < 0,05$ ), а ГМДП повышал экспрессию собственного рецептора *NOD2* в 5,8 раза ( $p < 0,05$ ) и экспрессию *TLR4*, отвечающего за связывание с ЛПС, - в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). Показано, что катехоламины (адреналин и норадреналин) не влияли на уровни экспрессии генов *TLR* и *NOD2* и не отменяли стимулирующее действие ЛПС и ГМДП на экспрессию генов рецепторов врожденного иммунитета.

Изучение уровней экспрессии гена регулятора воспаления *A20* показало статистически значимое влияние норадреналина: в то время как эпинефрин не влиял на экспрессию генов *A20* и *ATF3*, присутствие норадреналина в нестимулированной культуре клеток увеличивало экспрессию гена *A20*, а в условиях стимуляции клеток ЛПС и ГМДП было статистически значимое увеличение его экспрессии (рисунок 5.21).



**Рисунок 5.21 – Относительная экспрессия (RT-qPCR) генов *TLR4*, *NOD2*, *ATF3* и *A20* в нейтрофилах человека, нормализованная по *GAPDH***

*Примечание:* Данные представлены как среднее значение трех независимых измерений, \* –  $p < 0,05$  – достоверность различий в опытной пробе по сравнению с контрольной пробой; # –  $p < 0,05$  – достоверность различий в соответствующих группах

### Резюме

В результате анализа экспрессии генов регуляторных элементов на трех уровнях сигнальных путей: на уровне рецепторов (*TLR4*, *NOD2*); на уровне транскрипционных факторов (*A20*, *ATF3*) и на уровне экспрессии провоспалительного цитокина *TNF- $\alpha$*  в системе *in vivo* и *in vitro* установлено, что на начальном этапе воздействия биорегуляторов бактериального происхождения увеличивается экспрессия генов *TLR4*, *NOD2* и *TNF- $\alpha$* , способствующая усилению воспалительных реакций, тогда как гены цитозольных белков, контролирующих воспаление (*A20* и *ATF3*), продуцируются в клетках с

задержкой по времени и подавляют воспалительные реакции, вызванные ЛПС и ГМДП. При этом осуществлялось перекрестное стимулирующее влияние ББП на уровень экспрессии генов их рецепторов: ЛПС повышал экспрессию генов собственного рецептора *TLR4* в 9 раз и экспрессию рецептора *NOD2* для ГМДП в 3 раза, а ГМДП - экспрессию собственного рецептора *NOD2* в 5,8 раза и экспрессию *TLR4* для ЛПС в 4,4 раза.

Прием препарата на основе ГМДП 1 мг статистически значимо увеличивал общий пул дендритных клеток, количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови, а также вызывал усиление экспрессии на клетках маркеров их дифференцировки (*CD80*, *CD83*) и хемокинового рецептора *CCR7*, способствующего миграции дендритных клеток во вторичные лимфоидные органы, увеличивал уровень экспрессии генов *CD11b*, *XCRI*, а также *CD103*.

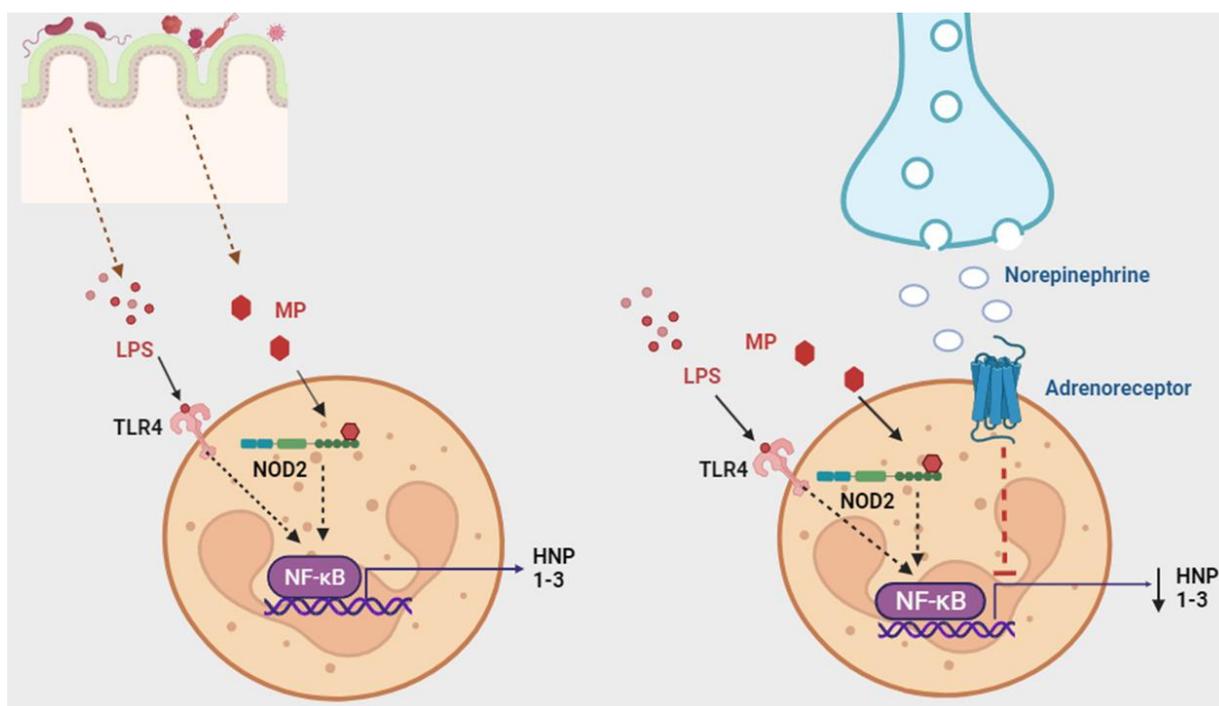
Оценка влияния глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты на экспрессию генов, ответственных за синтез цитокинов, мембранных рецепторов и адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм в НК-клетках человека в условиях *in vitro* выявила способность мурамилпептида влиять на различные этапы фосфорилирования MAPK, гидролиз фосфолипидов, экспрессию адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами, интегрируя внешние и внутренние клеточные сигналы, а также координировать динамическую активацию клеточных сигнальных путей НК-клеток путем преимущественного усиления экспрессии ряда генов функционально значимых белков.

Исследованиями установлено, что D-конфигурация изоглутамина является принципиальной для реализации регуляторной активности мурамилпептидов: глюкозаминилмурамилдипептид с L-конфигурацией изоглутамина не влиял на выработку оксида азота (NO), а также цитокинов, хемокинов и ростовых факторов.

В стимулированной липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом культуре клеток под влиянием норадреналина синтез HNP1-

3 в нейтрофилах снижался в 4,4 раза и в 3,6 раза, соответственно, что способствовало ограничению гиперпродукции альфа-дефенсинов HNP1-3 (рисунки 5.22). В то же время адреналин в системе *in vitro* не влиял на уровни альфа-дефенсинов HNP 1-3 как в нестимулированной культуре нейтрофилов, так и при стимуляции клеток липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом, тогда как под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 в нейтрофилах снижался в нестимулированной культуре в 3 раза.

Обнаруженная способность дисахарид содержащих мурамилпептидов с D-конфигурацией изоглутамина повышать продукцию мононуклеарными клетками провоспалительных и противовоспалительных цитокинов предоставляет возможность регулирования разнонаправленных процессов; липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептид и низин влияют на продукцию хемокинов, факторов роста, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, повышают выработку IL-10 в 42, 22 и 3 раза соответственно; липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептид и норадреналин в системе *ex vivo* увеличивают количество дендритных клеток, экспрессирующих CD11c на 40%, 31% и 64%, соответственно; в целом полученные результаты свидетельствует о том, что системный анализ результатов исследования иммуотропных эффектов липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида и их возможных механизмов расширяет представления об особенностях влияния биорегуляторов бактериального происхождения на иммунный гомеостаз и комменсальную микрофлору слизистых и обосновывает целесообразность использования их в разработке эффективных способов персонализированной медицины.



**Рисунок 5.22 – Изменение выработки пептидов HNP 1-3 нейтрофилами человека при воздействии глюкозаминилмурамилдипептида, липополисахарида и норадреналина**

Таким образом, полученные результаты выявили механизмы обнаруженных ранее разнонаправленных процессов, регулируемых биорегуляторами бактериального происхождения: на начальном этапе происходит активация провоспалительных реакций, на последующих этапах активизируются противовоспалительные факторы. При этом ББП изменяют фенотипические и функциональные характеристики иммунокомпетентных клеток, участвующих во врожденном и адаптивном иммунитете.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ,  
ИЗЛОЖЕННЫМ В 5 ГЛАВЕ:**

1. Guryanova, S.V. Inflammation Regulation by Bacterial Molecular Patterns / S.V. Guryanova, A. Kataeva // *Biomedicines*. – 2023. – № 11. – P. 183.
2. Guryanova, S.V. Mechanisms of regulation allergic and autoimmune reactions by bacterial origin bioregulators / S.V. Guryanova, I.A. Sigmatulin, O.O. Gigani, S.A. Lipkina // *RUDN Journal of Medicine*. – 2023. – Vol. 27. – N. 4. – P. 470–482.

3. Guryanova, S.V. Inflammatory response modulation by epinephrine and norepinephrine / S.V. Guryanova, A.S. Ferberg, I.A. Sigmatulin // RUDN Journal of Medicine. – 2023. – Vol. 27. – N. 3. – P. 329– 341.
4. Гурьянова, С.В. Динамика иммунологических и микробиологических показателей ротовой жидкости при терапии кариеса / С.В. Гурьянова, Н.В. Колесникова, Г.О. Гудима и др. // Иммунология. – 2021. – № 42(4). – С. 386–394.
5. Guryanova, S.V. Novel approaches to increase resistance to acute respiratory infections / S.V. Guryanova, N.A. Kudryashova, A.A. Kataeva, B.T. Orozbekova, N.V. Kolesnikova, A.G. Chuchalin // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2021. – Т. 25. – № 3. – С. 181—195.
6. Guryanova, S.V. Regulation of Immune Homeostasis via Muramyl Peptides-Low Molecular Weight Bioregulators of Bacterial Origin / S.V. Guryanova // Microorganisms. 2022. - № 10. - P. 1526.
8. Гурьянова, С.В. Глюкозаминилмурамилдипептид-кислота (ГМДП-А) модулирует внутриклеточные сигнальные пути натуральных киллерных клеток / С.В. Гурьянова, А.М. Гапонов, В.М. Писарев и др. // Иммунология. – 2020 – № 41(3). – С. 235–248.
9. Гурьянова, С.В. Сравнительная оценка мурамилпептидов - лигандов рецепторов врожденного иммунитета в регуляции экспрессии оксида азота / С.В. Гурьянова // Российский иммунологический журнал. 2015. – Т. 9(18). – № 4. – С. 453– 456.
10. Гурьянова, С.В. Мурамилпептиды и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в комплексной терапии аллергических заболеваний / И.Г. Козлов, С.В. Гурьянова, Н.В. Колесникова и др. // Российский аллергологический журнал. 2015. – № 5. – С. 59– 67.
11. Гурьянова, С.В. Влияние мурамилпептида на микробный состав микрофлоры ротовой полости / С.В. Гурьянова, О.Ю. Борисова, Н.В. Колесникова и др. // Иммунология. – 2019, 40 (6). – С. 34–40.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эволюционно сформировавшиеся системные взаимосвязи между микроорганизмами и макроорганизмом на уровне слизистых, органов и тканей имеют большое значение для поддержания иммунного гомеостаза и лежат в основе разработки способов профилактики и терапии социально значимых иммунозависимых заболеваний. При этом сохраняет актуальность комплексное изучение в норме и при патологиях микробиома, генома, транскриптома, метаболома, среди которых особо значимо определение механизмов влияния биорегуляторов бактериального происхождения (ББП), являющихся фрагментами клеточных стенок грамположительных и грамотрицательных бактерий, на иммунный гомеостаз. В этой связи с целью изучения роли таких ББП как мурамилпептиды (МП, ГМДП) и липополисахарид (ЛПС) в аллергическом, инфекционном и аутоиммунном воспалении были исследованы механизмы их иммуностропных эффектов на основе изучения экспрессии генов ряда регуляторных и транскрипционных факторов, а также на основе изучения их влияния на внутриклеточные сигнальные пути, фенотип и функциональную активность клеток врожденного иммунитета, в том числе с оценкой их совместного с катехоламинами влияния.

Изучение проводили на основании результатов клинических исследований эффективности мурамилпептидов в профилактике респираторных заболеваний, терапии пациентов с псориазом, изменения микробиологических и иммунологических показателей ротовой жидкости. Для объяснения полученных данных исследовались механизмы аллергического воспаления в экспериментальной модели аллергической астмы, а также изучались изменения рецепторов и молекул адгезии на поверхности иммунокомпетентных клеток, способность ББП изменять выработку цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и оксида азота - важных регуляторов иммунологических реакций.

В частности, исследование в представленной работе эффектов ГМДП и ЛПС модели OVA-индуцированной астмы у мышей *in vivo* показало наличие их двойственного характера: введение биорегуляторов бактериального происхождения перед сенсibilизацией снижает выраженность нейтрофилии и эозинофилии в БАЛ, а совместное их введение вместе с аллергеном (OVA) значительно увеличивает содержание данных клеток в БАЛ. Кроме того, инъекции ГМДП и ЛПС до сенсibilизации OVA способствовали достоверному снижению повышенных при IgE-зависимом аллергическом воспалении IgA (в БАЛ) и IgE (в сыворотке крови), а также значительное увеличение уровня IgG2a, обеспечивающего основной гуморальный иммунный ответ на антигены у мышей. Последнее позволяет предположить, что испытываемые лекарственные средства на основе биорегуляторов бактериального происхождения способны активировать рецепторы врожденного иммунитета для поддержания адекватного иммунного гомеостаза даже в отсутствии бактериальных антигенов, подавляя при этом IgE-ответ на аллерген OVA.

Впервые обнаружен двойственный эффект ББП: снижение интенсивности аллергического воспаления в случае введения ББП до сенсibilизации аллергеном, в случае же совместного введения с антигеном они в значительной степени увеличивают приток в легкие макрофагов, лимфоцитов, эозинофилов и нейтрофилов, что может усугублять течение патологического процесса. Наши исследования подтверждаются результатами китайских ученых, которые показали, что воздействие ЛПС за 14 дней до астмы может предотвратить будущие симптомы мышинной астмы, вызванной OVA, причем критическим является не только интервал введения до сенсibilизации, но и количество вводимого ЛПС [229]. Количество ЛПС имеет решающее значение в усугублении тяжести астмы, усилении антигенспецифических аллергических реакций в дыхательных путях и воспалительных проявлений у пациентов и в экспериментальных моделях на животных с аллергической астмой [178, 246].

Полученные в данной работе результаты расширяют представления о клиническом течении воспалительного процесса при астме, при этом

лекарственные средства на основе ББП могут иметь позитивное влияние на маркеры воспаления в период ремиссии за счет уменьшения в легких бокаловидных клеток, лимфоцитоза, эозинофилии и нейтрофилии в бронхоальвеолярном лаваже, а также IgE в крови, что обнаружено в данном исследовании. Однако в стадии аллергического воспаления, как показано в настоящем исследовании, ЛПС и мурамилпептиды могут усугубить тяжесть аллергического воспаления за счет притока в легкие макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов и эозинофилов.

Проведена оценка профилактической и клинико-иммунологической эффективности ГМДП при инфекционном процессе проведена в исследованиях *in vivo*, *ex vivo* и *in vitro* в группах условно здоровых добровольцев и у пациентов с вирусной и бактериальной инфекцией. В представленном исследовании при профилактике острых респираторных инфекций в неблагоприятный эпидемиологический период показано, что применение препарата ГМДП (ликопид 1мг) по 1 таблетке 3 раза в день в течение 10 дней способствовало снижению количества эпизодов ОРВИ в 3,7 раза, а среди 48,4 % добровольцев, контактировавших с больными COVID-19, лишь у 2 человек (1,6 %) в анамнезе был подтвержденный COVID-19 легкого течения, тогда как группе сравнения этот показатель в 6 раз выше — 9,8 % (14 человек, 4-м из которых потребовалась медицинская помощь и лечение в стационаре).

Наряду с этим обнаружены позитивные иммуотропные эффекты препарата ГМДП в составе комплексной терапии условно здоровых субъектов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей жевательных зубов в виде нормализации содержания в ротовой жидкости антимикробных альфа-дефенсинов (HNP1-3), локального содержания sIgA, а также позитивное изменение состава микрофлоры с приближением микробиоценоза к нормоценозу у всех обследуемых. Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) играет основную роль в профилактике кариеса зубов путем непосредственного связывания с бактериями [402], однако его повышенное содержание, наблюдающееся при стрессе, а также при остром инфекционном процессе в ротовой жидкости при кариесе [560, 612],

может способствовать колонизации путем адгезии бактерий к слизи, выстилающей эпителий, и образованием каркаса из sIgA для биопленок [294, 330, 571]. Изменение содержания sIgA и HNP1-3 в ротовой жидкости до нормальных значений, обнаруженное в настоящем исследовании, свидетельствует об уменьшении напряженности местного неспецифического иммунитета.

Исследования роли ГМДП при аутоиммунном воспалении проведено с использованием периферической крови 86 пациентов с преимущественно псориазом средней степени тяжести, которые в период ремиссии применяли препарат на основе ГМДП. Установлено, что монотерапия препаратом на основе ГМДП привела к клиническому улучшению у 98,2% пациентов, из которых у 24,4% имело место отсутствие клинических проявлений псориаза в течение четырех лет наблюдения.

Позитивные клинические эффекты ГМДП могут быть обусловлены его иммунологической эффективностью в виде нивелирования дисбаланса патогенетически значимых цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), снижения количества клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы (растворимых молекул межклеточной адгезии-1 (sICAM-1)) и фактора торможения миграции макрофагов (MIF), что существенно ограничивало поступление макрофагов и нейтрофилов в псориазные очаги воспаления и пролиферации, а также стимуляцию секреции провоспалительных TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Псориаз является одним из самых распространенных аутоиммунных заболеваний кожи [380], при котором имеют место генетический контроль, метаболические нарушения и дисбаланс иммунной системы [222, 416].

Предполагается, что дисфункция иммунного гомеостаза у больных псориазом во многом обусловлена неспособностью иммунокомпетентных клеток адекватно реагировать на сигналы, поступающие в ходе иммунного ответа, в связи с чем возникает необходимость использования иммуносупрессантов (метотрексат, циклоспорин, псорален, биологически активные препараты). Однако такая терапия часто сопровождается нежелательными побочными эффектами, приводящими к более тяжелым клиническим рецидивам, что

существенно ограничивает область их применения [605]. Применение ГМДП на этапе ремиссии способствовало увеличению концентрации цитокинов IL-10, IL-12 и уменьшению IL-4, TNF- $\alpha$ , количества CD54+ клеток в сыворотке крови, а также уменьшению концентрации растворимых молекул межклеточной адгезии-1, фактора торможения миграции макрофагов и оксида азота. Обнаруженная в данном исследовании возможность ГМДП на этапе ремиссии корректировать дисбаланс иммунной системы на уровне цитокинов, молекул адгезии и клеток, экспрессирующих молекулы адгезии, раскрывает механизм действия мурамилпептида на миграцию иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления и объясняет позитивное действие ГМДП при псориазе, обнаруженное D. Williamson и коллегами [679].

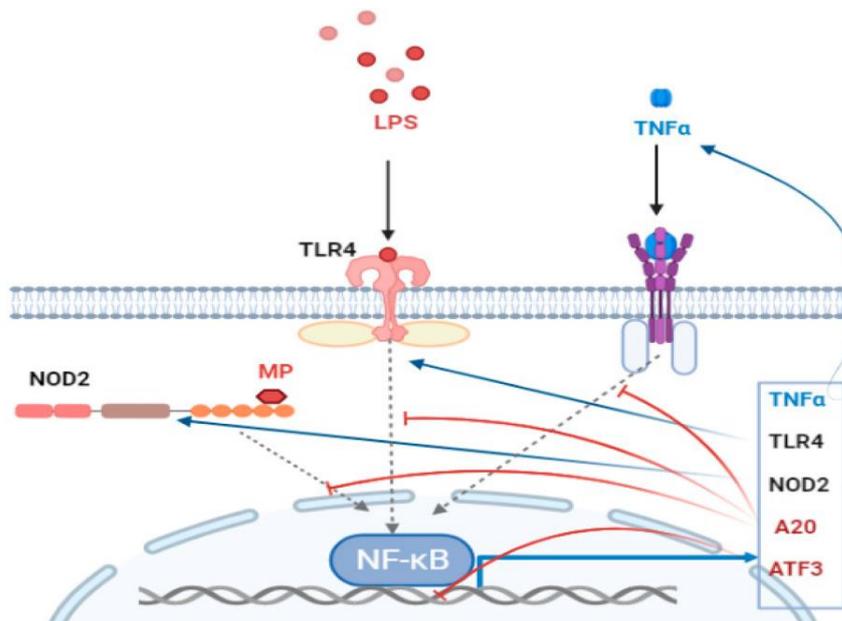
Известная сегодня роль микробного разнообразия, относительного обилия определенных бактериальных штаммов в развитии и становлении локального, системного иммунитета, а также в патогенезе заболеваний различного генеза, а также позитивное иммуностропное действие постбиотиков, к которым относятся нежизнеспособные клетки, клеточные фракции и продукты ферментации пробиотических клеток [299], обусловили интерес к исследованию микробного пейзажа полости рта в норме и при инфекционном процессе (у пациентов с кариесом). Микробиологическое исследование ротовой жидкости (РЖ) проводили у 48 здоровых добровольцев до и через 4 дня после 10-дневного курса ликолипид 1 мг а также у 43 пациентов с кариесом окклюзионных и контактных поверхностей боковых зубов, среди которых 21 пациент принимал сублингвально препарат ГМДП в течение 10 дней после базового лечения заболевания. Согласно результатам, представленным в настоящем исследовании, изменение микробного пейзажа ротовой жидкости было выявлено у 30 (62,5%;  $p < 0,05$ ), здоровых добровольцев, получавших препарат на основе ГМДП. По составу микробиоценоз обследуемых был максимально приближен к нормоценозу, что подтверждалось полным отсутствием *Candida albicans* с замещением грибковой флоры на лакто- и бифидобактериальную, двукратным снижением бактерий *Clostridium spp.* и преобладанием в микробиоте *Firmicutes spp.* Наши данные согласуются с

результатами других исследований, согласно которым в ротовой жидкости здоровых взрослых преобладающие таксоны принадлежали к *Firmicutes* (род *Streptococcus*; семейство *Veillonellaceae*, род *Granulicatella*), *Proteobacteria* (рода *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (рода *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), *Bacteroidetes*, что дало основание E. Zauga с коллегами выдвинуть концепцию «основного микробиоценоза» в состоянии здоровья [209]. Под действием ГМДП в настоящем исследовании достоверно уменьшилась обсемененность ротовой полости *Porphyromonas gingivalis*, присутствие которых часто регистрируется при заболеваниях пародонта [218], верхних отделов желудочно-кишечного тракта, дыхательных путей, толстой кишки, при болезни Альцгеймера и ревматоидном артрите [520]. В работе С. Ye и коллег представлены данные, что *P. gingivalis* может поражать плаценту, таким образом, наличие флоттирующей *P. gingivalis* может представлять опасность не только для здоровья пациента, но и плода [631].

В группе пациентов с кариесом, получавших препарат ГМДП у всех обследуемых (100%;  $p < 0,05$ ) имело место изменение состава микрофлоры в виде преобладания *Firmicutes spp*, двукратного увеличения встречаемости *Lactobacterium spp*, уменьшения встречаемости *Clostridium spp* (более чем в 2 раза;  $p < 0,05$ ), *P. gingivalis* (в 8 раз;  $p < 0,05$ ) и *St. epidermidis*, а разнообразие микрофлоры у 85,7% ( $p < 0,05$ ) пациентов повысилось за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*. Использование препарата на основе ГМДП также способствовало достоверному уменьшению содержания в ротовой жидкости *St. epidermidis*, обнаруживаемого при акне, экземах, аллергических заболеваниях [588]. Наблюдаемые под действием ГМДП изменения могут быть обусловлены воздействием препарата на местный и системный иммунитет, а также воздействием на представителей микробного сообщества, и объясняют эффективность ГМДП при применении в стоматологии, наблюдаемую другими исследователями [44, 48, 57].

В рамках изучения механизмов иммунотропных эффектов биорегуляторов бактериального происхождения показано их влияние на продукцию цитокинов,

хемокинов, ростотвых факторов, а также на экспрессию генов регуляторных факторов на трех уровнях сигнальных путей (рецепторов TLR4, NOD2); транскрипционных факторов A20, ATF3; провоспалительного цитокина TNF- $\alpha$  в системе *in vivo* и *in vitro* (рисунок 5.23).



**Рисунок 5.23 – Положительная и отрицательная обратная связь при воспалении, индуцированном липополисахаридом и мурамилпептидом, обнаруженные в эксперименте**

*Примечание:* Синие стрелки — активация воспаления — на начальном этапе воздействия ЛПС и ГМДП увеличивается экспрессия *TNF- $\alpha$* , *TLR4* и *NOD2*, способствующая появлению петли положительной обратной связи; красные линии — подавление воспаления — гены цитозольных белков, контролирующих воспаление *A20* и *ATF3*, экспрессируются в клетках с задержкой по времени; LPS –липополисахарид; MP - мурамилпептид.

Стимулирующее влияние ГМДП и ЛПС на выработку провоспалительных цитокинов хорошо известно, однако механизм, объясняющий роль этих БП в ограничении воспаления, до конца не изучен.

Важно отметить, что в представленном исследовании получены новые данные о динамических БП-индуцированных изменениях в активации сигнальных путей, ответственных за ограничение воспалительных реакций: на начальном этапе воздействия БП увеличивается экспрессия генов *TLR4*, *NOD2* и *TNF- $\alpha$* , способствующая появлению петли положительной обратной связи и

усилению воспалительных реакций, тогда как гены цитозольных белков, контролирующих воспаление (*A20* и *ATF3*), продуцируются в клетках с задержкой по времени, и их продукты подавляют воспалительные реакции, вызванные ЛПС и ГМДП.

Негативная регуляция воспаления дает новое представление о том, как воспалительные сигналы контролируются и физиологически ограничиваются, раскрывает новые возможности эффективной терапии и профилактики.

Наряду с этим оценка влияния ГМДП-ОН на экспрессию генов мембранных рецепторов, цитокинов, адаптерных белков, регулирующих клеточный метаболизм в НК-клетках доноров в условиях *in vitro* выявила способность мурамилпептида влиять на различные этапы фосфорилирования MAPK, гидролиз фосфолипидов, экспрессию адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами, интегрируя внешние и внутренние клеточные сигналы, а также координировать динамическую активацию клеточных сигнальных путей НК-клеток путем преимущественного усиления экспрессии ряда генов функционально значимых белков. Получены данные о высокодифференцированной модуляции ГМДП-ОН экспрессии генов сигнального пути MAPK, интерферонов и их рецепторов, а также  $C\beta$ - и  $C\gamma$ -фосфолипазы (PLCG1 и PLCG2), что определяет возможности мурамилпептида воздействовать на сигнальных механизмы, контролирующие цитотоксические реакции НК-клеток. Кроме того, позитивное влияние ГМДП-А на транскрипцию генов STAT соответствует выявленному ранее усилению потенциала выживаемости и активности НК-клеток, имеющего первостепенное значение в период развития патологических процессов [12].

Учитывая тот факт, что оксид азота оказывает влияние на иммунную систему и воспалительный ответ, угнетая апоптоз и активируя хемотаксис эозинофилов и нейтрофилов [480], интерес представляют полученные нами данные о том, что ГМДП является эффективным индуктором оксида азота, однако для проявления эффекторной активности необходима L-D-конфигурация мурамилпептидов также необходима для индукции хемокинов, цитокинов и

ростовых факторов. L-D мурамилпептиды (ГМДП, ГМДП-ОН и ГМДП-Lys) увеличивали продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов, указывая на возможность регулирования разнонаправленных процессов в зависимости от контекста и микроокружения

Исследование влияния ГМДП в системе *in vivo* на фенотипические изменения дендритных клеток (ДК) человека позволило установить, что профилактический прием препарата ликопид 1 мг статистически значимо увеличивал общий пул ДК и в его составе - уровень миелоидных (МДК) и плазмцитойдных ДК (ПДК). Известно, что соотношение МДК и ПДК у здоровых людей составляет 1,5-2 [249]. Отклонение соотношения МДК и ПДК от уровня здоровых лиц свидетельствует о хронических воспалениях, аутоиммунных и онкологических процессах и может быть причиной невынашиваемости беременности [326, 465, 562]. В нашем исследовании сохранение соотношения ПДК и МДК на прежнем уровне при воздействии ГМДП свидетельствует об отсутствии хронических и аутоиммунных заболеваний у участников исследования.

Количество ДК и оптимальное соотношение их субпопуляций является необходимым условием для поддержания иммунного гомеостаза, но большое значение также имеет и степень их зрелости. При различных патологиях выявлены дефекты на стадии дифференцировки дендритных клеток. Например, при ревматоидном артрите и псориатическом артрите показано отсутствие зрелых ДК [249, 601]. Основными маркерами, определяющими зрелость дендритных клеток, являются CD80, CD83 и CCR7, обеспечивающие миграцию дендритных клеток в лимфатические узлы и взаимодействие с Т-клетками. В работе показано, что ГМДП увеличивает экспрессию маркеров дифференцировки на миелоидных ДК CD80 в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ), CD 83 в 3,1 раза ( $p < 0,05$ ) и CCR7 в 3,3 раза ( $p < 0,05$ ); на плазмцитойдных ДК – CCR7 – в 1,9 раза ( $p < 0,05$ ).

В настоящем исследовании при сравнении процента дендритных клеток, экспрессирующих маркер CCR7 (CD197), до и после приема ГМДП установлено достоверное увеличение МДК и ПДК с рецептором CCR7 по сравнению с

исходным значением. CCR7 является рецептором  $\beta$ -хемокинов CCL19 и CCL21, он обеспечивает миграцию ДК в афферентные лимфатические сосуды, хоуминг Т-клеток во вторичные лимфоидные органы, а также координирует перемещение В-клеток в фолликулах лимфатических узлов на границу В- и Т-клеточной области для взаимодействия с Th [126, 165, 613]. В наружных эндотелиальных венулах экспрессируется CCL21, взаимодействуя с которым, CCR7 направляет иммунные клетки во вторичные лимфоидные органы. Кроме того, конститутивно экспрессируемые CCR7, обеспечивают аутоотолерантность [495], а также толерантность к безвредным антигенам, в том числе к пищевым и ингаляционным [126, 165,].

В представленном исследовании обнаружено, что МДК, экспрессирующие CCR7, имели более существенное увеличение при воздействии ГМДП, чем ПДК (в 3,3 и 1,9 раза соответственно). Необходимо отметить, что МДК представляют гетерогенную популяцию ДК, которую разделяют на субпопуляции ДК1 и ДК2, отличающиеся фенотипически и функционально. Известно, что в норме в периферической крови ДК1 и ДК2 представлены в незначительных количествах: 0,3-0,8% ДК1 и 0,02-0,06% ДК2, в отличие от других типов клеток, например, ПДК и клеток Лангерганса [681]. В связи с этим изменение экспрессии генов активационных маркеров под действием ГМДП для этих субпопуляций исследовали методом ПЦР. Для этих целей были отобраны гены *XCR1*, *CD11b* и *CD103*. Выбор данных генов обусловлен тем, что инфекции бактериальной и вирусной этиологии индуцируют появление на мембране рецепторов хемокинов (CCR7, XCR1), рецептора к компоненту комплемента (CD11b) и рецептор к Е-кадгерину - Integrin Subunit Alpha E (CD103). Экспрессия рецепторов XCR1, CD11b и CD103 свидетельствует об активации клеток, способствует их миграции в фолликулы лимфатических узлов с последующим движением в зону воспаления барьерных тканей и свидетельствует о реализации иммунного ответа.

XCR1 - хемокиновый рецептор, который принимает участие в кооперативном взаимодействии Т-клеток и ДК при ответе на антиген в барьерных тканях. При исследовании уровень транскрипции гена XCR1 повышался после

применения ГМДП в 2,1 раза. Известно, что дендритным клеткам, экспрессирующим XCR1 рецептор, отводится основная роль в поддержании иммунного гомеостаза слизистых кишечника [193] и слизистых верхних дыхательных путей [390]. Наличие XCR1 на ДК обеспечивает формирование Т-клеток памяти и, как следствие, быстрый иммунный ответ при вторичном инфицировании вирусными и паразитарными инфекциями [193, 687]. Кроме того, экспрессия XCR1 на ДК также необходима для созревания регуляторных Т-клеток, для поддержания аутоотолерантности и купирования воспаления [97]. Обнаруженная в настоящем исследовании способность ГМДП повышать экспрессию XCR1 демонстрирует возможность ГМДП контролировать излишнее воспаление в мукозальных тканях.

CD103 - ITGAE (субъединица интегрина альфа Е) является рецептором Е-кадгерина и опосредует адгезию к эпителиальным клеткам. Обнаруженная в данном исследовании способность ГМДП повышать экспрессию CD103 объясняет положительные клинические эффекты ГМДП в пульмонологии [26, 56, 63]. Наши результаты согласуются с исследованиями D. Prescott и коллег, которые показали, что моносахаридсодержащий мурамилдипептид МДП активируют толерогенные CD103+ дендритные клетки и обеспечивают толерантность к комменсальной микрофлоре, поддерживая иммунный гомеостаз [488].

Таким образом, дендритные клетки представляют гетерогенную популяцию клеток с высоким уровнем пластичности. Появление разнообразных маркеров на их поверхности при активации регулируется воспалительными стимулами, в том числе мурамилпептидами, и, что важно, посредством увеличения CD80, CD83 и CCR7, обеспечивающих миграцию ДК в лимфатические узлы и взаимодействие их с Т-клетками, запускает механизмы обратной связи появлением субпопуляций толерогенных иммунокомпетентных клеток, останавливающих и завершающих процесс воспаления. Исследование влияния ГМДП на экспрессию фенотипических маркеров ДК CD80, CD83 и CCR7, а также увеличение экспрессии генов *CD11b* и *CD103*, продукты которых обеспечивают

толерогенность к пищевым, ингаляционным и аутоантигенам, может дополнить наше понимание механизмов реализации иммунного ответа при активации рецепторов врожденного иммунитета, проявляющихся не только в инициации воспалительных стимулов, но и в их купировании, предотвращая излишнее воспаление, наблюдаемом в эксперименте и клинической практике [524, 387].

Между тем исследование эффектов биорегуляторов бактериального происхождения (ГМДП, ЛПС и низина) совместно с катехоламинами (адреналином и норадреналином) на экспрессию фенотипических маркеров дендритных клеток в системе *ex vivo* позволило установить, что внесение в образец периферической крови ЛПС, ГМДП и норадреналина способствовало увеличению количества CD11c+ДК на 40%, 31% и 64%, соответственно, тогда как совместное введение ГМДП и норадреналина снижало количество CD11c+ДК относительно таковых при введении только норадреналина. При этом бактериоцин низин не оказывал влияния на экспрессию CD11c на дендритных клетках.

Исходя из того, что эндогенные катехоламины (адреналин и норадреналин) посредством адренорецепторов способны влиять на функциональную активность нейтрофилов [357], интерес представляла оценка влияния ББП в присутствии адреналина и норадреналина на продукцию HNP1-3 нейтрофилами и уровни экспрессии генов рецепторов для ЛПС и ГМДП (*TLR4* и *NOD2*) в системе *in vitro*. Проведенными исследованиями впервые обнаружено, что адреналин не снижает уровни HNP 1-3 как в не стимулированной культуре, так и при стимуляции клеток ЛПС и ГМДП, тогда как под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 был снижен в 3 раза в не стимулированной культуре, в стимулированной ЛПС культуре клеток отмечалось снижение в 4,4 раза, а при стимуляции ГМДП - в 3,6 раза. Это наблюдение весьма важно, поскольку чрезмерная продукция HNP1-3 может иметь патогенетическое значение при инфекционных, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваниях. Кроме того, обнаружено стимулирующее влияние ЛПС и ГМДП на уровень экспрессии генов TLR4- и NOD2-рецепторов, причем не только собственных: ЛПС повышал экспрессию генов собственного TLR4 (в 9

раз) и экспрессию рецептора NOD2 для ГМДП (в 3 раза), а ГМДП повышал экспрессию собственного рецептора NOD2 (в 5,8 раза) и экспрессию TLR4, отвечающего за связывание с ЛПС, - в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). При этом катехоламины не влияли на уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета TLR и NOD2 и не отменяли стимулирующие эффекты ББП на данные показатели. Изучение уровней экспрессии регулятора воспаления A20 показало статистически значимое влияние норадреналина: в то время как эpineфрин не влиял на экспрессию генов A20 и ATF3, присутствие норадреналина в нестимулированной культуре клеток увеличивало экспрессию гена A20, а в условиях стимуляции клеток ЛПС и ГМДП было статистически значимое увеличение его экспрессии.

Анализ полученных результатов в целом позволяет заключить, что биорегуляторы бактериального происхождения ЛПС и ГМДП могут играть позитивную модулирующую роль при развитии аллергического, инфекционного и аутоиммунного воспаления благодаря их способности влиять на фенотипические и функциональные характеристики клеток врожденного иммунитета, на экспрессию генов их рецепторов (TLR4, NOD2), транскрипционных факторов (A20, ATF3) и провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ ), а также на состав и разнообразие микробиологического сообщества слизистых.

Полученные данные дополняют современные представления о молекулярных механизмах действия биорегуляторов бактериального происхождения и обосновывают возможность и целесообразность их применения для разработки новых стратегий организации медицинской помощи с целью оптимизации иммунного гомеостаза организма. Понимание способов регуляции воспалительных процессов дает возможность вычленять необходимых участников с целью идентификации возможных нарушений на уровне генома, эпигенетической регуляции, метаболических процессов для объяснения конкретных персонализированных особенностей.

Интерес к механизмам регуляции иммунитета в норме и при патологических состояниях неуклонно возрастает. Скоординированность множества разнонаправленных процессов имеет решающее значение для

поддержания гомеостаза. Для точного учета результатов исследований и визуализации применяются подходы системной биологии, основанные на составлении причинно-следственных связей с учетом типа клеток, регистрация молекул на уровне транскриптома, протеома и метаболома. Сформированы machine-readable языки и различные способы построения сетей взаимовлияний, которые служат основой для создания лекарственных средств и разработки эффективных способов терапии и профилактики.

Биорегуляторы бактериального происхождения воздействуют не только на иммунокомпетентные клетки макроорганизма, они влияют практически на все клетки и ткани, участвуя в активации и дифференцировке клеток, изменении их фенотипа, способствуя миграции и стимулируя гемопоэз, регулируя таким образом иммунный гомеостаз. Они сигнализируют о наличии бактерий и запускают не только провоспалительные процессы, необходимые для элиминации инфекции, но противовоспалительные, необходимые для купирования воспалительных процессов и поддержания толерантности к микрофлоре. Фрагменты пептидогликана бактерий оказывают влияние на представителей микробиологического сообщества, населяющих кожные покровы и слизистые, влияют на их жизненный цикл и антагонистические отношения. Широкий спектр биорегуляторов бактериального происхождения, источником которых являются микроорганизмы, регулируют гомеостаз хозяина и запускают иммунные реакции, которые, в зависимости от контекста, могут иметь противоположные эффекты.

## ВЫВОДЫ

1. Применение липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в модели аллергической OVA-индуцированной астмы у мышей перед сенсibilизацией приводит к снижению выраженности нейтрофилии, эозинофилии, лейкоцитоза и повышенного при аллергическом воспалении sIgA в бронхоальвеолярном лаваже в 2,1 раза и 2,6 раза соответственно, IgE в сыворотке крови - в 2,0 раза и 2,2 раза соответственно, а также увеличивают IgG2a на 60% и 110% соответственно; в случае совместного их введения с аллергеном (OVA) в бронхоальвеолярном лаваже значительно увеличивается содержание нейтрофилов, эозинофилов, лейкоцитов.

2. Применение глюкозаминилмурамилдипептида у молодых людей в возрасте 20-22 года в неблагоприятный эпидемиологический период снижает число эпизодов ОРВИ (в 3,7 раза), а также эпизодов COVID -19 (в 6 раз).

3. Применение глюкозаминилмурамилдипептида изменяет микробный пейзаж ротовой жидкости у 62,5% здоровых добровольцев и у всех пациентов с кариесом боковых поверхностей зубов, при этом увеличивается встречаемость *Lactobacterium spp*, уменьшается встречаемость *Clostridium spp* (более чем в 2 раза), *P. gingivalis* (в 8 раз), а также повышается разнообразие микрофлоры у 85,7 % пациентов за счет *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacterium*, *Veillonella*.

4. Применение глюкозаминилмурамилдипептида приводит к клиническому улучшению у 98,2% пациентов с псориазом, корректирует дисбаланс патогенетически значимых цитокинов (IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ ), снижает количество клеток, экспрессирующих CD54-рецепторы, плазменную концентрацию растворимых молекул межклеточной адгезии-1 и фактора торможения миграции макрофагов.

5. При внутрибрюшинной инъекции липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в мононуклеарных клетках мышей на

начальном этапе воздействия увеличивается экспрессия генов TLR4 в 9,5 и 6,9 раз соответственно, NOD2 рецепторов - в 4,2 и 9 раз соответственно, TNF- $\alpha$  - в 22 раза и 8,1 раз соответственно; на более поздних этапах воздействия увеличивается экспрессия транскрипционных факторов A20, ATF3.

6. При воздействии липополисахарида и глюкозаминилмурамилдипептида в мононуклеарных клетках человека увеличивается экспрессия генов TLR4 в 9 раз и 6,1 раз соответственно, NOD2 - в 3 и 10,9 раз соответственно, TNF- $\alpha$  - в 22 и 12 раз соответственно, что способствует усилению воспалительных реакций, тогда как гены цитозольных белков, контролирующих воспаление A20 и ATF3, экспрессируются в клетках с задержкой по времени.

7. Использование глюкозаминилмурамилдипептид-кислоты в условиях *in vitro* изменяет экспрессию генов в НК-клетках, участвующих в фосфорилировании MAPK, гидролизе фосфолипидов, генов адаптерных белков и рецепторов, ответственных за связывание с иммуноглобулинами и цитокинами (PLCB1, FCGR3A, PIK3R3, IFNA1, IFNA6, IFNAR1, MAPK8IP1, MAPK2K7, MAP4K2, MAP3K6, MAPKAPK5, TNFRSF9, TNFRSF14 и TNFSF18).

8. D-конфигурация изоглутамина является принципиальной для реализации регуляторной активности мурамилпептидов: в мононуклеарных клетках человека, глюкозаминилмурамилдипептид с L-конфигурацией изоглутамина не влияет на выработку оксида азота (NO), а также цитокинов IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12P40, IL-12P70, IL-15, MDC, sCD40L, IFN $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GM-CSF.

9. В стимулированной липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом культуре нейтрофильных гранулоцитов человека под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 в нейтрофилах снижается 4,4 раза и в 3,6 раза, соответственно, что способствует ограничению патогенетически значимой гиперпродукции альфа-дефенсинов HNP1-3; при этом адреналин в системе *in vitro* не влияет на уровни альфа-дефенсинов HNP 1-3 как в не стимулированной культуре нейтрофилов, так и при стимуляции клеток

липополисахаридом и глюкозаминилмурамилдипептидом, тогда как под влиянием норадреналина синтез HNP1-3 в нейтрофилах снижается в нестимулированной культуре в 3 раза.

10. Применение глюкозаминилмурамилдипептида *in vivo* статистически значимо увеличивает относительные значения дендритных клеток, количество миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток в периферической крови человека, а также вызывает усиление экспрессии на клетках маркеров их дифференцировки: на миелоидных ДК CD80 в 2,4 раза CD 83 в 3,1 раза и хемокинового рецептора CCR7, способствующего миграции дендритных клеток во вторичные лимфоидные органы, в 3,3 раза на миелоидных ДК и в 1,9 раза на плазмоцитоидных ДК, увеличивает уровень экспрессии генов CD11b на 128%, XCR1 на 82%, также CD103 на 95%.

11. Использование липополисахарида, глюкозаминилмурамилдипептида и низина в системе *ex vivo* способствует повышению выработки в мононуклеарных клетках человека IL-10 в 42, 22 и 3 раза соответственно; увеличению количества в цельной крови дендритных клеток, экспрессирующих CD11c, на 40%, 31% и 64%, соответственно, что указывает на возможность биорегуляторов бактериального происхождения регулировать механизмы разнонаправленных процессов.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Биорегуляторы бактериального происхождения – липополисахарид, глюкозаминилмурамилдипептиды и бактериоцин низин – рекомендуются к использованию в качестве перспективных средств для разработки новых способов фармакологической терапии иммуноопосредованных патологий при персональном контроле факторов, усиливающих воспалительный процесс, и факторов, участвующих в реализации отрицательной обратной связи.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АМП – антимикробные пептиды
- АФК – активные формы кислорода
- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- ББП – биорегуляторы бактериального происхождения
- ГКГС – главный комплекс гистосовместимости
- ГКСФ – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
- ГМДП – глюкозаминилмурамилдипептид
- ДК – дендритные клетки
- ИФА – иммуноферментный анализ
- КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты
- ЛПС – липополисахарид
- МДК – миелоидные дендритные клетки
- МДП – мурамилдипептид
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- МП – мурамилпептиды
- ПДК – плазмоцитоидные дендритные клетки
- РЖ – ротовая жидкость
- A20 – альфа белок 3, индуцированный фактором некроза опухоли (TNFAIP3)
- ATF3 – активирующий фактор транскрипции 3
- CCL – хемокиновый лиганд (Chemokine (C-C motif) ligand)
- CLR – рецепторы лектина С-типа (C-type lectin receptor)
- DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с опасностью (danger associated molecular patterns)
- GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
- HNP – пептиды нейтрофилов человека (human neutrophil peptides)

ICAM-1 – молекула клеточной адгезии (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1, также CD54)

IFN- $\gamma$  – интерферон гамма (interferon gamma)

IL – интерлейкин (interleukin)

iNOS – inducible nitric oxide synthase (индуцибельная NO-синтаза)

LRR – богатый лейцином повторяющийся домен (leucine-rich repeat domain)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (mitogen-activated protein kinase)

MIP – воспалительные белки макрофагов (macrophage inflammation proteins)

MMP – матриксная металлопротеиназа (matrix metalloproteinase)

NETs – нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil extracellular traps)

NF- $\kappa$ B – транскрипционный ядерный фактор  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NK – естественные киллеры (natural killer)

NO – оксида азота

NOD – нуклеотидсвязывающий домен олигомеризации (nucleotide-binding oligomerization domain)

OVA – овальбумин (ovalbumin)

PAMP – молекулярные паттерны, связанные с патогенами (pathogens associated molecular patterns)

PRR – паттерн-распознающие рецепторы (pattern recognition receptor)

RIG – внутриклеточный рецептор, распознающий вирусную НК, (ген-I, индуцируемый ретиноевой кислотой, retinoic acid-induced gene I)

RLR – RIG-I-подобные рецепторы (RIG-I-like receptors)

SAMP – стресс-ассоциированный молекулярный паттерн (stress-associated molecular pattern)

S1P – сфингозин-1-фосфат (sphingosine-1-phosphate)

TGF – трансформирующий фактор роста (transforming growth factor)

TGF- $\alpha$  - трансформирующий фактор роста  $\alpha$  (transforming growth factor alfa)

TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста бета (transforming growth factor beta)

Th – Т-хелпер (T-helper)

TLR – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors)

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha)

Treg – регуляторные Т-лимфоциты (regulatory T cells)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor)

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Андриянова, И.Е. Влияние иммуномодулятора глюкозаминилмурамилдипептида на кроветворение мышей с экспериментальной цитопенией / И.Е. Андриянова, Г.И. Филимонова, Т.М. Андропова // Радиобиология. – 1992. – Т. 32, № 4. – С. 566–570.
2. Андропова, Т.М. О структуре противоопухолевого гликопептида из клеточной стенки *Lactobacillus bulgaricus* / Т.М. Андропова, Л.И. Ростовцева, Е.П. Добрушкина // Биоорганическая химия. – 1980. – Т. 6, № 12. – С. 1830–1840.
3. Андропова, Т.М. Экспериментальное изучение иммуномодулирующего действия глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП). Влияние ГМДП на гуморальный иммунный ответ / Т.М. Андропова // Иммунология. – 1988. – № 6. – С. 34–37.
4. Бакиров, А.Б. Иммунокорегурующее действие тималина, продигозана и их комбинаций при хроническом лимфолейкозе / А.Б. Бакиров, В.И. Никуличева // International Journal on Immunorehabilitation. – 1995. – № 1. – С. 89.
5. Бактериальные лизаты в педиатрии / Т.П. Маркова, Л.Г. Ярилина, Д.Г. Чувиров и др. // Педиатрия. – 2016. – Т. 95, № 5. – С. 91–98.
6. Баранова, И. Д. Клинико–иммунологическая эффективность применения иммуномодуляторов в лечении больных фурункулёзом / И.Д. Баранова, В.Ф. Молотинов, А.В. Симонова // Иммунология. – 1998. – № 4. – С. 63–64.
7. Баранова, Н.И. Клинические и иммунологические показатели лечебной эффективности различных видов иммунотерапии у больных аллергическими заболеваниями дыхательных путей с бактериальной сенсибилизацией / Н.И. Баранова, Б.А. Молотиллов, Е.М. Костина, // Российский Аллергологический Журнал. – 2007. –Т. 4. – №3. – С. 30-34. doi: 10.36691/RJA73.

8. Бойко И.Н. Эффективность тималина и продигозана в комплексном лечении больных дизентерией / И.Н.Бойко, В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов // Военно-медицинский журнал – 1985. – №7 – С.45–46
9. Бударков, В. А. Оценка лечебной эффективности продигозана в опытах на облученных овцах / В.А. Бударков, Н.В. Грехова, Г.В. Козьмин // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2018. – Т. 58, № 4. – С. 363–372.
10. Вербицкий, А.А. Изучение влияния иммуностимуляторов на устойчивость белых мышей к возбудителю колибактериоза / А.А. Вербицкий, А.В. Зайцева // Ветеринарная медицина Беларуси.– 2007. – № 1. – С. 23–26.
11. Влияние иммуотропной терапии на уровень  $\alpha$ - дефенсинов у больных пиодермией / Е.А. Цывкина, Е.С. Феденко, А.С. Будихина, и др. // Российский аллергологический журнал. – 2010. – № 6. – С. 22–26.
12. Влияние производного мурамилдипептида (ГМДП-А) на линии опухолевых клеток, экспрессирующих NOD-2 \ А.М. Гапонов, Е.В. Якушенко, А.В. Тутельян, и др. // Российский иммунологический журнал. – 2018. – Т. 21, № 2. – С. 128–140.
13. Выживаемость больных раком молочной железы при комплексном лечении с использованием природного иммуномодулятора из *Lactobacillus Delbrueckii* / В.И. Тарутинов, В.С. Мосиенко, И.В. Касьяненко, и др. // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2001. – Т. 10, № 2. – С. 51–56.
14. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует Th1/Th2 баланс при atopической бронхиальной астме / С.В. Гурьянова, И.Г. Козлов, Е.А. Мещерякова и др. // Иммунология. – 2009. Т. – 30. – № 5. – С. 305–308.
15. Горшенин, А.В. Из истории исследования З.В. Ермольевой действия иммуностимулирующего препарата продигозана в оториноларингологии / А.В. Горшенин // Международный журнал гуманитарных и естественных наук. – 2021. – Т. 56, № 5–1. – С. 126–128.
16. Гудель, У.Е. Высвобождение пептидов клеточной стенки в культуральную среду экспоненциально растущей *Escherichia coli* / У.Е. Гудель, У. Шварц // Журнал Бактериол. – 1985.– Т. 162 . – С. 391–397.

17. Гуленко, О.В. Особенности физико/биохимических свойств ротовой жидкости у детей с кариесом зубов на фоне психоневрологических расстройств / О.В. Гуленко, С.Б. Хагурова, И.М. Быков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2017. – Т. 21, № 3. – С. 329–338.

18. Гурьянова, С.В. Использование N–ацетилглюкозаминил–N–ацетилмурамил–L–аланил–D–изоглутамина в качестве адьюванта в иммунизации *in vitro* с целью получения моноклональных антител к пептиду IL–1  $\beta$  (163–171) / С.В. Гурьянова, Т.М. Андропова, Н.Г. Сафонова // Биотехнология. – 1991. – № 6. – С.23–25.

19. Должко, Д.В. Пиротерапия: патогенетическое обоснование использования липополисахаридов в медицине / Д.В. Должко // Международный студенческий научный вестник. – 2016. – № 4–3. – С. 411.

20. Дранник, Г.И. Клинико–иммунологическая эффективность использования бластена у больных с бронхолегочной патологией / Г.И. Дранник, О.В. Свидро, Л.Я. Кушко // Проблемы экології та медицини. – 1998. – Т. 2, № 1–2. – С. 13–17.

21. Ермольева, З. В. Биологически активные вещества / З. В. Ермольева – Москва: Медицина, 1966. –20 с.

22. Ермольева, З.В. Антибиотики и продигиозан / З.В. Ермольева, Г.Е. Вайсберг // Советская медицина. 1972. – № 2. С. 12–13.

23. Ермольева, З.В. Выделение и характеристика продигиозана из *Bacterium prodigiosum* при глубинном выращивании / З.В. Ермольева, Д.М. Трахтенберг, Б.Н. Бондаренко // Антибиотики. – 1964. – Т. 9, № 5. – С. 397.

24. Забелев, А.В. Результаты кольпоскопического скрининга и опыт применения изопринозина в лечении папилломавирусных поражений шейки матки / А.В. Забелев, О.К. Долматова, Е.М. Сивоконева // Фарматека. – 2005. – № 3. – С. 72–75.

25. Зубахин, А.А. Особенности восстановления эритроидного ростка после кровопотери у мышей, стимулированных продигиозаном / А.А. Зубахин,

Д.Н. Маянский, Э.Г. Щербакова // Антибиотики и медицинская биотехнология. – 1987. – Т. 32, № 10. – С. 781–785.

26. Иванова, В.В. Влияние иммуномодулирующей терапии на метаболический ответ лимфоцитов у больных ОРВИ на фоне герпетического инфицирования / В.В. Иванова, Л.В. Говорова, Е.Н. Вершинина // Детские инфекции. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 6—11.

27. Иммунизация против шигеллеза Зонне эпидемиологически значимых групп населения в Свердловской области и влияние ее на эпидемиологический процесс / С.Н. Осипова, В.В. Романенко, А.И. Юровских, и др. // Инфекция и иммунитет. – 2012. – №1–2. – С.47–48.

28. Ищенко, Т.В. Эффективность комплексного санаторно–курортного лечения больных хроническим бронхитом в условиях низкогорья в сочетании с применением иммуномодулятора ликолипд: автореф. дис. ... канд. мед. наук: специальность 14.00.36 / Ищенко Татьяна Владимировна. – Москва, 2002. – 24 с.

29. Кеворков, Н.Н. Эффективность комплексной иммунотерапии при инфекционно–аллергической бронхиальной астме (БА) / Н.Н. Кеворков, Б.А. Бахметьев, В. А. Черешнев // International Journal of Immunorehabilitation. – 1997. – № 7. – P. 105.

30. Кирюхин, А.В. Оптимизация лечения часто и длительно болеющих детей: иммунокоррекция Ликолипдом / А.В. Кирюхин, Н.А. Парфенова, Т.А. Максимова // Российский педиатрический журнал. – 2001. – № 5. – С. 27–29.

31. Колесникова, Н.В. Регуляция мурамилдипептидами синтеза иммуноглобулина Е в эксперименте и клинике / Н.В. Колесникова, Е.А. Коков, Т.М. Андропова // Российский аллергологический журнал. – 2008. – № 5. – С. 50–55.

32. Конев, Ю.В. Эндотоксин (ЛПС) в патогенезе атеросклероза / Ю.В. Конев, Л.Б. Лазебник // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2011. – № 11. – С.15–26.

33. Коррекция лейкопении с помощью нового пробиотического иммуномодулятора (продукт *Lactobacillus Delbrueckii*) в комбинированном

лечении больных раком молочной железы / С.И. Шпилева, В.И. Тарутинов, В.С. Мосиенко, и др. // Онкология. – 2000. – Т.2, №1–2. – С. 83–86.

34. Коррекция нейтропении и нарушений функциональной активности нейтрофилов при проведении противовирусной терапии хронического гепатита С / В.Х. Фазылов, Э.Р. Манапова, Я.Р. Мангушева, и др. // Инфекционные болезни. – 2012. – Т. 10, № 1. – С. 80–83.

35. Крюкова, А.В. Физико–химические и антигенные свойства извлекаемых мочевиной поверхностных структур *Yersinia pseudotuberculosis* O:1b / А.В. Крюкова, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 4. – С. 659–667.

36. Лебензон, С.С. Применение продигозана и зимозана при лечении детей, больных вирусным гепатитом А / С.С. Лебензон, Д.Н. Маянский, Н.И. Гаврилова // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 1988. – Т. 67, № 6. – С. 27–30.

37. Левина, Н.А. О роли изменений функциональной активности стромальных и гемопозитических клеток–предшественников в механизме противолучевого действия продигозана: автореф. дис. ... канд. мед. наук: специальность 14.00.16 / Левина Наталья Александровна. – Москва, 1992. – 24 с.

38. Литвин, Л.С. Модели экспериментальной атопической бронхиальной астмы / Л.С. Литвин, А.А. Бабахин, М.Р. Хаитов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. – № 3. – С. 26–28.

39. Манапова, Э.Р. Цитопении и их коррекция при противовирусной терапии хронического гепатита С у пациентов с генотипом 1 / Э.Р. Манапова, В.Х. Фазылов, С. В. Гурьянова // Вопросы вирусологии. – 2017. – № 4. – С. 174–178.

40. Манухин, И.Б. Комплексное лечение пациенток с локальным и распространённым кондиломатозом шейки матки / И.Б. Манухин, Г.М. Минкина, М.М. Высоцкий // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2005. – Т. 4. – № 1. – С. 20–24.

41. Маянский, Д.Н. Особенности регенерации гепатоцитов при стимуляции купферовских клеток продигозаном / Д.Н. Маянский, В.И.

Щербаков // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1978. – Т. 86, № 7. – С. 69–71.

42. Метабиотики — новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиологическими нарушениями в организме человека / Б. А. Шендеров, Е. И. Ткаченко, Л. Б. Лазебник, и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – № 3. – С. 83–92.

43. Метаорганизм. Стресс и адаптация / коллективная монография под ред. Бурмистровой А.Л. – Челябинск: Издательство Челяб. гос. ун-та, 2019. – С. 93–105, 171–201.

44. Митропанова М.Н. Позитивные эффекты иммуномодулирующей терапии в реабилитации детей с врожденными расщелинами губы и нёба на этапах хирургического лечения / М.Н. Митропанова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2018. – Т. 22, № 1. – С. 57–66.

45. Михеева, Г.Н. Применение ликопада при лечении атопической бронхиальной астмы, осложненной вторичной иммунной недостаточностью / Г.Н. Михеева // Современные проблемы аллергологии, клинической иммунологии и иммунофармакологии. – 1998. – № 1. – С. 293.

46. Нагайчук, В.И. Результаты иммунологического исследования эффективности отечественного иммуномодулятора лиастена в комплексном лечении больных с ожогами / В.И. Нагайчук, С.В. Зайков, А. М. Поворозник // Шпитальна хірургія. – 2007. – № 2. – С. 19–27.

47. Несмеянов, В.А. Глюкозаминилмурамоилпептиды: на пути к пониманию молекулярного механизма биологической активности / В.А. Несмеянов // International Journal of Immunorehabilitation. – 1998. – № 10. – С. 19–29.

48. Нестерова, И.В. Способ иммунокоррекции ликопидом нарушений местного иммунитета у больных с острыми одонтогенными периоститами / И.В. Нестерова, Н.В. Колесникова, Н.А. Неделько // Стоматолог–практик. – 2006. – Т. 12, № 148. – С. 30–31.

49. Новикова, Н.Д. Применение Ликопида в комплексном лечении бронхиальной астмы у детей / Н.Д. Новикова, В.И. Новикова, Д.К. Новиков // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2003. – № 4. – С. 52–56.

50. Опарина, О.Н. Биологические свойства эндотоксина кишечной микрофлоры / О.Н. Опарина // Современные научные исследования и инновации. – 2014. – № 1. – С. 1–5.

51. Опыт использования вакцины Шигеллвак для профилактики дизентерии Зонне в Ставропольском крае / И.В. Ковальчук, А.В. Ермаков, О.А. Балабан, и др. // Перспективы развития вакцинологии. – 2012. – Т. 2, № 1–2. – С. 103.

52. Оценка, прогнозирование и коррекция первой фазы раневого процесса у больных с заболеваниями периферических артерий нижних конечностей / С.М. Смотрин, А.Г. Кузнецов, И.А. Наумов, и др. // Журнал ГрГМУ. – 2007. – №1. С. 17–23.

53. Панин, Л.Е. Активация биосинтеза белка в органах и тканях крыс при стимуляции системы мононуклеарных фагоцитов продигиозаном / Л.Е. Панин, И.Ф. Усынин, М.В. Горячева // Вопросы медицинской химии. – 1994. – Т. 40, № 1. – С. 14–16.

54. Пинегин, Б.В. Определение естественных антител к N–ацетилглюкозаминил–N–ацетилмурамилдипептиду (ГМДП) в сыворотке крови здоровых людей / Б.В. Пинегин, А.В. Кулаков, Е.А. Макаров // Иммунология. – 1995. – № 1. – С. 42–45.

55. Пинегин, Б.В. Препараты мурамилдипептидного ряда – иммуностропные лекарственные средства нового поколения / Б.В. Пинегин, Т.М. Андропова, Н.И. Карсонова // International Journal of Immunorehabilitation. – 1997. – № 6. С. 27–33.

56. Пликанчук, О.В. Динамика клинических и иммунологических показателей у больных с впервые диагностированным деструктивным туберкулезом легких под влиянием иммуномодулятора мурамилпептидного ряда /

О.В. Пликанчук // Таврійський медико–біологічний вісник. – 2009. – Т. 12, № 1. – С. 62–66.

57. Рабинович, О.Ф. Применение ликопида в комплексной терапии дисбактериоза полости рта / О.Ф. Рабинович, И.М. Рабинович, Е.С. Абрамова // Стоматология. – 2013. – Т. 92, № 1. – С. 40–42.

58. Результаты 2/3 фазы клинических испытаний иммуномодулятора полимурамил при гнойной хирургической инфекции / М.В. Пащенко, А.С. Будихина, Н. М. Голубева, и др. // Иммунология.– 2012. – № 4. – С. 199–203.

59. Результаты фазы 1 клинических испытаний иммуномодулятора полимурамила / М.В. Пащенко, А.С. Будихина, Н.М. Голубева, и др. // Иммунология. – 2011. – № 6. – С. 315–321.

60. Русанова, Е.В. Роль эндотоксина в развитии гнойно–септических заболеваний и методы его выявления в крови / Е.В. Русанова, А.Г. Ниязатов, И.М. Протас // Альманах клинической медицины. – 2013. – № 29. – С.70–73.

61. Сабилов, А.Х. Иммуномодулятор Ликопид в комплексной терапии онкологических больных / Сабилов А.Х., Чернецова Л.Ф., Зотов П.Б. // Тюменский медицинский журнал. –1999. – № 3. – С. 31.

62. Самсонов, В. А. Показатели опсонофагоцитарной системы у больных атопическим дерматитом и коррекция ликопидом выявленных нарушений / В.А. Самсонов, С.Ю. Резайкина, М.М. Яшин // Вестник дерматологии и венерологии. – 1999. – № 4. – С. 27–29.

63. Серкова, Н.А. Использование нового отечественного иммуномодулятора Ликопида для снижения сезонной заболеваемости / Н.А. Серкова, И.Л. Серков, А.В. Кулаков // Иммунология. – 2000. – № 3. – С. 62–63.

64. Синтетические иммуномодуляторы / Т.М. Андропова, И.М. Дозморов, М.И. Мустафаев и др. – М.: Наука, 1991. – 199 с.

65. Смотрин, С.М. Предоперационная подготовка к малым ампутациям стопы при хронической артериальной недостаточности нижних конечностей / С.М. Смотрин, А.Г. Кузнецов, И.А. Наумов, и др. // Журнал ГрГМУ. – 2008. – № 3. – С. 91–93.

66. Современный подход к использованию средств специфической защиты в предупреждении заболеваемости кишечными инфекциями на территории Самарской области / Н.М. Сергеева, Р. Р. Галимова, А.М. Спиридонов, и др. // Инфекция и иммунитет. – 2012. – №1–2. – С.10.

67. Создание бесклеточной коклюшной вакцины, включающей иммуномодулятор класса мурамоилпептидов / М.В. Брицина, Т.И. Валякина, Н.С. Захарова, и др. // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – № 7. – С. 58–62.

68. Сравнительная эффективность включения Т-активина и продигозана в комплекс лечения больных с хроническим бронхитом / В.А. Шилов, А.П. Михеева, Е.А. Вострикова, и др. // Национальный конгресс по болезням органов дыхания. – 1995. – С. 355.

69. Сравнительный анализ адьювантных свойств глюкозаминилмурамилдипептида и гена ганулоцитарно–макрофагального колониестимулирующего фактора при ДНК–иммунизации против вируса простого герпеса / А.Ю. Козлов, Р.Р. Климова, Л.Н. Шингарова, и др. // Молекулярная биология. – 2005. – Т. 39, №3. – С. 504–512.

70. Структурно–функциональное исследование глюкозаминилмурамоилпептидов. Влияние химической модификации N–ацетилглюкозаминил–N–ацетилмурамоилдипептида на его иммуномодулирующие свойства *in vivo* и *in vitro* / Е.А. Мещерякова, С.В. Гурьянова, Е.А. Макаров, и др. // Биоорганическая химия. – 1991. – Т. 17, № 9. – С. 1157–1165.

71. Флисюк, Е.В. Актуальность применения пептидных препаратов в терапии заболеваний предстательной железы / Е.В. Флисюк, Р.Р. Шаяхметов, И.В. Никитина // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2011. – № 1.– С.1–3.

72. Хаитов, Р.М. Современные иммуномодуляторы. Классификация. Механизм действия / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин. – М.: Фармаруспринт. – 2005. – 27 с.

73. Хворик, Д.О. Липополисахариды в комплексном лечении болезни Рейтера и псориатического артрита, ассоциированных с урогенитальным хламидиозом / Д. О. Хворик // Журнал ГрГМУ. – 2012. – Т. 37, № 1. – С. 62–65.
74. Чернышев, И.В. Пирогенал в комплексной терапии хронического бактериального простатита / И.В. Чернышев, К.А. Степанов // Эффективная фармакотерапия. Урология и Нефрология. – 2010. – № 1. – С. 24–26.
75. Черняк, С.А. Прогнозирование эффективности пирогеналотерапии у пациентов с хроническим гепатитом С / С.А. Черняк, В.М. Цыркунов, Е.М. Дорошенко // Журнал ГрГМУ. – 2018. – № 3. – С. 311–316.
76. Чувиров, Д.Г. Клинико–иммунологическая эффективность применения Ликопида у детей с повторными инфекциями верхних дыхательных путей / Д. Г. Чувиров, М. Н. Ярцев // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 48–50.
77. Чувиров, Д.Г. Лечение хронических гнойно–воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей у детей. / Д.Г. Чувиров, М.Н. Ярцев // Юбил. сбор. научн. статей «Ликопид в педиатрической практике». С–Петербург. – 2006. – С. 22–28.
78. Эффект ГМДП, заключённого в липосомы, на метастазирование карциномы легкого Льюис / В.Ю. Уманский, А.В. Стефанов, О.П. Бондарь, и др. // Экспериментальная онкология. – 1988. – Т. 10, № 5. – С. 40–43.
79. Яковлев, М.Ю. Элементы эндотоксиновой теории физиологии и патологии человека / М.Ю. Яковлев // Физиология человека. – 2003. – №4. – С. 154–165.
80. Янкелевич И.А. Особенности развития стресс–реакции у крыс при стрессирующем воздействии и введении антимикробного пептида дефенсина RATNP–3 / И.А. Янкелевич, Г.М. Алешина, В.Н. Кокряков // Медицинский академический журнал. – 2014. – Т. 14, № 4. – С. 63–67.
81. A Common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility / T.L. Tollner, S.A. Venners, E.J. Hollox et al. // Sci. Transl. Med. – 2011. – Vol. 3. – 92ra65.

82. A comparative study of salivary buffering capacity, flow rate, resting pH, and salivary immunoglobulin A in children with rampant caries and caries-resistant children / S. Kuriakose, C. Sundaresan, V. Mathai et al. // *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* – 2013. – Vol. 31. – P. 69–73.
83. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release / H. Yang, H.S. Hreggvidsdottir, K. Palmblad, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2010. – Vol. 107. – P. 11942–11947. doi: 10.1073/pnas.1003893107.
84. A dual role for receptor-interacting protein kinase 2 (RIP2) kinase activity in nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)-dependent autophagy / C.R. Homer, A. Kabi, N. Marina-García et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 25565–25576.
85. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll / F. L. Rock, G. Hardiman, J.C. Timans, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – Vol. 95. – P. 588–593. doi: 10.1073/pnas.95.2.588.
86. A novel role for defensins in intestinal homeostasis: Regulation of IL-1 $\beta$  secretion / J. Shi, S. Aono, W. Lu et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 1245–1253.
87. A peptide antibiotic from human skin / J. Harder, J. Bartels, E. Christopher et al. // *Nature.* – 1997. – Vol. 387. – P. 861.
88. A product of RpfB and RipA joint enzymatic action promotes the resuscitation of dormant mycobacteria / V.D. Nikitushkin, G.R. Demina, M.O. Shleeva et al. // *FEBS J.* – 2015. – Vol. 282. – P. 2500–2511.
89. A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* / N. Pujol, E.M. Link, L.X. Liu et al. // *Curr Bio.* – 2001. – Vol. 11. – P. 809–821.
90. A Review on the Use of Antimicrobial Peptides to Combat Porcine Viruses / G. Pen, N. Yang, D. Teng et al. // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9, № 11. – 801. doi: 10.3390/antibiotics9110801.

91. A synthetic NOD2 agonist, muramyl dipeptide (MDP)-Lys (L18) and IFN- $\beta$  synergistically induce dendritic cell maturation with augmented IL-12 production and suppress melanoma growth / T. Fujimura, K. Yamasaki, T. Hidaka, et al. // *J. Dermatol. Sci.* – 2011. – Vol. 62, № 2 – P. 107-15.
92. A Therapeutic Potential of Animal  $\beta$ -hairpin Antimicrobial Peptides / P.V. Panteleev, S.V. Balandin, V.T. Ivanov et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2017. – Vol. 24. – P. 1724–1746.
93. Acute and Chronic Systemic Inflammation: Features and Differences in the Pathogenesis, and Integral Criteria for Verification and Differentiation / N. Zotova, Y.Zhuravleva, V. Chereshev et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – Vol. 24, № 2. – 1144. doi: 10.3390/ijms24021144.
94. Adam A. Muramyl peptides: Immunomodulators, sleep factors, and vitamins / A. Adam, E. Lederer // *Medical research reviews* (Ed. Stevens D.G.). – N.Y.: Wiley and Sons. – 1984. – Vol. 4. – P. 111-152.
95. Agarwal, G. Antiviral Peptides: Identification and Validation / G. Agarwal, R. Gabrani // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2021. – Vol. 27. – P. 149–168.
96. Agerberth, B. FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis / B. Agerberth, H. Gunne, J. Odeberg [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – Vol. 92. – P. 195–199.
97. Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development / Y. Lei, A. M. Ripen, N. Ishimaru et al. // *The Journal of Experimental Medicine.* – 2011. – Vol. 208, № 2. – P. 383–94.
98. Allergic cross-reactivity made visible: Solution structure of the major cherry allergen Pru av 1 / P. Neudecker, K. Schweimer, J. Nerkamp et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276. – P. 22756–22763.
99. Amiel C. Clinical Tolerance and Immunologic Effects After Single or Repeated Administrations of the Synthetic Immunomodulator Murabutide in HIV-1-Infected Patients / C. Amiel, X. De La Tribonnière, V. Vidal // *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* – 2002. – Vol. 30. – P. 294-305.

100. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome / J. Li, Jia H., X. Cai et al. // *Nat. Biotechnol.* – 2014. – Vol. 32. – P. 834–841. doi: 10.1038/nbt.2942.
101. Analgesic effects of chemically synthesized NOD1 and NOD2 agonists in mice / T. Sato, Y. Shikama, H. Shimauchi et al. // *Innate Immun.* – 2011. – Vol. 1. – P. 54-59.
102. Analysis of Synergistic Effects of Antimicrobial Peptide Arenicin-1 and Conventional Antibiotics / I. A. Bolosov, A. A. Kalashnikov, P. V. Pantelev [et al.] // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2017. – Vol. 162. – P. 765–768.
103. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals / C.M. Bassis, Erb- J. R. Downward, R.P. Dickson et al. // *mBio.* – 2015 – Vol. 6. – e00037-15.
104. Anti-adhesion and Anti-inflammatory Potential of the Leaderless Class IIb Bacteriocin Enterocin DD14 / R. Teiar, A. Pérez-Ramos, H. Zgheib et al. // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* – 2022. – Vol. 14. – P. 613–619.
105. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening / R.O. Benech, E. Kheadr, C. Lacroix et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2002. – Vol. 68. – P. 5607–5619.
106. Antibody neutralization of microbiota-derived circulating peptidoglycan dampens inflammation and ameliorates autoimmunity / Z. Huang, J. Wang, X. Xu et al. // *Nat. Microbiol.* – 2019. – Vol. 4. – P. 766–773.
107. Anticancer Activity of the Goat Antimicrobial Peptide ChMAP-28 / A.A. Emelianova, D.V. Kuzmin, P.V. Pantelev et al. // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – 1501.
108. Anti-Inflammatory Action of an Antimicrobial Model Peptide That Suppresses the TRIF-Dependent Signaling Pathway via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Endocytosis in Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophages / D.W. Shim, K.H. Heo, Y.K. Kim et al. // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10. – e0126871.

109. Antimicrobial and Immunomodulatory Activity of PMAP-23 Derived Peptides / E.J.A. Veldhuizen, M.R. Scheenstra, J.L.M. Tjeerdsma-van Bokhoven et al. // *Protein Pept. Lett.* – 2017. – Vol. 24. – P. 609–616.

110. Antimicrobial nisin acts against saliva derived multi-species biofilms without cytotoxicity to human oral cells / J.M. Shin, I. Ateia, J.R. Paulus et al. // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6. – 617.

111. Antimicrobial Peptide Arenicin-1 Derivative Ar-1-(C/A) as Complement System Modulator / I.A. Krenev, E.S. Umnyakova, I.E. Eliseev et al. // *Mar. Drugs.* – 2020. – Vol. 18. – 631.

112. Antimicrobial Peptides as Anticancer Agents: Functional Properties and Biological Activities / A.L. Tornesello, A. Borrelli, L. Buonaguro et al. // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25. – 2850.

113. Antimicrobial peptides from amphibian skin potently inhibit human immunodeficiency virus infection and transfer of virus from dendritic cells to T cells / S.E. VanCompernelle, R.J. Taylor, K. Oswald-Richter et al. // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 11598–11606.

114. Antimicrobial peptides human beta-defensin (hBD)-3 and hBD-4 activate mast cells and increase skin vascular permeability / X. Chen, F. Niyonsaba, H. Ushio et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2007. – Vol. 37. – P. 434–444.

115. Antimicrobial Peptides Human  $\beta$  Defensins Stimulate Epidermal Keratinocyte Migration, Proliferation and Production of Proinflammatory Cytokines and Chemokines / F. Niyonsaba, H. Ushio, H. Nakano et al. // *J. Investig. Dermatol.* – 2007. – Vol. 127. – P. 594–604.

116. Antimicrobial peptides in human sepsis / L. Martin, A. van Meegern, S. Doemming et al. // *Front. Immunol.* – 2015. – Vol. 6. – Art. 404. doi: 10.3389/fimmu.2015.00404.

117. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity / T. Miyata, F. Tokunaga, T. Yoneya et al. // *J. Biochem.* – 1989. – Vol. 106. – P. 663–668. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122913.

118. Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases / A. Bin Hafeez, X. Jiang, P.J. Bergen, et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – 11691. doi: 10.3390/ijms222111691.

119. Anti-Tumor Effects of Peptide Therapeutic and Peptide Vaccine Antibody Co-targeting HER-1 and HER-2 in Esophageal Cancer (EC) and HER-1 and IGF-1R in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) / J. Overholser, K.H. Ambegaokar, S.M. Eze et al. // *Vaccines (Basel)*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 519–543.

120. Application of nano-antibiotics in the diagnosis and treatment of infectious diseases. / G.R.L. Al-Awsi, A A. Alameri, A.M.B. Al-Dhalimy et al. // *Braz. J. Biol.* – 2023. – Vol. 84. – e264946.

121. Applying high throughput and comprehensive immunoinformatics approaches to design a trivalent subunit vaccine for induction of immune response against emerging human coronaviruses SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV-2 / A. Rahmani, M. Bae, K. Saleki et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2021. – Vol. 29. – P. 1–17.

122. Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy / D. Mittag, J. Akkerdaas, B.K. Ballmer-Weber et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 114. – P. 1410–1417. doi: 10.1016/j.jaci.2004.09.014

123. Arora, R. Pathogenesis-related proteins: A defensin for plants but an allergen for humans / R. Arora, A. Kumar, I. K. Singh, // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2020. – Vol. 157. – P. 659–672.

124. Arora, S. Beyond Host Defense: Deregulation of Drosophila Immunity and Age-Dependent Neurodegeneration / S. Arora, P. Ligoxygakis // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – 1574.

125. Artis, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut / D. Artis // *Nature Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 411–420.

126. Association of defensin beta-1 gene polymorphisms with asthma / H. Levy, B.A. Raby, S. Lake et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2005. – Vol. 115. – P. 252–258. doi: 10.1016/j.jaci.2004.11.013.
127. Atopic asthmatic patients have reduced airway inflammatory cell recruitment after inhaled endotoxin challenge compared with healthy volunteers / M.L. Hernandez, M. Herbst, et al. // *J Allergy Clin Immunol.* – 2012. – Vol. 130, № 4. – P. 869-76.e2.
128. Aurelin, a Novel Antimicrobial Peptide from Jellyfish *Aurelia aurita* with Structural Features of Defensins and Channel-Blocking Toxins / T.V. Ovchinnikova, S.V. Balandin, G.M. Aleshina et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2006. – Vol. 348, № 2. – P. 514–523.
129. Azuma, I. Biochemical and immunological properties of the fractions of tubercle bacilli / I. Azuma // *Kekkaku.* – 1998. – Vol. 73, № 2. – P. 65-70.
130. Azuma, I. Review: Inducer of cytokines in vivo: overview of field and romurtide experience / I. Azuma // *Int. J. Immunopharmac.* – 1992. – Vol. 14. – P. 487-496.
131. Bachere, E. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity / E. Bachere, D. Destoumieux, P. Bulet // *Aquaculture.* – 2000. – Vol. 191. – P. 71–88.
132. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases / W. Vollmer, B. Joris, P. Charlier et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2008. – Vol. 32. – P. 259–286.
133. Bacteriocin BacSp222 and Its Succinylated Forms Exhibit Proinflammatory Activities Toward Innate Immune Cells / J. Śmiałek, M. Bzowska, A. Hinz et al. // *J Inflamm Res.* – 2022. – Vol. 15. – P. 4601-4621.
134. Bacteriocin isolated from the natural inhabitant of *Allium cepa* against *Staphylococcus aureus* / R. Taggar, M. Jangra, A. Dwivedi et al. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* – 2021. – Vol.2. – P. 20-28.
135. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials / A. Darbandi, A. Asadi, M. Mahdizade Ari, et al. // *J Clin Lab Anal.* – 2022. – Vol. 36, № 1. – e24093.

136. Bahr G. M. Immunological activities of muramyl peptides / G. M. Bahr, L. Chedid // *Federat. Proc.* – 1986. – Vol. 45, № 11. – P. 2541-2544.
137. Barela Hudgell, M.A. Sequence Diversity, Locus Structure, and Evolutionary History of the SpTransformer Genes in the Sea Urchin Genome / M.A. Barela Hudgell, L.C. Smith // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. – 744783.
138. Baroni, A. Antimicrobial human beta-defensin-2 stimulates migration, proliferation and tube formation of human umbilical vein endothelial cells / A. Baroni, G. Donnarumma, I. Paoletti [et al.] // *Peptides.* – 2009. – Vol. 30. – P. 267–272.
139. Beck, G. Immunity and the invertebrates / G. Beck, G.S. Habicht // *Scientific American.* – 1996. – Vol. 275. – P. 60–66.
140. Beta-defensin 1 gene polymorphisms in the pathologies of the oral cavity- Data from meta-analysis: Association only with rs1047031 not with rs1800972, rs1799946, and rs11362 / Z. Ślebioda, T. Wóźniak, B. Dorocka-Bobkowska et al. // *J. Oral Pathol. Med.* – 2021. – Vol. 50. – P. 22–31.
141. Beta-Defensin 2 and 3 promote the uptake of self or CpG DNA enhance IFN- $\alpha$  production by human plasmacytoid dendritic cells, and promote inflammation / P. Tewary, G. dela Rosa, N. Sharma et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 191. – P. 865–874. doi: 10.4049/jimmunol.1201648.
142. Beta-Defensins activate human mast cells via Mas-related gene X2 / H. Subramanian, K. Gupta, D. Lee et al. // *J. Immunol.* – 2013. – Vol. 191. – P. 345–352. doi: 10.4049/jimmunol.1300023.
143. Beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6 / D. Yang, O. Chertov, S.N. Bykovskaia et al. // *Science.* – 1999. – Vol. 286. – P. 525–528.
144. Bevins, C.L. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis / C.L. Bevins, N.H. Salzman // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2011. – Vol. 9. – P. 356–368.
145. Beyond anti-microbial properties: The role of cathelicidin in allergic rhinitis / F. Dilek, B. Gultepe, E. Ozkaya, et al. // *Allergol. Immunopathol.* – 2016. – Vol. 44. – P. 297–302.

146. Bhattacharyya, S. Endogenous ligands of TLR4 promote unresolving tissue fibrosis: implications for systemic sclerosis and its targeted therapy / S. Bhattacharyya, J. Varga // *Immunol Lett.* – 2018. – Vol. 195. – P. 9–17.
147. Bilak, H. Toll and Toll-like receptors in *Drosophila* / H. Bilak, S. Tauszig-Delamasure, J.L. Imler // *Biochem Soc Trans.* – 2003. – Vol. 31(Pt 3). – P. 648-51.
148. Biomedical applications of nisin. / J.M. Shin, J.W. Gwak, P. Kamarajan et al. // *J Appl Microbiol.* – 2016. – Vol. 120. – P. 1449-1465.
149. Bogefors, J. Reduced tonsillar expression of human beta-defensin 1, 2 and 3 in allergic rhinitis / J. Bogefors, A.M. Kvarnhammar, U. Hockerfelt [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2012. – Vol. 65. – P. 431–438.
150. Borah, A. A Crosstalk on Antimicrobial Peptides / A. Borah, B. Deb, S. Chakraborty // *Int. J. Pept. Res. Ther.* – 2021. – Vol. 27. – P. 229–244.
151. Bosch, T.C. Rethinking the role of immunity: lessons from *Hydra* / T.C. Bosch // *Trends Immunol.* – 2014. – Vol. 35, № 10. – P. 495-502.
152. *Botryllus schlosseri* allorecognition: Tackling the enigma / D.A. Taketa, A. W. De Tomaso et al. // *Dev. Comp. Immunol.* – 2015. – Vol. 48. – P. 254.
153. *Botryllus schlosseri* as a Unique Colonial Chordate Model for the Study and Modulation of Innate Immune Activity / O. Goldstein, E.A. Mandujano-Tinoco, T. Levy, et al. // *Mar Drugs.* – 2021. – Vol. 19, № 8. – 454.
154. Bowdish, D.M. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins / D.M. Bowdish, D.J. Davidson, R.E. Hancock // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2006. – Vol. 306. – P. 27–66.
155. Brandt, J.P. Toll-like Receptor Signaling Promotes Development and Function of Sensory Neurons Required for a *C. elegans* Pathogen-Avoidance Behavior / J.P. Brandt, N. Ringstad // *Curr Biol.* – 2015. – Vol. 25, № 17. – P. 2228-2237.
156. Burnham, J. Re-estimating annual deaths due to multidrug-resistant organism infections / J. Burnham, M. Olsen, M. Kolley // *Infection Control and Hospital Epidemiology.* – 2019. – Vol. 40. – P. 112-113.

157. Butyrate and Forskolin Augment Host Defense, Barrier Function, and Disease Resistance Without Eliciting Inflammation / K. Robinson, Q. Yang, H. Li et al. // *Front. Nutr.* – 2021. – Vol. 8. – 778424.

158. Caerin1.1 Suppresses the Growth of Porcine Epidemic Diarrhea Virus In Vitro via Direct Binding to the Virus / N. Guo, B. Zhang, H. Hu, et al. // *Viruses.* – 2018. – Vol. 10. – P. 507.

159. Calcitonin in a protochordate, *Ciona intestinalis*—the prototype of the vertebrate calcitonin/calcitonin gene-related peptide superfamily / T. Sekiguchi, N. Suzuki, N. Fujiwara et al. // *FEBS J.* – 2009. – Vol. 276. – P. 4437–4447.

160. Carey, M. The enhanceosome and transcriptional synergy / M. Carey // *Cell.* – 1998. – Vol. 92. – P. 5–8.

161. Caries and Innate Immunity: DEFB1 Gene Polymorphisms and Caries Susceptibility in Genetic Isolates from North-Eastern Italy / C.O. Navarra, A. Robino, N. Pirastu et al. // *Caries Res.* – 2016. – Vol. 50. – P. 589–594. doi: 10.1159/000450965.

162. Carroll, I.M. The gastrointestinal microbiome: a malleable, third genome of mammals / I.M. Carroll, D.W. Threadgill, D.S. Threadgill // *Mamm. Genome.* – 2009. – Vol. 20, № 7. – P. 395–403.

163. Cathelicidin antimicrobial peptides block dendritic cell TLR4 activation and allergic contact sensitization / A.Di Nardo, M.H. Braff, K.R. Taylor, et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 178. – P. 1829–1834.

164. Cationic peptides from peptic hydrolysates of rice endosperm protein exhibit antimicrobial, LPS-neutralizing, and angiogenic activities / M. Taniguchi, J. Kawabe, R. Toyoda et al. // *Peptides.* – 2017. – Vol. 97. – P. 70–78.

165. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions / L. Ohl, M. Mohaupt, N. Czeloth et al. // *Immunity.* – 2004. – Vol. 21. – P. 279–88.

166. CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance / H. Kurobe, C. Liu, T. Ueno et al. // *Immunity.* – 2006. – Vol. 24. – P. 165–77.

167. CD103+ T and Dendritic Cells Indicate a Favorable Prognosis in Oral Cancer / Y. Xiao, H. Li, L. Mao et al. // *Journal of Dental Research*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 002203451988261.

168. Cell-free immunity in *Cecropia*. A model system for antibacterial proteins / H. G. Boman, I. Faye, G.H. Gudmundsson et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1991. – Vol. 201. – P. 20123–20131.

169. Cellular stress promotes NOD1/2-dependent inflammation via the endogenous metabolite sphingosine-1-phosphate / G. Pei, J. Zyla, L. He et al. // *EMBO J.* – 2021. – Vol. 40, № 13. – e106272.

170. Centaurin 1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1- and 2-dependent NF- $\kappa$ B activation / J.K. Yamamoto-Furusho, N. Barnich, R. Xavier et al. // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281. – P. 36060–36070.

171. Chakraborti, S. Antimicrobial Peptides. In: Management of Infections in the Immunocompromised Host / S. Chakraborti, S. Ram // B. Segal (Ed.); Springer: Cham, Switzerland. – 2018. – 189 p.

172. Characterization and ecological implication of luminous *Vibrio-harveyi* isolated from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) / Y. Song, S. Lee, L. Thong et al. // *Zool. Stud.* – 1993. – Vol. 32. – P. 217–220.

173. Characterization of the Mollusc RIG-I/MAVS Pathway Reveals an Archaic Antiviral Signalling Framework in Invertebrates / B. Huang, L. Zhang, Y. Du et al. // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – P. 8217.

174. Chedid, L. Enhancement of nonspecific immunity to *Klebsiella pneumoniae* infection by a synthetic immunoadjuvant (N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine) and several analogs / L. Chedid, M. Parant, F. Parant et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – Vol. 74. – P. 2089–2093.

175. Chemical and immunological studies on mycobacterial polysaccharides. 1. Purification and properties of polysaccharides from human tubercle bacilli / I. Azuma, H. Kimura, T. Niinaka, et al. // *J Bacteriol.* – 1968. – Vol. 95, № 2. – P. 263-71.

176. Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family / J. Grigat, A. Soruri, U. Forssmann, et al. // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 3958–3965.
177. Chen, D. The Role of HBD-2 and HBD-3 in Human T Cell Development. Ph.D. Thesis, University of East London Health, London, UK. – 2016. – 64 p.
178. Chen, G. L. Upregulation of transient receptor potential canonical channels contributes to endotoxin-induced pulmonary arterial stenosis / G.L. Chen, Jiang H., F. Zou // *Med Sci Monit.* – 2016 – Vol. 22. – P. 2679–2684.
179. Chiumento, S. Ruminococcin C, a promising antibiotic produced by a human gut symbiont / S. Chiumento, C. Roblin, Kieffer-Jaquinod S. et al. // *Science advances.* – 2019. – Vol. 9. – eaaw9969.
180. Cho, H. Opossum Cathelicidins Exhibit Antimicrobial Activity Against a Broad Spectrum of Pathogens Including West Nile Virus / H. Cho, J. Yum, A. Larivière, N. Lévêque // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 347.
181. Clavanin A improves outcome of complications from different bacterial infections / O.N. Silva, I.C. Fensterseifer, E.A. Rodrigues et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – P. 1620–1626.
182. Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes / I.H. Lee, C. Zhao, Y. Cho et al. // *FEBS Lett.* – 1997. – Vol. 400. – P. 158–162. doi: 10.1016/s0014-5793(96)01374-9.
183. Clavaspilin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava* / I. H. Lee, C. Zhao, T. Nguyen et al. // *J. Pept. Res.* – 2001. – Vol. 58. – P. 445–456.
184. Clemmons, A.W. An effector peptide family required for *Drosophila* toll-mediated immunity / A.W. Clemmons, S.A. Lindsay, S.A. Wasserman // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11. – e1004876.
185. Colicin-Mediated Transport of DNA through the Iron Transporter FepA / R. Cohen-Khait, A. Harmalkar, Pham P. et al. // *mBio.* – 2021. – Vol. 12. – e0178721.
186. Complex mammalian-like haematopoietic system found in a colonial chordate / B. Rosental, M. Kowarsky, J. Seita et al. // *Nature.* – 2018. – Vol. 564. – P. 425.

187. Components of Mycobacteria and Muramyl Dipeptide with Adjuvant Activity Induce Lymphocyte Activating Factor / J.J. Oppenheim, A. Tagawa, L. Chedid et al. // *Cell Immunol.* – 1980. – Vol. 59. – P. 71–81.

188. Conjugation of Human  $\beta$ -Defensin 2 to Spike Protein Receptor-Binding Domain Induces Antigen-Specific Protective Immunity against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Human Dipeptidyl Peptidase 4 Transgenic Mice / J. Y. Kim, J.W. Suh, J. S. Kang et al. // *Infect. Chemother.* – 2023. – Vol. 1. – P. 34–44. doi: 10.3390/vaccines8040635.

189. Cooper, I. A review of the potential for bacteriophages to effect antibiofilm activity, using selected examples / I. Cooper // *Infect. Immun.* – 1989. – Vol. 57. – P. 2223–2229.

190. Cotter, P. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? / P. Cotter, R. Ross, C. Hill // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – Vol. 11. – P. 95–105.

191. Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection / J. Helft, B. Manicassamy, P. Guermonprez et al. // *J. Clin. Invest.* – 2012. – Vol. 122. – P. 4037–4047.

192. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: Presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract / A.A. Patil, Y. Cai, Y. Sang et al. // *Physiol. Genom.* – 2005. – Vol. 23. – P. 5–17. doi: 10.1152/physiolgenomics.00104.2005.

193. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis / T. Ohta, M. Sugiyama, H. Hemmi et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 23505.

194. Cummings, N.P. Activation of macrophages for enhanced release of superoxide anion and greater killing of *Candida albicans* by injection of muramyl dipeptide / N.P. Cummings, M.J. Pabst, R.B.Jr. Johnston // *J. Exp. Med.* – 1980. – Vol. 152. – P. 1659–1669.

195. Cyclic and acyclic defensins inhibit human immunodeficiency virus type-1 replication by different mechanisms / A. Seidel, Y. Ye, L.R. de Armas et al. // *PLoS ONE.* – 2010. – Vol. 5. – e9737.

196. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins / J. K. Kolls, P. B. McCray Jr., Y. R. Chan et al. // *Nat. Rev. Immunol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 829–835. doi: 10.1038/nri2433.
197. Da Veiga, S.P. Epidemiology of atopic dermatitis: A review / S.P. Da Veiga // *Allergy Asthma Proc.* – 2012. – Vol. 33. – P. 227–234.
198. Daher, K.A. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins / K.A. Daher, M.E. Selsted, R.I. Lehrer // *J. Virol.* – 1986. – Vol. 60. – P. 1068–1074.
199. Dale, B.A. Antimicrobial peptides in the oral environment: Expression and function in health and disease / B.A. Dale, L. Fredericks // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 119–133.
200. Dale, B.A. Periodontal epithelium: A newly recognized role in health and disease / B.A. Dale // *Periodontology 2000.* – 2002. – Vol. 30. – P. 70–78.
201. Dambuza, I.M. C-type lectins in immunity: recent developments / I.M. Dambuza, G.D. Brown // *Curr Opin Immunol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 21-27.
202. DBAASP v3, Database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics / M. Pirtskhalava, A. A. Armstrong, M. Grigolava et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – Vol. 49. – D288–D297. doi: 10.1093/nar/gkaa991.
203. dbAMP 2.0, Updated resource for antimicrobial peptides with an enhanced scanning method for genomic and proteomic data / J.H. Jhong, L. Yao, Y. Pang, Z. Li et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – P. D460–D470. doi: 10.1093/nar/gkab1080.
204. de Freire Bastos, M.D.C. Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria / M.D.C. de Freire Bastos, M.L. . Coelho, O.C. da Silva Santos // *Microbiol.* – 2015. – Vol. 161. – P. 683–700.
205. Deep-sea microbes as tools to refine the rules of innate immune pattern recognition / A.E. Gauthier, C.E. Chandler, V. Poli, et al. // *Sci Immunol.* – 2021. – Vol. 6. – eabe0531.

206. Defensin-related peptide 1 (Defr1) is allelic to Defb8 and chemoattracts immature DC and CD4+ T cells independently of CCR6 / K. Taylor, M. Rolfe, N. Reynolds et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 39. – P. 1353–1360.
207. Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune responses in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens / K. Tani, W. J. Murphy, O. Chertov et al. // *Int. Immunol.* – 2000. – Vol. 12. – P. 691–700.
208. Defensins: Natural component of human innate immunity / J. Jarczak, E. M. Kosciuczuk, P. Lisowski et al. // *Hum. Immunol.* – 2013. – Vol. 74. – P. 1069–1079. doi: 10.1016/j.humimm.2013.05.008.
209. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities / E. Zaura, B.J. Keijser, S.M. Huse et al. // *BMC Microbiol.* – 2009. – Vol. 9. – P. 259. doi: 10.1186/1471-2180-9-259.
210. Defining the Origins of the NOD-Like Receptor System at the Base of Animal Evolution / C. Lange, G. Hemmrich, U.C. Klostermeier et al. // *Mol Biol Evol.* – 2011 May. – Vol. 28, № 5. – P. 1687–1702.
211. Dehus, O. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with *Limulus* amoebocyte lysate assay / O. Dehus, T. Hartung, C.J. Hermann // *Endotoxin Res.* – 2006. – Vol. 12, № 3. – P. 171-180.
212. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines / C. Caux, S. Ait-Yahia, K. Chemin et al. // *Springer Seminars in Immunopathology.* – 2000. – Vol. 22, № 4. – P. 345–369.
213. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life / T. Granot, T. Senda, D.J. Carpenter et al. // *Immunity.* – 2017. – Vol. 46, № 3. – P. 504–515.
214. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria / M. Rescigno, M. Urbano, B. Valzasina et al. // *Nat. Immunol.* – 2001. – Vol. 2. – P. 361–367.
215. Deng, Z. Role of the neuroendocrine antimicrobial peptide catestatin in innate immunity and pain / Z. Deng, C. Xu // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* – 2017. – Vol. 49. – P. 967–972.

216. Design of a multi-epitope-based vaccine targeting M-protein of SARS-CoV2, An immunoinformatics approach / V.S. Ayyagari, T.C. Venkateswarulu, K. Abraham Peele et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2020. – Vol. 30. – P. 1–15.

217. Design of antimicrobial peptide arenicin analogs with improved therapeutic indices / P.V. Panteleev, I.A. Bolosov, S.V. Balandin et al. // *J. Pept. Sci.* – 2015. – Vol. 21. – P. 105–113.

218. Determination of the Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* Strain ATCC 33277 and Genomic Comparison with Strain W83 Revealed Extensive Genome Rearrangements in *P. gingivalis* / M. Naito, H. Hirakawa, A. Yamashita et al. // *DNA Research.* – 2008 – Vol. 15, № 4. – P. 215–25.

219. Development and functional specialization of CD103+ dendritic cells / M. L. del Rio, G. Bernhardt, J.I. Rodriguez-Barbosa et al. // *Immunol. Rev.* – 2010. – Vol. 234, № 1. – P. 268–281.

220. Development of a New Type of Influenza Subunit Vaccine Made by Muramyl dipeptide-Liposome: Enhancement of Humoral and Cellular Immune Responses / K. Nerome, Y. Yoshioka, M. Ishida et al. // *Vaccine.* – 1990. – Vol. 8, № 5. – P. 503–509.

221. Developmental cell death programs license cytotoxic cells to eliminate histocompatible partners / D.M. Corey, B. Rosental, M. Kowarsky, et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2016. – Vol. 113. – P. 6520–6525.

222. Dhabale, A. Types of Psoriasis and Their Effects on the Immune System / A. Dhabale, S. Nagpure // *Cureus.* – 2022. – Vol. 14, № 9. – P. e29536.

223. Dicynthaurin: an antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium* / I. H. Lee, Y. S. Lee, C. H. Kim et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – Vol. 1527. – P. 141–148. doi: 10.1016/s0304-4165(01)00156-8.

224. Diebold, S.S. Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins / S.S. Diebold // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 188. – P. 3-30.

225. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome / P.J. Turnbaugh, F. Backhed, L. Fulton et al. // *Cell. Host. Microbe.* – 2008. – Vol. 3. – P. 213–223.

226. Differential activity of lytic  $\alpha$ -helical peptides on lactobacilli and lactobacilli-derived liposomes / F. Szymanowski, G. E. Balatti, E. Ambroggio et al. // *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* – 2019. – Vol. 1861. – P. 1069–1077. doi: 10.1016/j.bbamem.2019.03.004.

227. Differential effects of alpha- and beta defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells / N. Sakamoto, H. Mukae, T. Fujii et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* – 2005. – Vol. 288. – P. 508–513. doi: 10.1152/ajplung.00076.2004.

228. Dik, D.A. Cell-wall recycling of the gram-negative bacteria and the nexus to antibiotic resistance / D.A. Dik, J.F. Fisher, S. Mobashery // *Chem. Rev.* – 2018. – Vol. 118. – P. 5952–5984.

229. Ding, F. Lipopolysaccharide Exposure Alleviates Asthma in Mice by Regulating Th1/Th2 and Treg/Th17 Balance / F. Ding, Z. Fu, B. Liu // *Med. Sci. Monit.* – 2018. – Vol. 24. – P. 3220–3229.

230. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120, Potential applications to microbicide development / M. R. Boyd, K. R. Gustafson, J. B. McMahon et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1997. – Vol. 41. – P. 1521–1530.

231. Disordered microbial communities in asthmatic airways / M. Hilty, C. Burke, H. Pedro et al. // *PLoS ONE* – 2010 – Vol. 5. – e8578.

232. Diverse toxic effectors are harbored by vgrG islands for interbacterial antagonism in type VI secretion system / J. Ma, M. Sun, Z. Pan et al. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Gen. Subj.* – 2018. – Vol. 1862. – P. 1635–1643. doi: 10.1016/j.bbagen.2018.04.010.

233. Drider, D. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications / D. Drider, S. Rebuffat // Berlin/Heidelberg, Germany: Springer Science and Business Media. – 2011. – 328 p.

234. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein / T. Michel, J.M. Reichhart, J.A. Hoffmann et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 414, № 6865. – P. 756-759.

235. Dziarski, R. Peptidoglycan recognition proteins and lysozyme / R. Dziarski, J. Royet, D. Gupta // *Encycl. Immunobiol.* – 2016. – Vol. 2. – P. 389–403.

236. Ebert, T.A. Negative growth and longevity in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson) / T.A. Ebert // *Science*. – 1967. – Vol. 157. – P. 557–558.

237. Effect of allergic rhinitis on the expression of human  $\beta$ -defensin 2 in tonsils / I.J. Choi, C.S. Rhee, C.H. Lee, et al. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2013. – Vol. 110. – P. 178–183.

238. Effect of BMAP-28 on human thyroid cancer TT cells is mediated by inducing apoptosis / D. Zhang, L. Wan, J. Zhang et al. // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 10. – P. 2620–2626.

239. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: Primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines / M. Nishimura, Y. Abiko, Y. Kurashige et al. // *J. Dermatol. Sci.* – 2004. – Vol. 36. – P. 87–95. doi: 10.1016/j.jdermsci.2004.07.001.

240. Effect of different solvents on nisin ZP potential as anticancer agent against MG-63 osteosarcoma cells / M.F. Azmia, A.A. Khateeba, S.A. Rahima et al. // *AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* – 2022. – Vol. 30, № 4. – P. 43-54.

241. Effect of growth factors on antimicrobial peptides and pro-inflammatory mediators during wound healing / H. Dommisch, J. Winter, W. Götz, et al. // *Clin. Oral Investig.* – 2015. – Vol. 19. – P. 209–220.

242. Effect of human defensins on lactobacilli and liposomes / A. A. Hugo, E. E. Tymczynsyn, A. Gómez-Zavaglia, et al. // *J. Appl. Microbiol.* – 2012. – Vol. 113. – P. 1491–1497.

243. Effect of synthetic muramyl dipeptide derivatives on staphylococcal infection in mice / N.I. Grabchenko, A.V. Karpov, C. Via et al. // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2001. – Vol. 3. – P. 50–53.

244. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a Caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier / L. Peng, Z. He, W. Chen et al. // *Pediatr Res.* – 2007. – Vol. 61. – P. 37–41.

245. Effects of NP-1 on proliferation, migration, and apoptosis of Schwann cell line RSC96 through the NF- $\kappa$ B signaling pathway / Y. Kou, F. Yu, Y. Yuan et al. // *Am. J. Transl. Res.* – 2020. – Vol. 12. – P. 4127–4140.

246. Eldridge, M. W. Allergen provocation augments endotoxin-induced nasal inflammation in subjects with atopic asthma / M. W. Eldridge, D. B. Peden // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2000. – Vol. 105, № 3. – P. 475–481.

247. Elevated Concentrations of Human Neutrophil Peptides in Plasma, Blood, and Body Fluids from Patients with Infections / T. Ihi, M. Nakazato, H. Mukae, et al. // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 25. – P. 1134–1140.

248. Enhancement of Macrophage Function by the Antimicrobial Peptide Sublancin Protects Mice from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* / S. Wang, Q. Ye, K. Wang et al. // *J. Immunol. Res.* – 2019. – Vol. 2019. – 3979352.

249. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis / S.L. Jongbloed, M.C. Lebre A.R. Fraser et al. // *Arthritis Res. Ther.* – 2006. – Vol. 8, № 1. – P. R15.

250. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway / F. Niyonsaba, K. Iwabuchi, H. Matsuda et al. // *Int. Immunol.* – 2002. – Vol. 14. – P. 421–426.

251. Espinel-Ingroff, A. *Encyclopedia of Microbiology*, 3rd ed.; M. Schaechter, Academic Press: Cambridge, MA, USA. – 2009. – 222 p.

252. Evaluation of nasal fluid  $\beta$ -defensin 2 levels in children with allergic rhinitis / F. Dilek, Ö. Emin, B. Gültepe et al. // *Turk. Pediatr. Ars.* – 2017. – Vol. 52. – P. 79–84.

253. Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta- defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells / F.

Niyonsaba, A. Someya, M. Hirata et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2001. – Vol. 31. – P. 1066–1075.

254. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophylic derivatives of N-acetylglucosaminy-N-acetylmuramyl peptides / E. Meshcheryakova, E. Makarov, D. Philpott et al. // *Vaccine.* – 2007. – Vol. 25. – P. 4515-20.

255. Evidence that changes in antimicrobial peptides during tuberculosis are related to disease severity, clinical presentation, specific therapy and levels of immune-endocrine mediators / B. Bongiovanni, S. Marín-Luevano, L. D’Attilio et al. // *Cytokine.* – 2020. – Vol. 126. – P. 154913.

256. Evolution of the C-type lectin-like receptor genes of the DECTIN-1 cluster in the NK gene complex / S. Sattler, H. Ghadially, E. Hofer et al. // *Scientific World Journal.* – 2012. – Vol. 2012. – 931386.

257. Evolutionary perspective on the hematopoietic system through a colonial chordate: Allogeneic immunity and hematopoiesis / B. Rosental, T. Raveh, A. Voskoboynik et al. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2020. – Vol. 62. – 91.

258. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK) / C. Rodrigues, E. Machado, H. Ramos et al. // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – Vol. 304. – P. 1100–1108.

259. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches / A. Ikram, T. Zaheer, F.M. Awan et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 16107. doi: 10.1038/s41598-018-34254-5.

260. Expression of antimicrobial defensins in the male reproductive tract of rats, mice, and humans / E. Com, F. Bourgeon, B. Evrard, et al. // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol. 68. – P. 95–104.

261. Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells / M. Frye, J. Bargon, N. Dauletbaev, et al. // *J. Clin. Pathol.* – 2000. – Vol. 53. – P. 770–773.

262. Failure to detect muramic acid in normal rat tissues but detection in cerebrospinal fluids from patients with Pneumococcal meningitis / M.P. Kozar, M.T. Krahmer, A. Fox et al. // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 4688–4698. doi: 10.1128/IAI.68.8.4688-4698.2000.

263. Faurschou, M. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation / M. Faurschou, N. Borregaard // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5. – P. 1317–1327.

264. Feuille, E.J. Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age / E.J. Feuille, A. Nowak-Wegrzyn // *J. Pediatrics.* – 2012. – Vol. 130. – P. S47–S48.

265. Flexible Signaling of Myeloid C-Type Lectin Receptors in Immunity and Inflammation / C. Del Fresno, S. Iborra, P. Saz-Leal, et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 804.

266. Fox, A. Muramic acid detection in mammalian tissues by gas-liquid chromatography-mass spectrometry / A. Fox, J.H. Schwab, T. Cochran // *Infect. Immun.* – 1980, – Vol. 29. – P. 526–531.

267. Fox, A. Rapid elimination of a synthetic adjuvant peptide from the circulation after systemic administration and absence of detectable natural muramyl peptides in normal serum at current analytical limits / A. Fox, K. Fox // *Infect. Immun.* – 1991. – Vol. 59. – P. 1202–1205.

268. Fraser-Smith, E.B. Correlation between in vivo anti-*Pseudomonas* and anti-*Candida* activities and clearance of carbon by the reticuloendothelial system for various muramyl dipeptide analogs, using normal and immunosuppressed mice / E.B. Fraser-Smith, R.V. Waters, T.R. Matthews // *Infect. Immun.* – 1982. – Vol. 35. – P. 105–110.

269. Fraser-Smith, E.B. Protective effect of muramyl dipeptide analogs against infections of *Pseudomonas aeruginosa* or *Candida albicans* in mice / E. B. Fraser-Smith, T. R. Matthews // *Infect. Immun.* – 1981. – Vol. 34. – P. 676–683.

270. Froy, O. Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signaling pathways / O. Froy // *Cell Microbiol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 1387–1397.

271. Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense / L. Franchi, N. Warner, K. Viani, et al. // *Immunol Rev.* – 2009. – Vol. 227. – P. 106–128.
272. Functional characterization of the N-acetylmuramyl-l-alanine amidase, *ami1*, from *Mycobacterium abscessus* / T. Küssau, N. Van Wyk, M.D. Johansen et al. // *Cells* – 2020 – Vol. 9. – P. 2410.
273. Functional interaction of human neutrophil peptide-1 with the cell wall precursor lipid II / E. de Leeuw, C. Li, P. Zeng, et al. // *FEBS Lett.* – 2010. – Vol. 584. – P. 1543–1548.
274. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing / B. Johansson-Lindbom, M. Svensson, O. Pabst et al. // *J. Exp. Med.* – 2005. – Vol. № 8. – P. 1063–73. doi: 10.1084/jem.20051100.
275. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization / T.L. Denning, B.A. Norris, O. Medina-Contreras et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187, № 2. – P. 733–747.
276. Fungal allergens induce cathelicidin LL-37 expression in chronic rhinosinusitis patients in a nasal explant model / E.H. Ooi, P.J. Wormald, A.S. Carney et al. // *Am. J. Rhinol.* – 2007. – Vol. 21. – P. 367–372.
277. Ganguly, K. Interplay between C-type lectin receptors and microRNAs in cellular homeostasis and immune response / K. Ganguly, U. Kishore, T. Madan // *FEBS J.* – 2021.– Vol. 288, № 14. – P. 4210–4229.
278. Ganz, T. Antimicrobial peptides of leukocytes / T. Ganz, R.I. Lehrer // *Curr. Opin. Hematol.* – 1997. – Vol. 4. – P. 53–61.
279. Garcia-Peñarrubia, P. Experimental and theoretical kinetics study of antibacterial killing mediated by human natural killer cells / P. Garcia-Peñarrubia, A.D. Bankhurst, F.T. Koster // *J. Immunol.* – 1989. – Vol. 142. – P. 1310–1317.
280. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: A systematic analysis

for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396. – P. 1204–1222.

281. Geijtenbeek, T.B. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses / T.B. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis // *Nat Rev Immunol*. – 2009. – Vol. 9, № 7. – P. 465-479.

282. Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM) / M. Sonthi, F. Cantet, M. Toubiana et al. // *Fish Shellfish Immunol*. – 2012. – Vol. 32. – P. 45–50.

283. Gene expression, immunolocalization, and secretion of human defensin-5 in human female reproductive tract / A.J. Quayle, E.M. Porter, A.A. Nussbaum et al. // *Am. J. Pathol*. – 1998. – Vol. 152. – P. 1247–1258.

284. Genes encoding putative natural killer cell C-type lectin receptors in teleostean fishes / A. Sato, W.E. Mayer, P. Overath et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2003. – Vol. 100. – P. 7779–7784.

285. Genetic variants of human beta-defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease / I. Matsushita, K. Hasegawa, K. Nakata et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2002. – Vol. 291. – P. 17–22.

286. Gennaro, R. Purification, composition, and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils / R. Gennaro, B. Skerlavaj, D. Romeo // *Infect. Immun*. – 1989. – Vol. 57. – P. 3142–3146.

287. Giuliani, A. Antimicrobial peptides: The LPS connection / A. Giuliani, G. Pirri, A.C. Rinaldi // *Methods Mol. Biol*. – 2010. – Vol. 618. – P. 137–154.

288. Goldman, W.E. Detection, isolation, and analysis of a released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured tracheal cells / W.E. Goldman, D.G. Klapper, J.B. Baseman // *Infect. Immun*. – 1982. – Vol. 36. – P. 782–794.

289. Goodacre, R. Metabolomics of a superorganism / R. Goodacre // *J. Nutr*. – 2007. – Vol. 137. – P. 259S–266S.

290. Goodell, E. W. Recycling of murein by *Escherichia coli* / E. W. Goodell // *J. Bacteriol*. – 1985. – Vol. 163. – P. 305–310.

291. Gough, M. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents / M. Gough, R.E. Hancock, N.M. Kelly // *Infect. Immun.* – 1996. – Vol. 64. – P. 4922–4927.
292. Gp29 LysA of mycobacteriophage TM4 can hydrolyze peptidoglycan through an N-acetyl-muramoyl-L-alanine amidase activity / E. Urdániz, M. Martín, F. Payaslián et al. // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* – 2022. – Vol. 1870. – 140745.
293. Gupta, R. Bacterial agonist of innate immunity LPS regulates spontaneous and induced production of alpha defensins of human neutrophils in vitro / R. Gupta, S. Sharma // *Indian J. Med. Res.* – 2022. – Vol. 156, № 3. – P. 464-477.
294. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization / G.P. Donaldson, M.S. Ladinsky, K.B. Yu et al. // *Science.* – 2018. – Vol. 360. – P. 795–800.
295. Gut microbiota-stimulated innate lymphoid cells support  $\beta$ -defensin 14 expression in pancreatic endocrine cells, preventing autoimmune diabetes / M. Miani, J. Le Naour, E. Waeckel-Enée et al. // *Cell. Metab.* – 2018. – Vol. 28. – P. 557–572. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.012.
296. Gut-Lung Microbiota in Chronic Pulmonary Diseases: Evolution, Pathogenesis, and Therapeutics / C. Y. Shi, C. H. Yu, W. Y. Yu et al. // *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* – 2021. – Vol. 2021. – 9278441.
297. Halasi, M. Thiazole antibiotics against breast cancer / M. Halasi, H. Zhao, H. Dahari et al. // *Cell Cycle.* – 2010. – Vol. 9. – P. 1214–1217.
298. Hallem, E.A. Receptor-type guanylate cyclase is required for carbon dioxide sensation by *Caenorhabditis elegans* / E.A. Hallem, W.C. Spencer, R.D. McWhirter et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – Vol. 108. – P. 254–259.
299. Hamayuni, R.A. Postbiotics: a new strategy for the treatment of food allergies / R.A. Hamayuni, L. Agebati Maleki, H. Samadi Kafel et al. // *Reverend Food Sci. Interior.* – 2020. – Vol. 1. – P. 1–8.
300. Hammami, R. Current trend in antimicrobial agent research: Chemo- and bioinformatics approaches / R. Hammami, I. Fliss // *Drug Discov. Today.* – 2010. – Vol. 15. – P. 540–546.

301. Hancock, R.E. Peptide antibiotics / R.E. Hancock, D.S. Chapple // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 1317–1323.
302. Hannun, Y.A. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids / Y.A. Hannun, L.M. Obeid // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2008. – Vol. 9. – P. 139–150.
303. Hepatic drug-metabolizing enzyme system and endotoxin tolerance: structural requirement of LPS in induction of an early tolerance / K. Egawa, M. Yoshida, R. Sakaino, et al. // *Microbiol Immunol.* – 1984. – Vol. 28, № 11. – P. 1181–1190.
304. Higher immunoadjuvant activities of N-acetyl-beta-D-glucosaminyl-(1-4)-N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine in comparison with N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine / M. Tsujimoto, F. Kinoshita, T. Okunaga et al. // *Microbiol Immunol.* – 1979. – Vol. 23. – P. 933–936.
305. Hildemann, W.H. Immunocompetence in the lowest metazoan phylum: transplantation immunity in sponges / W.H. Hildemann, I.S. Johnson, P.L. Jokiel // *Science.* – 1979. – Vol. 204. – P. 420–2.
306. Hirsch, J.G. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes / J. G. Hirsch // *J. Exp. Med.* – 1956. – Vol. 103. – P. 589–611.
307. HNP-1 and HBD-1 as Biomarkers for the Immune Systems of Elite Basketball Athletes / R. Pero, M. Brancaccio, C. Mennitti et al. // *Antibiotics (Basel).* – 2020. – Vol. 9. – 306.
308. Holly, M.K. Defensins in Viral Infection and Pathogenesis / M.K. Holly, K. Diaz, J.G. Smith // *Annu. Rev. Virol.* – 2017. – Vol. 4. – P. 369–391.
309. Holt, P.G. Key factors in the development of asthma: Atopy / P.G. Holt // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2000. – Vol. 161. – P. S172–S175.
310. Hong, J. Experimental induction of bacterial resistance to the antimicrobial peptide tachyplesin I and investigation of the resistance mechanisms / J. Hong, J. Hu, F. Ke // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – P. 6067–6075.

311. Hooper, L.V. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota / L.V. Hooper, A.J. Macpherson // *Nature Rev. Immunol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 159–169.
312. Host defense (Antimicrobial) peptide, human beta-defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes / C. Kiatsurayanon, F. Niyonsaba, R. Smithrithee et al. // *J. Investig. Dermatol.* – 2014. – Vol. 134. – P. 2163–2173.
313. Hotaling, S. Toward a genome sequence for every animal: Where are we now? / S. Hotaling, J. L. Kelley, P. B. Frandsen // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2021. – Vol. 118, № 52. – e2109019118.
314. Huang, C.M. Magainin analogs effective against pathogenic protozoa / C. M. Huang, H. C. Chen, C. H. Zierdt // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1990. – Vol. 34. – P. 1824–1826.
315. Huang, H. W. Understanding membrane-active antimicrobial peptides / H. W. Huang, N. E. Charron // *Q. Rev. Biophys.* – 2017. – Vol. 50. – P. e10.
316. Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2 / J. Röhl, D. Yang, J.J. Oppenheim et al. // *J. Immunol.* – 2010. – Vol. 184. – P. 6688–6694.
317. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells / M. Boniotto, W. J. Jordan, J. Eskdale et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50. – P. 1433–1441.
318. Human beta-defensin 3 has immunosuppressive activity in vitro and in vivo / F. Semple, S. Webb, H. N. Li et al. // *Eur. J. Immunol.* – 2010. – Vol. 40. – P. 1073–1078.
319. Human beta-defensin-1 rs2738047 polymorphism is associated with shisha smoking risk among Saudi population / M. Almutairi, B. Almutairi, M. Almutairi et al. // *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* – 2021. – Vol. 28. – P. 42916–42933.
320. Human beta-defensins / M. Pazgier, D. M. Hoover, D. Yang, et al. // *Cell Mol. Life Sci.* – 2006. – Vol. 63. – P. 1294–1313.

321. Human cathelicidin CAP18/LL-37 changes mast cell function toward innate immunity / M. Yoshioka, N. Fukuishi, Y. Kubo et al. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2008. – Vol. 31. – P. 212–216.

322. Human corneal epithelial cells produce antimicrobial peptides LL-37 and  $\beta$ -defensins in response to heat-killed *Candida albicans* / X. Hua, X. Yuan, X. Tang et al. // *Ophthalmic Res.* – 2014. – Vol. 51. – P. 179–186.

323. Human  $\alpha$ -defensin 3 induces STAT1 phosphorylation, tyrosine phosphatase activity, and cytokine synthesis in T cells / J.P. Meisch, R.M. Vogel, D.M. Schlatzer et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2013. – Vol. 94. – P. 459–471.

324. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91 / P. Presicce, S. Giannelli, A. Taddeo et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 86. – P. 941–948.

325. Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication / M.E. Quiñones-Mateu, M.M. Lederman, Z. Feng et al. // *AIDS.* – 2003. – Vol. 17. – P. F39–F48.

326. Human Miscarriage Is Associated With Dysregulations in Peripheral Blood-Derived Myeloid Dendritic Cell Subsets / S. Ehrentraut, K. Sauss, R. Neumeister et al. // *Front. Immunol.* – 2019 – Vol. 10. – 2440.

327. Human neutrophil peptide-1 inhibits both the classical and the lectin pathway of complement activation / T.W. Groeneveld, T.H. Ramwadhoebé, L.A. Trouw, et al. // *Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 44. – P. 3608–3614.

328. Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases / K. Quinn, M. Henriques, T. Parker et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2008. – Vol. 295, № 5. – P. H1817–H1824.

329. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system / A.L. Kau, P. P. Ahern, N.W. Griffin et al. // *Nature.* – 2011. – Vol. 474, № 7351. – P. 327–336. doi: 10.1038/nature10213.

330. Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut / R.R. Bollinger, M.L. Everett, D. Palestrant et al. // *Immunology*. – 2003. – Vol. 109. – P. 580–587.
331. Human  $\beta$ -Defensin 2 Mutations Are Associated With Asthma and Atopy in Children and Its Application Prevents Atopic Asthma in a Mouse Model / N.S. Borchers, E. Santos-Valente, A.A. Toncheva et al. // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – 636061.
332. Human  $\beta$ -defensin 2 plays a regulatory role in innate antiviral immunity and is capable of potentiating the induction of antigen-specific immunity / J. Kim, Y.L. Yang, S.H. Jang // *Viol. J.* – 2018. – Vol. 15. – P. 124. doi: 10.1186/s12985-018-1035-2.
333. Human  $\beta$ -defensin-2 enhances IFN- $\gamma$  and IL-10 production and suppresses IL-17 production in T cells / N. Kanda, M. Kamata, Y. Tada et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2011. – Vol. 89. – P. 935–944.
334. Human  $\beta$ -defensin-2 suppresses key features of asthma in murine models of allergic airways disease / J.W. Pinkerton, R.Y. Kim, L. Koeninger et al. // *Clin. Exp. Allergy*. – 2021. – Vol. 51. – P. 120–131.
335. Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway / A.A. Khine, L. Del Sorbo, R. Vaschetto et al. // *Blood*. – 2006. – Vol. 107. – P. 2936–2942.
336. Identification and bioactivity analysis of a newly identified defensin from the oyster *Magallana gigas* / Y. Zhang, P. Cui, Y. Wang et al. // *Dev. Comp. Immunol.* – 2018. – Vol. 85. – P. 177–187.
337. Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction / J.R. García, F. Jaumann, S. Schulz, et al. // *Cell Tissue Res.* – 2001. – Vol. 306. – P. 257–264.
338. Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome / F. Martinon, L. Agostini, E. Meylan et al. // *Curr Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 1929-1934.

339. Identification of multiple novel epididymis-specific beta defensin isoforms in human and mice / Y. Yamaguchi, T. Nagase, R. Makita et al. // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 169. – P. 2516–2523.

340. Identification of Thiostrepton as a Novel Inhibitor for Psoriasis-like Inflammation Induced by TLR7–9 / C. -Y. Lai, D. -W. Yeh, C. -H. Lu et al. // *Mol. Nutr. Food Res.* – 2007. – Vol. 51. – 3912–3921.

341. IMG-ABCv.5.0, An update to the IMG/Atlas of Biosynthetic Gene Clusters Knowledgebase / K. Palaniappan, I.A. Chen, K. Chu et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – Vol. 48. – P. D422–D430.

342. ImmTher, a lipophilic disaccharide derivative of muramyl dipeptide, up-regulates specific monocyte cytokine genes and activates monocyte-mediated tumoricidal activity / L.L. Worth, S.F. Jia, T. An et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* – 1999. – Vol. 48, № 6. – P. 312–320.

343. Immunoadjuvant activities of cell walls, their water-soluble fractions and peptidoglycan subunits, prepared from various gram-positive bacteria, and of synthetic N-acetylmuramyl peptides / S. Kotani, Y. Watanabe, T. Shimono et al. // *Z Immunitätsforsch.* – 1975. – Vol. 1498. – P. 302-319.

344. Immunobiology of dendritic cells / J. Banchereau, F. Briere, C. Caux et al. // *Annual Review of Immunology.* – 2000. – Vol. 18. – P. 767–811.

345. Immuno-Informatics Analysis of Pakistan-Based HCV Subtype-3a for Chimeric Polypeptide Vaccine Design / S. Ahmad, F. Shahid, M. Tahir Ul Qamar et al. // *Vaccines.* – 2021. – Vol. 9. – P. 293.

346. Immunological Aspects of SARS-CoV-2 Infection and the Putative Beneficial Role of Vitamin-D / M.-Y. Peng, W.-C. Liu, J.-Q. Zheng et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – 5251.

347. Immunomodulatory drugs activate NK cells via both Zap-70 and cereblon-dependent pathways / T. Hideshima, D. Ogiya, J. Liu, et al. // *Leukemia.* – 2021. – Vol. 35, № 1. – P. 177–188.

348. Immunomodulatory efficacy of nisin - a bacterial lantibiotic peptide / D. Begde, S. Bundale, P. Mashitha et al. // *J. Pept. Sci.* – 2011. – Vol. 6. – P. – 438-444.

349. Immunomodulatory potential of four candidate probiotic *Lactobacillus* strains from plant and animal origin using comparative genomic analysis / P.B.U. Salvador, L.M.M. Dalmacio, S.H. Kim et al. // *Access Microbiol.* – 2021. – Vol. 3. – P. 000299.
350. Immunoregulatory effect of human  $\beta$ -defensin 1 on neonatal cord blood monocyte-derived dendritic cells and T cells / J. Wu, R.L. Gong, Q.F. Hu et al. // *Mol. Immunol.* – 2019. – Vol. 109. – P. 99–107.
351. Immunotherapy for Bone and Soft Tissue Sarcomas / T. Uehara, T. Fujiwara, K. Takeda et al. // *Biomed Res Int.* – 2015. – Vol. 15. – 820813.
352. In vitro immunomodulatory effect of nisin on porcine leucocytes / J. Małaczewska, E. Kaczorek-Lukowska, R. Wójcik et al. // *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* – 2019. – Vol. 103. – P. 882–893.
353. In vitro study of antitumor effect of antimicrobial peptide tachyplesin I in combination with cisplatin / D.V. Kuzmin, A.A. Emel'yanova, M.B. Kalashnikova et al. // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2018. – Vol. 165. – P. 220–224.
354. Increasing rate of hospitalizations for food-induced anaphylaxis in Italian children: An analysis of the Italian Ministry of Health database / R. Nocerino, L. Leone, L. Cosenza et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015. – Vol. 135. – P. 833–835.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.1912.
355. Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node / G. Hintzen, L. Ohl, M.L. del Rio et al. // *J. Immunol.* – 2006. – Vol. 177. – P. 7346–7354.
356. Inference of significant microbial interactions from longitudinal metagenomics data / X. Gao, B.-T. Huynh, D. Guillemot et al. // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – 2319.
357. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils / M. Wahle, T.C. Greulich, G. Baerwald et al. // *Immunobiology.* – 2005. – Vol. 20, № 1. – P. 43–52.

358. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria / E. Yang, L. Fan, J. Yan et al. // *Amb. Express.* – 2018. – Vol. 68. – P. 10–14.
359. Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics / H. Hanchi, R. Hammami, H. Gingras et al. // *Future Microbiol.* – 2017. – Vol. 12. – P. 205–212.
360. Injury-induced immune responses in Hydra / Y. Wenger, W. Buzgariu, S. Reiter et al. // *Semin Immunol.* – 2014. – Vol. 26, Issue 4. – P. 277–294.
361. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective / S.W. Brubaker, K.S. Bonham, I. Zanoni et al. // *Annu Rev Immunol.* – 2015. – Vol. 33. – P. 257–290.
362. Innate immunity and asthma risk in Amish and Hutterite farm children / M. M. Stein, C.L. Hrusch, J. Gozdz et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375. – P. 411–421.
363. Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies / R.R. Bonelli, T. Schneider, H.G. Sahl et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50. – P. 1449–1457.
364. Insights into the innate immunome of actinarians using a comparative genomic approach / C.A. van der Burg, P.J. Prentis, J.M. Surm et al. // *BMC Genomics.* – 2016. – Vol. 17. – P. 850.
365. Interleukin-13-mediated Paneth cell degranulation and antimicrobial peptide release / S. Stockinger, T. Albers, C.U. Duerr et al. // *J. Innate Immun.* – 2014. – Vol. 6. – P. 530–541.
366. Interplay between gut microbiota and antimicrobial peptides / X. Zong, J. Fu, B. Xu et al. // *Animal nutrition (Zhongguo xu mu shou yi xue hui).* – 2020. – Vol. 6, № 4. – P. 389–396. doi: 10.1016/j.aninu.2020.09.002.
367. Invernizzi, R. Respiratory microbiome and epithelial interactions shape immunity in the lungs / R. Invernizzi, M. C. Lloyd, P. L. Molyneaux // *Immunology* – 2020. – Vol. 160. – P. 171–182.

368. Irazoki, O. Peptidoglycan muropeptides: Release, perception, and functions as signaling molecules / O. Irazoki, S. B. Hernandez, F. Cava // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 500.
369. Ishikawa, M. Purification and characterization of a dipterin homologue from *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) / M. Ishikawa, T. Kubo, S. Natori // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 287. – P. 573–578.
370. Islam, S.T. The mysterious nature of bacterial surface (gliding) motility: a focal adhesion-based mechanism in *Myxococcus xanthus* / S.T. Islam, T. Mignot // *Semin Cell Dev Biol.* – 2015. – Vol. 46. – P. 143–154. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.033.
371. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotics / C. Heip, H. Hummel, P. van Avesaath et al. // *Marine Biodiversity and Ecosystem Functioning*. Printbase: Dublin, Ireland. – 2009. – 289 p.
372. Isolation and selection of potential probiotic bacteria from the pig gastrointestinal tract / L.L. Verso, M. Lessard, G. Talbot et al. // *Probiot Antimicrob Proteins.* – 2018. – Vol. 10. – P. 299–312.
373. Isolation and structure of corticostatin peptides from rabbit fetal and adult lung / Q.Z. Zhu, J. Hu, S. Mulay et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – Vol. 85. – P. 592–596.
374. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach / K. A. Ryan, T. Jayaraman, P. Daly et al. // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – Vol. 47, № 5. – P. 269– 274.
375. Isolation of tuberculin active peptides from cell wall fraction of human tubercle bacillus strain Aoyama B / I. Azuma, Y. Yamamura, T. Tahara et al. // *Jpn. J. Microbiol.* – 1969. – Vol. 13, № 2. – P. 220-2.
376. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases / A.C. Fogaça, I.C. Almeida, M.N. Eberlin, et al. // *Peptides.* – 2006. – Vol. 27. – P. 667–674.

377. Jain, V. Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives / V. Jain, S. P. Vyas, D. V. Kohli // *Nanomedicine*. – 2009. – Vol. 5, № 3. – P. 334-44.

378. Jakopin, Ž. Murabutide revisited: a review of its pleiotropic biological effects / Ž. Jakopin // *Curr Med Chem*. – 2013. – Vol. 20, № 16. – P. 2068-79. doi: 10.2174/0929867311320160002.

379. Ji, X. Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization / X. Ji // *J Gen Virol*. – 2005. – Vol. 86. – P. 2535-2542.

380. Jiang, S. Biomarkers of An Autoimmune Skin Disease–Psoriasis / S. Jiang, T. E. Hinchliffe, T. Wu // *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* – 2015. – Vol. 13, № 4. – P. 224–233.

381. Jin, T. Staphylococcus aureus resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism / T. Jin, M. Bokarewa, T. Foster // *J. Immunol*. – 2004. – Vol. 172. – P. 1169–1176.

382. JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity / C. Li, B. Ge, M. Nicotra et al. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105, № 8. – P. 3017–22. doi: 10.1073/pnas.0712310105.

383. Kalia, N. The ambiguous role of mannose-binding lectin (MBL) in human immunity / N. Kalia, J. Singh, M. Kaur // *Open Med. (Wars)*. – 2021. – Vol. 16(1), P. 299-310.

384. Kalsy, M. The insect antimicrobial peptide cecropin A disrupts uropathogenic Escherichia coli biofilms / M. Kalsy, M. Tonk, M. Hardt // *Npj Biofilms Microbiomes*. – 2020. – Vol. 6. – P. 6.

385. Karimi, M. Effect of Preconditioned Mesenchymal Stem Cells with Nisin Prebiotic on the Expression of Wound Healing Factors Such as TGF- $\beta$ 1, FGF-2, IL-1, IL-6, and IL-10 / M. Karimi, Z. Maghsoud, R. Halabian // *Regen. Eng. Transl. Med*. – 2021 – № 7. – P. 30-40.

386. Karpiński, T.M. Characteristic of bacteriocines and their application / T.M. Karpiński, A.K. Szkaradkiewicz // *Pol. J. Microbiol.* – 2013. – Vol. 62. – P. 223–235.
387. Khaitov, R.M. Immunotherapy of infectious postoperative complications using a new immunostimulant glycopin / R.M. Khaitov, B.V. Pinegin, A.A. Butakov // *Immunology.* – 1994. – Vol. 2. – P. 47–50.
388. Klotman, M.E. Defensins in innate antiviral immunity / M.E. Klotman, T.L. Chang // *Nat. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 6. – P. 447–456. doi: 10.1038/nri1860.
389. Kozar, M. P. Muramic acid is not generally present in the human spleen as determined by gas chromatography-tandem mass spectrometry / M. P. Kozar, J. D. Laman, A. Fox // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – P. 741–748. doi: 10.1128/IAI.70.2.741-748.2002.
390. Kroczek, R.A. The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells / R.A. Kroczek, V. Henn // *Frontiers in Immunology* – 2012. – Vol. 3. – P. 14. doi: 10.3389/fimmu.2012.00014.
391. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses / T.L. Denning, Y.C. Wang, S.R. Patel et al. // *Nat. Immunol.* – 2007. – Vol. 8. – P. 1086–1094.
392. Lax, S. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections / S. Lax, J. A. Gilbert // *Trends Mol. Med.* – 2015. – Vol. 21, № 7. – P. 427–32.
393. Lazzaro, B.P. Antimicrobial peptides: Application informed by evolution / B. P. Lazzaro, M. Zasloff, J. Rolff // *Science.* – 2020. – Vol. 368. – eaau5480. doi: 10.1126/science.aau5480.
394. Lederberg, J. Infectious history / J. Lederberg // *Science.* – 2000. – Vol. 288, № 5464. – P. 287–93.
395. Lederer, E. Synthetic muramyl peptides / E. Lederer // *Science.* – 1982. – Vol. 218, № 4570. – P. 330.
396. Lee, I.H. Styelins, broad-spectrum antimicrobial peptides from the solitary tunicate, *Styela clava* / I.H. Lee, Y. Cho, R.I. Lehrer // *Comp. Biochem. Physiol. B*

Biochem. Mol. Biol. – 1997. – Vol. 118. – P. 515–521. doi: 10.1016/s0305-0491(97)00109-0.

397. Lehrer, R.I. Defensins of vertebrate animals / R. I. Lehrer, T. Ganz // *Curr. Opin. Immunol.* – 2002. – Vol. 14. – P. 96–102.

398. Lehrer, R.I. Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells / R. I. Lehrer, T. Ganz, M.E. Selsted // *Cell.* – 1991. – Vol. 64. – P. 229–230. doi: 10.1016/0092-8674(91)90632-9.

399. Lehrer, R.I. Theta-Defensins: Cyclic peptides with endless potential / R.I. Lehrer, A.M. Cole, M.E. Selsted // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 27014–27019. doi: 10.1074/jbc.R112.346098.

400. Leifer, C. A. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling / C. A. Leifer, A. E. Medvedev // *J. Leukoc. Biol.* – 2016. – Vol. 100. – P. 927–941.

401. Leippe, M. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica* / M. Leippe, J. Andrä, H. J. Müller-Eberhard // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – Vol. 91. – P. 2602–2606.

402. León, E. D. Roles of Secretory Immunoglobulin A in Host-Microbiota Interactions in the Gut Ecosystem / E. D. León, M. P. Francino // *Frontiers in microbiology.* – 2022. – Vol. 13. – P. 880484.

403. Lerminiaux, N.A. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N.A. Lerminiaux, A.D.S. Cameron // *Can. J. Microbiol.* – 2019. – Vol. 1. – P. 34–44.

404. Ley, R.E. Obesity alters gut microbial ecology / R.E. Ley // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 11070–5.

405. Leystra, A.A. Gut Microbiota Influences Experimental Outcomes in Mouse Models of Colorectal Cancer / A.A. Leystra, M.L. Clapper // *Genes.* – 2019. – Vol. 10, № 11. – P. 900.

406. Li, P. Roles of PRR-Mediated Signaling Pathways in the Regulation of Oxidative Stress and Inflammatory Diseases / P. Li, M. Chang // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 7688.

407. Lim, K. H. Toll-like receptor signaling / K.H. Lim, L.M. Staudt // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5. – P. a011247.

408. Livak, K.J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods (San Diego, Calif.)* – 2001. – Vol. 25, № 4. – P. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

409. LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils / Y. Zheng, F. Niyonsaba, H. Ushio et al. // *Br. J. Dermatol.* – 2007. – Vol. 157. – P. 1124–1131.

410. LL-37, HNP-1 and HBD2/3 modulate the secretion of cytokines TNF-alpha, IL-6, IFN-gamma, IL-10 and MMP1 in human primary cell cultures / C.E. Medina Santos, C.N. Lopez Hurtado, B. Rivas Santiago et al. // *Eur. Cytokine Netw.* – 2016. – Vol. 27, № 3. – P. 68–74.

411. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells / Y. De, Q. Chen, A. P. Schmidt, et al. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192. – P. 1069–1074.

412. L-MTP-PE and zoledronic acid combination in osteosarcoma: preclinical evidence of positive therapeutic combination for clinical transfer / K. Bibeau, R. Guiho, M. Chatelais et al. // *Am J Cancer Res.* – 2016. – Vol. 6, № 3. – P. 677-89.

413. Local and systemic effects of microbiome-derived metabolites / I. Spivak, L. Fluhr, E. Elinav, et al. // *EMBO reports.* – 2022. – Vol. 23, № 10. – e55664. doi: 10.15252/embr.202255664.

414. Localization of human neutrophil peptide (HNP) and its messenger RNA in neutrophil series / Y. Date, M. Nakazato, K. Shiomi, et al. // *Ann. Hematol.* – 1994. – Vol. 69. – P. 73–77.

415. Lohans, C.T. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents / C.T. Lohans, J.C. Vederas // *Int. J. Microbiol.* – 2012. – Vol. 12. – 386410. doi: 10.1155/2012/386410.
416. Lopez, R. Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae* / R. Lopez, E. Garcia, C. Ronda // *Rev. Infect. Dis.* – 1981. – Vol. 3. – P. 212–223. doi: 10.1093/clinids/3.2.212.
417. Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age / T.R. Abrahamsson, H.E. Jakobsson, A.F. Andersson et al. // *Clin. Exp. Allergy.* – 2014. – Vol. 44. – P. 842–850.
418. Low-dose endotoxin inhalation in healthy volunteers—a challenge model for early clinical drug development / O. Janssen, F. Schaumann, O. Holz et al. // *BMC Pulm Med.* – 2013. – Vol. 13. – P. 19.
419. Lung CD103+ dendritic cells efficiently transport influenza virus to the lymph node and load viral antigen onto MHC class I for presentation to CD8 T cells / A. W. Ho, N. Prabhu, R. J. Betts et al. // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – P. 6011–21.
420. Lupfer, C. Nucleotide oligomerization and binding domain 2-dependent dendritic cell activation is necessary for innate immunity and optimal CD8+ T cell responses to influenza A virus infection / C. Lupfer, P. G. Thomas, T. -D. Kanneganti // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88. – P. 8946–8955.
421. Ma, J. Y. Antimicrobial peptides: Bridging innate and adaptive immunity in the pathogenesis of psoriasis / J. Y. Ma, S. Shao, G. Wang // *Chin. Med. J.* – 2020. – Vol. 133. – P. 2966–2975.
422. Maio, M. Expression and functional role of CD54/Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) on human blood cells / M. Maio, L. Del Vecchio // *Leuk Lymphoma.* – 1992. – Vol. 8. – P. 23-33.
423. Major fragment of soluble peptidoglycan released from growing *Bordetella pertussis* is tracheal cytotoxin / R. S. Rosenthal, W. Nogami, B. T. Cookson et al. // *Infect. Immun.* – 1987. – Vol. 55. – P. 2117–2120.
424. Major, J. IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages / J. Major,

J.E. Fletcher, T. A. Hamilton // *J. Immunol.* – 2002. – Vol. 168, № 5. – P. 2456-63. doi: 10.4049/jimmunol.168.5.2456.

425. Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: lantibiotic nisin Z is selectively immunomodulatory / J. Kindrachuk, H. Jenssen, M. Elliott et al. // *Innate Immun.* – 2013. – Vol. 3. – P. 315-327.

426. Marine antimicrobial peptide arenicin adopts a monomeric twisted  $\beta$ -hairpin structure and forms low conductivity pores in zwitterionic lipid bilayers / S.V. Sychev, S.V. Sukhanov, P.V. Panteleev et al. // *Biopolymers.* – 2017. – Vol. 23. – 93. doi: 10.1002/bip.23093.

427. Marine Invertebrate Peptides: Antimicrobial Peptides / R. Wu, J. Patocka, E. Nepovimova et al. // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 785085. doi: 10.3389/fmicb.2021.785085.

428. Marino, F. Adrenergic modulation of immune cells: an update / F. Marino, M. Cosentino // *Amino Acids.* – 2013. – Vol. 45, № 1. – P. 55-71. doi: 10.1007/s00726-011-1186-6.

429. Martáñez, B. Antimicrobial susceptibility of nisin resistant *Listeria monocytogenes* of dairy origin / B. Martáñez, A. Rodráñez // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 252. – P. 67-72.

430. Maslowski, K. M. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43 / K.M. Maslowski // *Nature.* – 2009. – Vol. 461. – P. 1282–1286.

431. Mathé, G. Immunologic approaches to the treatment of leukemia: 1st results in man / G. Mathé, L. Schwarzenberg, J.L. Amiel // *Nouv Rev Fr Hematol.* – 1967. – Vol. 7. – P. 721-38.

432. Mattiuzzi, C. Worldwide asthma epidemiology: Insights from the Global Health Data Exchange database / C. Mattiuzzi, G. Lippi // *Int. Forum Allergy Rhinol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 75–80.

433. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family / P. Matzinger // *Annu Rev Immunol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 991–1045.

434. McDermott, A.M. The Role of Antimicrobial Peptides at the Ocular Surface / A.M. McDermott // *Ophthalmic Res.* – 2009. – Vol. 41. – P. 60–75. doi: 10.1159/000187622.
435. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells / Q. Feng, S. V. Hato, M. A. Langereis, et al. // *Cell Rep.* – 2012. – Vol. 2, № 5. – P. 1187-96.
436. MDP-induced interleukin-1beta processing requires Nod2 and CIAS1/NALP3 / Q. Pan, J. Mathison, C. Fearn et al. // *J Leukoc Biol.* – 2007. – Vol. 82. – P. 177–183.
437. MDP-NOD2 stimulation induces HNP-1 secretion, which contributes to NOD2 antibacterial function / J.K. Yamamoto-Furusho, N. Barnich, T. Hisamatsu et al. // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2010. – Vol. 16. – P. 736–42. doi: 10.1002/ibd.21144.
438. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* / M. Wu, E. Maier, R. Benz et al. // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38. – P. 7235–7242. doi: 10.1021/bi9826299.
439. Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins / J.W. Lillard, Jr., N. Boyaka, O. Chertov et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 651–656.
440. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens / A. Biragyn, M. Surenhu, D. Yang et al. // *J. Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – P. 6644–6653.
441. Medzhitov, R. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity / R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway // *Nature.* – 1997. – Vol. 388. – P. 394–397.
442. Membrane damage and repair in primary monocytes exposed to human  $\beta$ -defensin-3 / A. B. Lioi, A. L. Rodriguez, N. T. Funderburg et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2012. – Vol. 92. – P. 1083–1091.

443. Meta-GWAS and Meta-Analysis of Exome Array Studies Do Not Reveal Genetic Determinants of Serum Hepcidin / T. E. Galesloot, N. Verweij, M. Traglia, et al. // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11. – e0166628.

444. Metchnikowin, a novel immune-inducible proline-rich peptide from *Drosophila* with antibacterial and antifungal properties / E.A. Levashina, S. Ohresser, P. Bulet et al. // Eur. J. Biochem. – 1995. – Vol. 233. – P. 694–700.

445. Meunier, E. Evolutionary Convergence and Divergence in NLR Function and Structure / E. Meunier, P. Broz // Trends Immunol. – 2017. – Vol. 38, № 10. – P. 744–757.

446. Meyers, P. A. Muramyl tripeptide-phosphatidyl ethanolamine encapsulated in liposomes (L-MTP-PE) in the treatment of osteosarcoma / P.A. Meyers, A.J. Chou // Adv. Exp. Med. Biol. – 2014. – Vol. 804. – P. 307-321.

447. Meyers, P.A. Muramyl tripeptide (mifamurtide) for the treatment of osteosarcoma / P.A. Meyers // Expert Rev Anticancer Ther. – 2009. – Vol. 9, № 8. – P. 1035-49.

448. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring / S.A. Buffington, G.V.Di Prisco, T.A. Auchtung et al. // Cell. – 2016. – Vol. 165. – P. 1762–1775.

449. Microbial stimulation as an aetiologic factor in atopic disease / P.G. Holt, C. Macaubas, S.L. Prescott et al. // Allergy – 1999 – Vol. 54. – P. 12–16.

450. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations / C.A. Thaiss, M. Levy, T. Korem et al. // Cell. – 2016b. – Vol. 167. – P. 1495–1510. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.003.

451. Microbiota in health and diseases / K. Hou, Z. X. Wu, X. Y. Chen, et al. // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2022. – Vol. 7, № 1. – P. 135. doi: 10.1038/s41392-022-00974-4.

452. Microbiota is an essential element for mice to initiate a protective immunity against *Vaccinia* virus / M. T. Lima, A. C. S. P. Andrade, G. P. Oliveira et al. // FEMS Microbiology Ecology. – 2016. – Vol. 92, № 2. – P. fiv147. doi: 10.1093/femsec/fiv147.

453. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria / S. Duquesne, D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi et al. // *Nat. Prod. Rep.* – 2007. – Vol. 24. – P. 708–734
454. Midoro-Horiuti, T. Pathogenesis-related proteins of plants as allergens / T. Midoro-Horiuti, E.G. Brooks, R.M. Goldblum // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2001. – Vol. 87. – P. 261–271.
455. Mifamurtide (L-MTP-PE) for High-Risk Osteosarcoma / *ClinicalTrials.gov*. A service of the U.S. National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00631631?term=muramyl&rank=1>
456. Mifamurtide: CGP 19835, CGP 19835A, L-MTP-PE, liposomal MTP-PE, MLV 19835A, MTP-PE, muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine / *Drugs in R&D.* – 2008. – Vol. 9, № 2. – P. 131–135.
457. Migration of Bacteriocins Across Gastrointestinal Epithelial and Vascular Endothelial Cells, as Determined Using In Vitro Simulations / L. Dreyer, C. Smith, S. M. Deane et al. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9. – P. 11481.
458. Mincle is an ITAM-coupled activating receptor that senses damaged cells / S. Yamasaki, E. Ishikawa, M. Sakuma et al. // *Nat Immunol.* – 2008. – Vol. 9, Issue 10. – P. 1179–1188.
459. Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives / F. Ellouz, A. Adam, R. Ciorbaru, et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1974. – Vol. 59, № 4. – P. 1317-1325.
460. Modulation of Human Complement System by Antimicrobial Peptide Arenicin-1 from *Arenicola marina* / E.S. Umnyakova, N.P. Gorbunov, A.V. Zhakhov et al. // *Mar. Drugs.* – 2018. – Vol. 16. – 480.
461. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis associated colorectal cancer susceptibility / J.M. Uronis, M. Muhlbauer, H.H. Herfarth et al. // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4. – e6026.
462. Molecular characterization of Dau c 1, the Bet v 1 homologous protein from carrot and its cross-reactivity with Bet v 1 and Api g 1 / K. Hoffmann-

Sommergruber, G.O'Riordain, H. Ahorn, et al. // *Clin. Exp. Allergy*. – 1999. – Vol. 29. – P. 840–847.

463. Molecular dynamics simulations and functional studies reveal that hBD-2 binds SARS-CoV-2 spike RBD and blocks viral entry into ACE2 expressing cells / L. Zhang, S.K. Ghosh, S.C. Basavarajappa, J. Muller-Greven et al. // *BioRxiv*. – 2021. – 5621.

464. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics / R.M. Epanand, C.Walker, R.F. Epanand et al. // *Biochim. Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1858. – P. 980–987.

465. Molecular regulation of dendritic cell development and function in homeostasis, inflammation, and cancer / T.T. Chrisikos, Y. Zhou, N. Slone et al. // *Mol. Immunol*. – 2019. – Vol. 110. – P. 24–39.

466. Mukherjee, K. Ancient origins of vertebrate-specific innate antiviral immunity / K. Mukherjee, B. Korithoski, B. Kolaczowski // *Mol. Biol. Evol*. – 2014. – Vol. 31. – P. 140–153.

467. Multifunctional antimicrobial proteins and peptides: Natural activators of immune systems / F. Niyonsaba, I. Nagaoka, H. Ogawa et al. // *Curr. Pharm. Des*. – 2009. – Vol. 15. – P. 2393–2413.

468. Munford, R. S. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? / R. S. Munford // *J Leukoc Biol*. – 2016. – Vol. 100, № 4. –P. 687-698.

469. Muramyl dipeptide activates human beta defensin 2 and pro-inflammatory mediators through Toll-like receptors and NLRP3 inflammasomes in human dental pulp cells / S.I. Lee, S.K. Kang, H.J. Jung et al. // *Clin Oral Investig*. – 2015. – Vol. 19, № 6. – P 1419-28.

470. Muramyl Dipeptide, a Shared Structural Motif of Peptidoglycans, Is a Novel Inducer of Bone Formation through Induction of Runx2 / O. J. Park, J. Kim, J. Yang et al. // *J Bone Miner Res*. – 2017. – Vol. 32, № 7. – P. 1455–1468. doi: 10.1002/jbmr.3137.

471. Muramyl peptides: Chemical structure, biological activity and mechanism of action / A. Adam, J.F. Petit, P. Lefrancier et al. // *Mol Cell Biochem.* – 1981. – Vol. 41. – P. 27-47.
472. Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri* / G. Nigro, L. L. Fazio, M. C. Martino et al. // *Cell. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 682–695.
473. Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge / G. Mitta, F. Vandebulcke, F. Hubert et al. // *J. Cell Sci.* – 1999. – Vol. 112. – P. 4233–4242.
474. Muth, S. M. Direct anticryptococcal activity of lymphocytes from *Cryptococcus neoformans*-immunized mice / S. M. Muth, J. W. Murphy // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63. – P. 1637–1644.
475. Myeloid C-type lectins in innate immunity / M. Robinson, D. Sancho, E. Slack et al. // *Nat Immunol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 1258–1265.
476. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis* / G. Mitta, F. Hubert, T. Noël et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 265. – P. 71–78.
477. *Mytilus galloprovincialis* myticin C: a chemotactic molecule with antiviral activity and immunoregulatory properties / P. Balseiro, A. Falcó, A. Romero, et al. // *PLoS One.* – 2011. – Vol. 6. – P. – e23140.
478. Natural Occurrence in Venomous Arthropods of Antimicrobial Peptides Active against Protozoan Parasites / E. F. Sabiá Júnior, L. F. S. Menezes, I. F. S. de Araújo et al. // *Toxins.* – 2019. – Vol. 11. – P. 563.
479. Neutralization of a clade B primary isolate by sera from human immunodeficiency virus-uninfected recipients of candidate AIDS vaccines / S. Zolla-Pazner, C. Alving, R. Belshe et al. // *J InfectDis.* – 1997. – Vol. 175, № 4. – P. 764-774.
480. Neutrophils: Many Ways to Die / E. Pérez-Figueroa, P. Álvarez-Carrasco, E. Ortega et al. // *Frontiers in immunology.* – 2021. – Vol. 12. – 631821. doi: 10.3389/fimmu.2021.631821.

481. Nisin probiotic prevents inflammatory bone loss while promoting reparative proliferation and a healthy microbiome / L. Gao, R. Kuraji, M.J. Zhang et al. // *NPJ Biofilms Microbiomes*. – 2022. – Vol. 8. – P. 45.
482. Niyonsaba, F. Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils / F. Niyonsaba, H. Ogawa // *Immunology*. – 2004. – Vol. 111. – P. 273–281.
483. Niyonsaba, F. The role of human  $\beta$ -defensins in allergic diseases / F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, H. Ogawa // *Clin. Exp. Allergy*. – 2016. – Vol. 46. – P. 1522–1530.
484. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry / L.H. Travassos, L.A. Carneiro, M. Ramjeet et al. // *Nat. Immunol.* – 2010. – Vol. 11. – P. 55–62.
485. NOD1 and NOD2 in inflammation, immunity and disease / T. Mukherjee, E. S. Hovingh, E. G. Foerster et al. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2019. – Vol. 670. – P. 69–81.
486. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan / S.E. Girardin, I.G. Boneca, L.A. Carneiro, et al. // *Science*. – 2003. – Vol. 300. – P. 1584–1587.
487. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection / S.E. Girardin, I.G. Boneca, J. Viala, et al. // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278. – P. 8869–8872.
488. NOD2 modulates immune tolerance via the GM-CSF-dependent generation of CD103+ dendritic cells / D. Prescott, C. Maisonneuve, J. Yadav et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2020. – Vol. 117. – P. 10946–10957.
489. NOD-like receptors: ancient sentinels of the innate immune system / P. Rosenstiel, G. Jacobs, A. Till et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – Vol. 65, № 9. – P. 1361–1377.
490. NOD-like receptors: versatile cytosolic sentinels / V. Motta, F. Soares, T. Sun et al. // *Physiol Rev*. – 2015. – Vol. 95, № 1. – P. 149–178.

491. Novel Amphibian Antimicrobial Peptide, Phylloseptin-PV1, Exhibits Effective Anti-staphylococcal Activity Without Inducing Either Hepatic or Renal Toxicity in Mice / Y. Liu, D. Shi, J. Wang et al. // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 565158.

492. Nyberg, P. 2-Macroglobulin-proteinase complexes protect *Streptococcus pyogenes* from killing by the antimicrobial peptide LL-37 / P. Nyberg, M. Rasmussen, L. Bjorck // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 52820–52823.

493. Oman, T. J. Insights into the mode of action of the two-peptide lantibiotic haloduracin / T. J. Oman, W. A. van der Donk // *ACS Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 4. – P. 865–874.

494. Onozuka, K. Augmentation of protective and antibacterial activity induced by muramyl dipeptides in CBA/N defective mice with X-linked immunodeficiency for *Salmonella enteritidis* infection / K. Onozuka, T. Saito-Taki, M. Nakano // *Infect. Immun.* – 1984. – Vol. 45. – P. 424–427.

495. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells / T. Worbs, U. Bode, S. Yan et al. // *J. Exp. Med.* – 2006. – Vol. 203. – P. 519–27.

496. OTULIN restricts Met1-linked ubiquitination to control innate immune signaling / B.K. Fiil, R.B. Damgaard, S.A. Wagner et al. // *Mol. Cell.* – 2013. – Vol. 50. – P. 818–830.

497. Ovchinnikova, T.V. Structure, Function, and Therapeutic Potential of Marine Bioactive Peptides / T.V. Ovchinnikova // *Mar. Drugs.* – 2019. – Vol. 17. – 505. doi: 10.3390/md17090505.

498. Pancreatic  $\beta$ -Cells Limit Autoimmune Diabetes via an Immunoregulatory Antimicrobial Peptide Expressed under the Influence of the Gut Microbiota / J. Sun, L. Furio, R. Mecheri et al. // *Immunity.* – 2015. – Vol. 43. – P. 304–317.

499. Panda, S. The deubiquitinase MYSM1 dampens NOD2-mediated inflammation and tissue damage by inactivating the RIP2 complex / S. Panda, N. O. Gekara // *Nat. Commun.* – 2018. – Vol. 9. – 4654.

500. Paneth cell extrusion and release of antimicrobial products is directly controlled by immune cell-derived IFN-gamma / H. F. Farin, W.R. Karthaus, P. Kujala et al. // *J. Exp. Med.* – 2014. – Vol. 211. – P. 1393–1405.

501. Pannexin-1-mediated intracellular delivery of muramyl dipeptide induces caspase-1 activation via cryopyrin/NLRP3 independently of Nod2 / N. Marina-García, L. Franchi, Y.G. Kim et al. // *J. Immunol.* – 2008. – Vol. 180. – P. 4050–4057. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.4050.

502. Parant, M. Fate of the synthetic immunoadjuvant, muramyl dipeptide (14C-labelled) in the mouse / M. Parant, F. Parant, L. Chedid // *Int. J. Immunopharmacol.* – 1979. – Vol. 1. – P. 35-41.

503. Parant, M. Influence of synthetic adjuvants on nonspecific resistance to infections / M. Parant // *Int J Immunopharmacol.* – 1994. – Vol. 16, № 5-6. – P. 445–449.

504. Park, C. B. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: Buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions / C. B. Park, H. S. Kim, S. C. Kim // *Biochem. Biophys. Res Commun.* – 1998. – Vol. 244. – P. 253–257.

505. Park, J.T. Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*: Indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus / J.T. Park // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175. – P. 7–11.

506. Park, J.W. *Insect Immunology* / J.W. Park, B.L. Lee // In: *Insect Molecular Biology and Biochemistry*; Gilbert, L., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA. – 2012. – 574 p.

507. Paro, S. Sensing viral RNAs by Dicer/RIG-I like ATPases across species / S. Paro, J.L. Imler, C. Meignin // *Curr. Opin. Immunol.* – 2015. – Vol. 32. – P. 106–113.

508. Partial deletion of chromosome 8  $\beta$ -defensin cluster confers sperm dysfunction and infertility in male mice / Y.S. Zhou, S. Webb, L. Lettice et al. // *PLoS Genet.* – 2013. – Vol. 9. – e1003826.

509. Peptide Vaccines and Peptidomimetics of EGFR (HER-1) Ligand Binding Domain Inhibit Cancer Cell Growth In Vitro and In Vivo / K. Chu Foy, R.M. Wygle, M.J. Miller et al. // *J Immunol.* – 2013. – Vol. 191, № 1. – P. 217–227.

510. Peptidoglycan adjuvants: minimal structure required for activity / A. Adam, F. Ellouz, R. Ciorbaru et al. // *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol.* – 1975. – Vol. 149, № 2-4. – P. 341-8.

511. Perinatal antibiotic treatment affects murine microbiota, immune responses and allergic asthma / S. L. Russell, M. J. Gold, B. P. Willing et al. // *Gut Microbes.* – 2013. – Vol. 4. – P. 158–164.

512. Perinerin, a novel antimicrobial peptide purified from the clamworm *Perinereis aibuhitensis* grube and its partial characterization / W. Pan, X. Liu, F. Ge et al. // *J. Biochem.* – 2004. – Vol. 135. – P. 297–304.

513. Phase 1 clinical tests of influenza MDP-virosome vaccine (KD-5382) / M. Kaji, Y. Kaji, K. Ohkuma et al. // *Vaccine.* – 1992. – Vol. 10. – P. 663-7. doi: 10.1016/0264-410x(92)90086-y.

514. Phillips, N. C. Anti-infectious activity of liposomal muramyl dipeptides in immunodeficient CBA/N mice / N. C. Phillips, L. Chedid // *Infect. Immun.* – 1987. – Vol. 55. – P. 1426–1430.

515. Piers, K.L. Improvement of outer membrane-permeabilizing and lipopolysaccharide-binding activities of an antimicrobial cationic peptide by C-terminal modification / K.L. Piers, M.H. Brown, R.E. Hancock // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – Vol. 38. – P. 2311–2316.

516. Piers, K.L. The interaction of a recombinant cecropin/melittin hybrid peptide with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* / K.L. Piers, R.E. Hancock // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol. 12. – P. 951–958.

517. Plicatamide, an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes / J. A. Tincu, L. P. Menzel, R. Azimov et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278. – P. 13546–13553.

518. Pomponi, S. A. The bioprocess-technological potential of the sea / S.A. Pomponi // *Progress in Industrial Microbiology.* – 1999. – Vol. 35. – P. 5–13.

519. Pontarotti, P. *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life* / P. Pontarotti. – Springer. – 2014. – 398 p.

520. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors / J. Potempa, M. Dragunow, M.A. Curtis et al. // *Science Advances*. – 2019 – Vol. 5. – P. eaau3333. doi: 10.1126/sciadv.aau3333.

521. Potent Anti-Candida Fraction Isolated from Capsicum chinense Fruits Contains an Antimicrobial Peptide That is Similar to Plant Defensin and is Able to Inhibit the Activity of Different  $\alpha$ -Amylase Enzymes / M.C.L. Aguiéiras, L.M. Resende, T.A.M. Souza et al. // *Probiotics Antimicrob. Proteins*. – 2021. – Vol. 17. – P. 39.

522. Potent inducers of endogenous antimicrobial peptides for host directed therapy of infections / H. Ottosson, F. Nylén, P. Sarker et al. // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – 36692.

523. Preclinical studies of toxicity and safety of the AS-48 bacteriocin / M. Charlet, S. Chernysh, H. Philippe et al. // *J. Adv. Res.* – 2019. – Vol. 20. – P. 129–139.

524. Prevention of experimental septic shock by pretreatment of mice with muramyl peptides / E. Meshcheryakova, S. Guryanova, E. Makarov et al. // *Int. Immunopharmacol.* – 2001. – Vol. 1, № 9-10. – P. 1857–1865. doi: 10.1016/s1567-5769(01)00111-4.

525. Production of colony-stimulating factor from macrophages by muroctasin / F. Yamaguchi, K. Akahane, T. Takashi et al. // *Arzneim. Forsch. Drug Res.* – 1988. – Vol. 38. – P. 983–986.

526. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experiment autoimmune encephalomyelitis / Y.K. Lee, J.S. Menezes, Y. Umesaki et al. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – Vol. 108. – P. 4615–4622. doi: 10.1073/pnas.1000082107.

527. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components / K. H. Lee, A. Biswas, Y. J. Liu et al. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287. – P. 39800–39811.

528. Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system / V.L. Scofield, J.M. Schlumpberger, L.A. West et al. // *Nature*. – 1982. – Vol. 295. – P. 499-502. doi: 10.1038/295499a0.

529. Purification and Primary Structure of Two Isoforms of Arenicin, a Novel Antimicrobial Peptide from Marine Polychaeta *Arenicola marina* / T.V. Ovchinnikova, G.M. Aleshina, S.V. Balandin [et al.] // *FEBS Lett.* – 2004. – Vol. 577. – P. 209–214. doi: 10.1016/j.febslet.2004.10.012.

530. Pütsep, K. Boman (1924–2008): Pioneer in peptide-mediated innate immune defence / K. Pütsep, I. Faye, G. Hans // *Scand. J. Immunol.* – 2009. – Vol. 70. – P. 317–326.

531. Qin, J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing / J. Qin // *Nature*. – 2010. – Vol. 464. – P. 59–65.

532. Quantitative proteomic profiling of tachyplesin I targets in U251 gliomaspheres / X. Li, J. Dai, Y. Tang et al. // *Mar. Drugs*. – 2017. – Vol. 15. – 20. doi: 10.3390/md15010020.

533. Raheem, N. Mechanisms of Action for Antimicrobial Peptides With Antibacterial and Antibiofilm Functions / N. Raheem, S. K. Straus // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – 2866.

534. Rast, J.P. Marine invertebrate genome sequences and our evolving understanding of animal immunity / J.P. Rast, C. Messier-Solek // *Biol. Bull.* – 2008. – Vol. 214, № 3. – P. 274-83.

535. Rational design of multi epitope-based subunit vaccine by exploring MERS-COV proteome: Reverse vaccinology and molecular docking approach / U.A. Ashfaq, S. Saleem, M.S. Masoud et al. // *PLoS ONE*. – 2021. – Vol. 16. – e0245072.

536. Recent insights into the prognostic and therapeutic applications of lysozymes / L. Jiang, Y. Li, L. Wang [et al.] // *Front. Pharmacol.* – 2021 – Vol. 12. – P. 767642.

537. Recent Progress in the Discovery and Design of Antimicrobial Peptides Using Traditional Machine Learning and Deep Learning / J. Yan, J. Cai, B. Zhang et al. // *Antibiotics*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1451.

538. Receptorinteracting protein kinase-2 inhibition by cyld impairs antibacterial immune responses in macrophages / K. Wex, U. Schmid, S. Just [t al. // *Front. Immunol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 650.

539. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus / M. Schlee, A. Roth, V. Hornung et al. // *Immunity.* – 2009 – Vol. 31, № 1. – P. 25-34.

540. Recombinant antimicrobial peptide microcin J25 alleviates DSS-induced colitis via regulating intestinal barrier function and modifying gut microbiota / L. Shang, H. Yu, H. Liu et al. // *Biomed. Pharmacother.* – 2021. – Vol. 139. – 111127. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111127.

541. Recombinant expression and range of activity of penaeidins, antimicrobial peptides from penaeid shrimp / D. Destoumieux, P. Bulet, J.M. Strub, et al. // *Eur. J. Biochem.* – 1999. – Vol. 266. – P. 335–346.

542. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis / V. Thimon, O. Koukoui, E. Calvo et al. // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 13. – P. 691–704.

543. Regulation and Functional Impact of Lipopolysaccharide Induced Nod2 Gene Expression in the Murine Epididymal Epithelial Cell Line PC1 / M. Mühlbauer, A.W. Cheely, S. Yenugu et al. // *Immunology.* – 2008. – Vol. 124. – P. 256-264. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02763.x.

544. Regulatory Peptides in Asthma / K. Kaczyńska, D. Zając, P. Wojciechowski et al. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22. – P. 13656. doi: 10.3390/ijms222413656.

545. Restorative activity of muroctasin on leukopenia associated with anticancer treatment / E. Tsubura, T. Nomura, H. Niitani, et al. // *Arzneimittelforschung.* – 1988. – Vol. 38. – P. 1070–1074.

546. Restorative effect of muroctasin on leukopenia caused by anticancer chemotherapy in lung cancer. Comparative study by envelope method / M. Fukuoka, M. Takada, N. Takifuji, et al. // *Arzneimittelforschung.* – 1989. – Vol. 39, № 1. – P. 90-93.

547. Restorative Effect of Muroctasin; MDP-Lys (L18) [DJ-7041] on Leukopenia in Urogenital Cancer Patients Treated with Chemotherapy / K. Oishi, H. Takeuchi, O. Yoshida et al. // *Hinyokika Kiyo*. – 1989. – Vol. 35, № 3. – P. 527–36.

548. Restorative effect of romurtide for thrombocytopenia associated with intensive anticancer drug treatment and/or irradiation in patients with gastrointestinal cancer / K. Yano, H. Matsuoka, Y. Seo et al. // *Anticancer Res*. – 1995. – Vol. 15. – P. 2883–2887.

549. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis / K.L.Tang , N.P. Caffrey, D.B. Nóbrega et al. // *Lancet Planet Health*. – 2017. – Vol. 8. – P. e316 – e327.

550. Reverse vaccinology approach towards the in-silico multi epitope vaccine development against SARS-CoV-2 / V. Kumar, S. Kancharla, P. Kolli et al. // *F1000Research*. – 2021. – Vol. 10. – P. 44.

551. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature / P. G. Arnison, M. J. Bibb, G. Bierbaum et al. // *Nat. Prod. Rep*. – 2013. – Vol. 30. – P. 108–60.

552. Role for erbin in bacterial activation of Nod2 / T. A. Kufer, E. Kremmer, D. J. Banks et al. // *Infect. Immun*. – 2006. – Vol. 74. – P. 3115–3124. doi: 10.1128/IAI.00035-06.

553. Role of human beta-defensin-2 during tumor necrosis factor-alpha/NF-kappaB-mediated innate antiviral response against human respiratory syncytial virus / S. Kota, A. Sabbah, T.H. Chang et al. // *J. Biol. Chem*. – 2008. – Vol. 283. – P. 22417–22429.

554. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity / J.J. Oppenheim, A. Biragyn, L.W. Kwak et al. // *Ann. Rheum. Dis*. – 2003. – Vol. 62 (Suppl. 2). – P. ii17–ii21.

555. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes / A.F. Bent, B.N. Kunkel, D. Dahlbeck et al. // *Science*. – 1994. – Vol. 265, № 5180. – P. 1856-60.

556. Rumio, C. Induction of Paneth cell degranulation by orally administered Toll-like receptor ligands / C. Rumio, M. Sommariva, L. Sfondrini [et al.] // *J. Cell. Physiol.* – 2012. – Vol. 227. – P. 1107–1113.

557. Russell, S. L. Early life antibiotic-driven changes in microbiota enhance susceptibility to allergic asthma / S. L. Russell, M. J. Gold, M. Hartmann [et al.] // *EMBO Rep.* – 2012. – Vol. 13. – P. 440–447.

558. Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease / H. Gusman, J. Travis, E.J. Helmerhorst, et al. // *Infect. Immun.* – 2001. – Vol. 69. – P. 1402–1408.

559. Salivary histatin as an inhibitor of a protease produced by the oral bacterium *Bacteroides gingivalis* / M. Nishikata, T. Kanehira, H. Oh et al. // *Biochem. Biophys. Res Commun.* – 1991. – Vol. 174. – P. 625–630.

560. Salivary secretory immunoglobulin A as a potential biomarker of psychosocial stress response during the first stages of life: A systematic review / Á.Castro-Quintas, H. Palma-Gudiel, N. San Martín-González et al. // *Frontiers in Neuroendocrinology.* – 2023. – Vol. 71. – 101083.

561. Sankaran-Walters, S. Guardians of the Gut: Enteric Defensins / S. Sankaran-Walters, R. Hart, C. Dills // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 647.

562. Sarkar, S. Dendritic cells in rheumatoid arthritis / S. Sarkar // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 656–665.

563. Schaefer, L. Extracellular matrix molecules: Endogenous danger signals as new drug targets in kidney diseases / L. Schaefer // *Curr Opin Pharmacol.* – 2009. – Vol. 10. – P. 185–190.

564. Schaub, R.E. The Pathogenic neisseria use a streamlined set of peptidoglycan degradation proteins for peptidoglycan remodeling, recycling, and toxic fragment release / R.E. Schaub, J.P. Dillard // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – 73.

565. Schroder, J. M. Human beta-defensin-2 / J. M. Schroder, J. Harder // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 1999. – Vol. 31. – P. 645–651.

566. Schröder, K. The Origin of Mucosal Immunity: Lessons from the Holobiont Hydra / K. Schröder, T.C. Bosch // *mBio*. – 2016. – Vol. 7, № 6. – e01184-16.
567. Schworer, S. A. Inhaled endotoxin induces a systemic neutrophil response without affecting cardiovascular measures in a randomized cross-over exposure study / S.A. Schworer, A.L. Hinderliter // *Inhal Toxicol*. – 2024. – Vol. 18. – P. 1-6.
568. Screening and Probiotic Potential Evaluation of Bacteriocin-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* In Vitro / Y. Bu, Y. Liu, Y. Liu et al. // *Foods*. – 2022. – Vol. 11. – P. 1575.
569. Searching the Evolutionary Origin of Epithelial Mucus Protein Components—Mucins and FCGBP / T. Lang, S. Klasson, E. Larsson et al. // *Mol Biol Evol*. – 2016. – Vol. 33. – P. 1921–1936.
570. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria / T. Ayabe, D.P. Satchell, C.L. Wilson et al. // *Nat. Immunol*. – 2000. – Vol. 1. – P. 113–118.
571. Secretory IgA and mucin-mediated biofilm formation by environmental strains of *Escherichia coli*: role of type 1 pili / R.R. Bollinger, M.L. Everett, S.D. Wahl et al. // *Mol. Immunol*. – 2006. – Vol. 43. – P. 378–387.
572. Sedgley, C.M. Plasmid pAMS1-Encoded, Bacteriocin-Related “Siblicide” in *Enterococcus faecalis* / C.M. Sedgley, D.B. Clewell, S.E. Flannagan // *J. Bacteriol*. – 2009. – Vol. 191. – P. 3183–3188.
573. Sekiguchi, T. The Calcitonin/Calcitonin Gene-Related Peptide Family in Invertebrate Deuterostomes / T. Sekiguchi // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2018. – Vol. 9. – 695.
574. Selsted, M. E. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response / M. E. Selsted, A. J. Ouellette // *Nat Immunol*. – 2005. – Vol. 6. – P. 551–557.
575. Selsted, M.E. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes / M.E. Selsted, D. Szklarek, R.I. Lehrer // *Infect. Immun*. – 1984. – Vol. 45. – P. 150–154.

576. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity / H. Steiner, D. Hultmark, A. Engström et al. // *Nature*. – 1981. – Vol. 292. – P. 246–248.
577. Shand, R. F. Archaeal antimicrobials: an undiscovered country / R.F. Shand, K.J. Leyva // *Archaea: New Models for Prokaryotic Biology*. – 2008. – UK: Caister Academic Press. – 352 p.
578. Shelley, J.R. The Dichotomous Responses Driven by  $\beta$ -Defensins / J.R. Shelley, D.J. Davidson, J.R. Dorin // *Front. Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – 1176.
579. Shetab Boushehri, M.A. Challenges of using lipopolysaccharides for cancer immunotherapy and potential delivery-based solutions thereto / M.A. Shetab Boushehri, A. Lamprecht // *Ther Deliv.* – 2019. – Vol. 10. № 3. – P. 165-187.
580. Shwaiki, L.N. Study on the Inhibitory Activity of a Synthetic Defensin Derived from Barley Endosperm against Common Food Spoilage Yeast / L.N. Shwaiki, A.W. Sahin, E.K. Arendt // *Molecules*. – 2020. – Vol. 26. – 165.
581. Sieprawska-Lupa, M. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases / M. Sieprawska-Lupa, P. Mydel, K. Krawczyk // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 4673–4679.
582. Signaling pathways involved in the biological functions of dendritic cells and their implications for disease treatment / H. Cheng, W. Chen, Y. Lin et al. // *Molecular Biomedicine*. – 2023. – Vol. 4, № 1. – P. 15.
583. Sinha, R.K. Release of soluble peptidoglycan from growing gonococci: Demonstration of anhydro-muramyl-containing fragments / R.K. Sinha, R.S. Rosenthal // *Infect. Immun.* – 1980. – Vol. 29. – P. 914–925.
584. SNPs identified by GWAS affect asthma risk through DNA methylation and expression of cis-genes in airway epithelium / S. Kim, E. Forno, Q. Yan et al. // *Eur. Respir. J.* – 2020.– Vol. 55, № 4. – P. 1902079. doi: 10.1183/13993003.02079-2019.
585. Solomon, S. Corticostatins / S. Solomon // *Trends Endocrinol. Metab.* – 1993. – Vol. 4. – P. 260–264.

586. SP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in human neutrophils / C.K. Huang, L. Zhan, Y. Ai et al. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. – P. 17–19.

587. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease / M. Maceyka, K.B. Harikumar et al. // *Trends Cell Biol.* – 2012. – Vol. 22. – P. 50–60. doi: 10.1016/j.tcb.2011.09.003.

588. *Staphylococcus epidermidis*: A Potential New Player in the Physiopathology of Acne? / J.P. Claudel, N. Auffret, M., Leccia et al. // *Dermatology.* – 2019. – Vol. 235, № 4. – P. 287–294.

589. Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future / R. M. Steinman // *Annu. Rev. Immunol.* – 2012. – Vol. 30. – P. 1–22.

590. Steroid hormone modulates the production of cathelicidin and human  $\beta$ -defensins in lung epithelial cells and macrophages promoting *Mycobacterium tuberculosis* killing / S. P. Marin-Luevano, A. Rodriguez-Carlos, Y. Jacobo-Delgado et al. // *Tuberculosis.* – 2021. – Vol. 128. – P. 102080.

591. Stimulation of non-specific resistance to infection induced by 6-O-acetylmuramyl dipeptide in mice / K. Matsumoto, H. Ogawa, T. Kusama et al. // *Infect. Immun.* – 1981. – Vol. 32. – P. 748–758.

592. Stotz, H. U. Plant defensins / H. U. Stotz, J. Thomson, Y. Wang // *Plant Signal. Behav.* – 2009. – Vol. 4. – P. 1010–1012.

593. Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size / D. P. Strachan // *BMJ.* – 1989. – Vol. 299. – P. 1259–1260.

594. Structural and DNA-binding studies on the bovine antimicrobial peptide, indolicidin: Evidence for multiple conformations involved in binding to membranes and DNA / C.H. Hsu, C. Chen, M.L. Jou, et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – Vol. 33. – P. 4053–4604.

595. Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils / D. Romeo, B. Skerlavaj, M. Bolognesi et al. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 9573–9575.

596. Studies on tuberculin active peptide. I. The isolation, crystallization and properties of tuberculin active peptide from tubercle bacillus / S. Morisawa, A. Tanaka, K. Shojima et al. // *Biochim Biophys Acta*. – 1960. – Vol. 38. – P. 252-258. doi: 10.1016/0006-3002(60)91239-7.

597. Study of delayed hypersensitivity to tuberculin in 130 cancerous adults: Effects of BCG / L. Israel, C. Mawas, A. Bouvrain et al. // *Pathol Biol*. – 1967. – Vol. 15, № 11. – P. 597-601.

598. Subbalakshmi, C. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin / C. Subbalakshmi, N. Sitaram // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – Vol. 160. – P. 91–96.

599. Sublancin protects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection by the combined modulation of innate immune response and microbiota / J. Li, J. Chen, G. Yang et al. // *Peptides*. – 2021. – Vol. 141. – 170533. doi: 10.1016/j.peptides.2021.170533.

600. Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli* / A. Patrzykat, C. L. Friedrich, L. V. Zhang et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – P. 605–614. doi: 10.1128/AAC.46.3.605-614.2002.

601. Subtype characteristics of dendritic cells from peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis / S.A. Falaleeva, V.V. Kurilin, N.S. Shkaruba et al. // *Medical Immunology*. – 2013. – Vol. 15, № 4. – P. 343–350.

602. Sugiarto, H. Mechanisms of action of ostrich beta-defensins against *Escherichia coli* / H. Sugiarto, P. L. Yu // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2007. – Vol. 270. – P. 195–200.

603. Surface Functionalization of Ti6Al4V-ELI Alloy with Antimicrobial Peptide Nisin / M. Lallukka, F. Gamna, V. A. Gobbo et al. // *J. Immunol.* – 2015. – Vol. 195. – P. 4332.

604. Synergy between Circular Bacteriocin AS-48 and Ethambutol against *Mycobacterium tuberculosis* / C. Aguilar-Pérez, B. Gracia, L. Rodrigues et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 9. – e00359-18.

605. Systematic review of efficacy of anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in patients with psoriasis previously treated with a different anti-TNF agent / P.S. Yamauchi, R. Bissonnette, H.D. Teixeira et al. // *J. Am. Acad. Dermatol.* – 2016. – Vol. 75. – P. 612–18.
606. Szponar, B. Use of mass spectrometry for characterising microbial communities in bioaerosols / B. Szponar, L. Larsson // *Ann. Agric. Environ. Med.* – 2001. – Vol. 8. – P. 111–117.
607. T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry / W.A. Macdonald, Z. Chen, S. Gras et al. // *Immunity.* – 2009. – Vol. 31. – P. 897. doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.025.
608. Tachyplesin activates the classic complement pathway to kill tumor cells / J. Chen, X.M. Xu, C.B. Underhil, et al. // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 4614–4622.
609. Tachyplesin, a Class of Antimicrobial Peptide from the Hemocytes of the Horseshoe Crab (*Tachyplesus tridentatus*): Isolation and Chemical Structure / T. Nakamura, H. Furunaka, T. Miyata et al. // *Journal of Biological Chemistry.* – 1988. – Vol. 263. – P. 16709–16713.
610. The adjuvant effect of a muramyl dipeptide (MDP) analog on temperature-sensitive *Salmonella* mutant vaccine / K. Onozuka, H. Shinomiya, N. Cho et al. // *Int. J. Immunopharmacol.* – 1989. – Vol. 11. – P. 781–787.
611. The antibacterial peptide pyrrocoricin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding / G. Kragol, S. Lovas, G. Varadi et al. // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40. – P. 3016–3026.
612. The assessment of sIgA, histatin-5, and lactoperoxidase levels in saliva of adolescents with dental caries / A. Gornowicz, G. Tokajuk, A. Bielawska et al. // *Med. Sci. Monit.* – 2014. – Vol. 29, № 20. – P. 1095–1100.
613. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed / L. Riol-Blanco, N. Sánchez-Sánchez, A. Torres et al. // *Journal of Immunology.* – 2005. – Vol. 174, № 7. – P. 4070–4080.

614. The conservation and diversity of ascidian cells and molecules involved in the inflammatory reaction: The *Ciona robusta* model / V. Longo, D. Parrinello, A. Longo et al. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2021 Dec. – Vol. 119. – P. 384-396. doi: 10.1016/j.fsi.2021.10.022.

615. The control of antibody isotype response to recombinant human immunodeficiency virus gp120 antigen by adjuvants / R. Bomford, M. Stapleton, S. Winsor et al. // *AIDS Res. Human Retrov.* – 1992. – P. 1765-1772.

616. The cross talk between microbiota and the immune system: metabolites take center stage / H. Shapiro, C.A. Thaiss, M. Levy et al. // *Curr Opin Immunol.* – 2014. – Vol. 30. – P. 54–62.

617. The differential role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in the adherence, migration and podosome formation of human macrophages and dendritic cells under inflammatory conditions / S. Lukácsi, T. Gerecsei, K. Balázs et al. // *PloS one.* – 2020. – Vol. 15, № 5. – e0232432.

618. The effects of the microbiota on the host immune system / J. Karczewski, B. Poniedziałek, Z. Adamski et al. // *Autoimmunity.* – 2014. – Vol. 47. – P. 494–504. doi: 10.3109/08916934.2014.938322.

619. The Evolution of the Metazoan Toll Receptor Family and its Expression during Protostome Development / A. Orús-Alcalde, T.M. Lu, A. Børve et al. // *BMC Ecol Evo.* – 2021. – Vol. 21. – 208.

620. The first invertebrate RIG-I-like receptor (RLR) homolog gene in the pacific oyster *Crassostrea gigas* / Y. Zhang, F. Yu, J. Li et al. // *Fish Shellfish Immunol.* – 2014. – Vol. 40. – P. 466–471.

621. The gut microbiota–brain axis in neurological disorder / H. Ullah, S. Arbab, Y. Tian et al. // *Front. Neurosci.* – 2023. – Vol. 17. – 1225875.

622. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems / M. Carabotti, A. Scirocco, M.A. Maselli, et al. // *Annals of Gastroenterology.* – 2015. – Vol. 28, № 2. – P. 203–209.

623. The human cathelicidin, LL-37, induces granzyme-mediated apoptosis in regulatory T cells / J.S. Mader, C. Ewen, R.E. Hancock et al. // *J. Immunother.* – 2011. – Vol. 34. – P. 229–235.
624. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome / T. Hibino, M. Loza-Coll, C. Messier, et al. // *Dev Biol.* – 2006. – Vol. 300, № 31. – P. 349–365.
625. The Immune System of Marine Organisms as Source for Drugs against Infectious Diseases / A. Falco, M. Adamek, P. Pereiro et al. // *Mar. Drugs.* – 2022. – Vol. 20. – P. 363.
626. The Improvement of Immune Effect of Recombinant Human Beta-Defensin 2 on Hepatitis B Vaccine in Mice / M. Wang, W. Zeng, Z. Zhang et al. // *Viral Immunol.* – 2021. – Vol. 34. – P. 96–111.
627. The interplay between defensins and microbiota in Crohn's disease / L. Coretti, A. Natale, M. Cuomo, [et al.] // *Mediat. Inflamm.* – 2017. – 2017. – 8392523.
628. The Landscape of Genetic Content in the Gut and Oral Human Microbiome / B.T. Tierney, Z. Yang, J.M. Lubber et al. // *Cell Host Microbe.* – 2019. – Vol. 26. – P. 283–295.e8.
629. The LRR proteins capricious and Tartan mediate cell interactions during DV boundary formation in the *Drosophila* wing / M. Milán, U. Weihe, L. Pérez et al. // *Cell.* – 2001. – Vol. 106, № 6. – P. 785–794.
630. The peptide antibiotic clavanin A interacts strongly and specifically with lipid bilayers / E.J. van Kan, D.N. Ganchev, M.M. Snel et al. // *Biochemistry.* – 2003. – Vol. 42. – P. 11366–11372.
631. The periodontopathic bacteria in placenta, saliva and subgingival plaque of threatened preterm labor and preterm low birth weight cases: a longitudinal study in Japanese pregnant women / C. Ye, S. Katagiri, N. Miyasaka et al. // *Clin. Oral. Investig.* – 2020. – Vol. 24. – P. 4261–4270.
632. The protein ATG16L1 suppresses inflammatory cytokines induced by the intracellular sensors Nod1 and Nod2 in an autophagy-independent manner / M.T.

Sorbara, L.K. Ellison, M. Ramjeet et al. // *Immunity*. – 2013. – Vol. 39. – P. 858–873. doi: 10.1016/j.immuni.2013.10.013.

633. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children / E. Ranadheer, U. A. Nayak, N. V. Reddy et al. // *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* – 2011. – Vol. 29. – P. 106–12.

634. The RLR/NLR expression and pro-inflammatory activity of tissue mast cells are regulated by cathelicidin LL-37 and defensin hBD-2 / J. Agier, S. Rózalska, M. Wiktorska et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 11750.

635. The Role of the p38-MNK-eIF4E Signaling Axis in TNF Production Downstream of the NOD1 Receptor / M. V. Pashenkov, L. S. Balyasova, Y. A. Dagil et al. // *J Immunol.* – 2017. – Vol. 198, № 4. – P. 1638–1648.

636. The synthetic immunomodulator murabutide controls human immunodeficiency virus type 1 replication at multiple levels in macrophages and dendritic cells / E.C. Darcissac, M.J. Truong, J. Dewulf, et al. // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, № 17. – P. 7794-7802.

637. The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton / N. S. Hegde, D. A. Sanders, R. Rodriguez et al. // *Nat. Chem.* – 2011. – Vol. 3. – P. 725–731.

638. The two-synergistic peptide bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NKR- 5-3 isolated from Thai fermented fish (Plara) / P. Wilaipun, T. Zendo, M. Sangjindavong et al. // *Sci. Asia.* – 2004. – Vol. 30. – P. 115–122.

639. The WAO White Book on Allergy (Update 2013) / R. Pawankar, G.W. Canonica, S.T. Holgate et al. – World Allergy Organization. – 2013. – 24 p.

640. Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide / E.G. MacEwen, I.D. Kurzman, R.C. Rosenthal et al. // *J Natl Cancer Inst.* – 1989. – Vol. 81. – P. 935-938. doi: 10.1093/jnci/81.12.935.

641. Thiostrepton, a Natural Compound That Triggers Heat Shock Response and Apoptosis in Human Cancer Cells: A Proteomics Investigation / C. Sandu, A.G.N. Wetie, C.C. Darie et al. // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2014. Vol. 806. – P. 443–451. doi: 10.1007/978-3-319-06068-2\_21.

642. Thorn, J. The inflammatory response in humans after inhalation of bacterial endotoxin: a review / J. Thorn // *Inflamm Res.* – 2001. – Vol. 50. – P. 254-261.
643. Throughput Screening for Natural Host Defense Peptide-Inducing Compounds as Novel Alternatives to Antibiotics / W. Lyu, Z. Deng, L. T. Sunkara et al. // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 191. doi: 10.3389/fcimb.2018.00191.
644. Thurincin H Is a Nonhemolytic Bacteriocin of *Bacillus thuringiensis* with Potential for Applied Use / T. Ortiz-Rodríguez, F. Mendoza-Acosta, S.A. Martínez-Zavala et al. // *Probiotics Antimicrob. Proteins.* – 2022. – Vol. 15. – P. 955–966 doi: 10.1007/s12602-022-09952-2.
645. Tincu, J.A. Antimicrobial peptides from marine invertebrates / J.A. Tincu, S.W. Taylor // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – Vol. 48. – P. 3645–3654.
646. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS / A.P. West, I.E. Brodsky, C. Rahner et al. // *Nature.* – 2011. – Vol. 472. – P. 476–480.
647. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM / C. Couillault, N. Pujol, J. Reboul, et al. // *Nat Immunol.* – 2004. – Vol. 5. – P. 488–494.
648. TLR-related pathway analysis: Novel gene-gene interactions in the development of asthma and atopy / N. E. Reijmerink, R. W. Bottema, M. Kerkhof et al. // *Allergy.* – 2010. – Vol. 65. – P. 199–207.
649. Toll-Like Receptor Evolution: Does Temperature Matter? / C. Sousa, S.A. Fernandes, J.C.R. Cardoso et al. // *Front. Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – 812890. doi: 10.3389/fimmu.2022.812890.
650. Toll-like receptor-induced granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion is impaired in Crohn's disease by nucleotide oligomerization domain 2-dependent and - independent pathways / A. Brosbøl-Ravnborg, C.L. Hvas, J. Agnholt, et al. *Clinical and Experimental Immunology.* – 2009. – Vol. 155, № 3. – P 487-495.

651. Toll-Like Receptors, Associated Biological Roles, and Signaling Networks in Non-Mammals / L. Nie, S.Y. Cai, J.Z. Shao et al. // *Front Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1523.
652. Toll-like receptors: significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals / M. Vidya, V. Kumar, V. Sejian et al. // *Int Rev Immunol.* – 2018. – Vol. 37. – P. 20–36.
653. Tomazic, P.V. Nasal mucus proteome and its involvement in allergic rhinitis / P.V. Tomazic, B. Darnhofer, R. Birner-Gruenberger // *Expert Rev. Proteom.* – 2020. – Vol. 17. – P. 191–199.
654. Toward a chimeric vaccine against multiple isolates of *Mycobacteroides*—An integrative approach / R. Satyam, T. Bhardwaj, N.K. Jha et al. // *Life Sci.* – 2020. – Vol. 250. – P. 117541.
655. Towards the Application of Human Defensins as Antivirals / M.S. Park, J.I. Kim, I. Lee et al. // *Biomol. Ther.* – 2018. – Vol. 26. – P. 242–254.
656. Trace levels of peptidoglycan in serum underlie the NOD-dependent cytokine response to endoplasmic reticulum stress / R. Molinaro, T. Mukherjee, R. Flick et al. // *J. Biol. Chem.* – 2019. – Vol. 31. – P. 9007–9015.
657. Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes / J.X. Yue, B.C. Meyers, J.Q. Chen et al. // *New Phytol.* – 2012. – Vol. 193. – P. 1049–1063.
658. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease / M.G. Netea, L.A. Joosten, E. Latz et al. // *Science.* – 2016. – Vol. 6284. – P. aaf1098.
659. Trastuzumab treatment in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma overexpressing HER2/neu / A. D. Santin, S. Bellone, J. J. Roman et al. // *Int. J. Gynaecol. Obstet.* – 2008. – Vol. 102. – P. 128–131.
660. Treating skin diseases according to the low dose medicine principles. Data and hypotheses / T. Lotti, J. Hercogova, U. Wollina et al. // *J. Biol. Regul. Homeost Agents.* – 2015. – Vol. 29, № 1. – P. 47–51.

661. Tsai, C.C. Cyanovirin-N inhibits AIDS virus infections in vaginal transmission models / C.C. Tsai, P. Emau, Y. Jiang // *AIDS Res. Hum. Retrovir.* – 2004. – Vol. 20. – P. 11–18.

662. Tzou, P. Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants / P. Tzou, J. -M. Reichhart, B. Lemaitre // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol. 99. – P. 2152–2157.

663. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence / T.C. Bosch, R. Augustin, F. Anton-Erxleben et al. // *Dev Comp Immunol.* – 2009. – Vol. 33, № 4. – P. 559–69.

664. Unveiling antimicrobial peptide-generating human proteases using PROTEASIX / P. Bastos, F. Trindade, R. Ferreira et al. // *J. Proteom.* – 2018. – Vol. 171. – P. 53–62.

665. Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus* / K. Khalturin, M. Becker, B. Rinkevich et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – Vol. 100. – P. 622–627. doi: 10.1073/pnas.0234104100.

666. US Department of Health and Human Services. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 / US Department of Health and Human Services // US Department of Health and Human Services. – 2013. – P. 6.

667. Vaccine Therapy in Treating Patients With Metastatic Solid Tumors. ClinicalTrials.gov. A service of the U.S. National Institutes of Health. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01376505?term=MDP&rank=7>

668. van Asbeck. Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells / Van Asbeck // *BMC Microbiol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 229.

669. van Boxel-Dezaire, A.H. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons / A.H. van Boxel-Dezaire, M.R. Rani, G.R. Stark // *Immunity.* – 2006. – Vol. 25. – P. 361–372.

670. Venkataprasad, N. Evidence of differential mycobacterial growth and modulation of mycobactericidal property by glucoaminylmuramyl dipeptide in murine macrophages / N. Venkataprasad // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1997. – Vol. 832. – P. 117–129.
671. Venkataprasad, N. The effect of glucosaminylmuramyl dipeptide injection to mice on the course of tuberculous infection and in vitro superoxide anion production / N. Venkataprasad, P. Ledger, J. Ivanyi // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1997 – Vol. 114. – P. 23–29.
672. Vollmer, W. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli* / W. Vollmer, U. Bertsche // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Biomembr.* – 2008. – Vol. 1778. – P. 1714–1734.
673. Voskoboynik, A. Identification of a Colonial Chordate Histocompatibility Gene / A. Voskoboynik, A. M. Newman, D. M. Corey // *Science.* – 2013. – Vol. 341. – P. 384.
674. Wang, S. A new look at Crohn's disease: Breakdown of the mucosal antibacterial defense / S. Wang, S. Huang, Q. Ye, // *J. Immunol. Res.* – 2018. – Vol. 2018. – 4353580.
675. Wastewater surveillance of antibiotic-resistant bacterial pathogens: A systematic review / A. Tiwari, P. Kurittu, A. I.Al-Mustapha et al. // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – 977106.
676. White, J.H. Vitamin D as an inducer of cathelicidin antimicrobial peptide expression: Past, present, and future / J.H. White // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 121. – P. 234–238.
677. WHO. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. – World Health Organization. – Switzerland. – 2022. – 132 p.
678. WHO. White Book on Allergy 2011-2012. – World Health Organization. – Switzerland. – 2014. – 156 p.
679. Williamson, D. GMDP for psoriasis / D. Williamson, M. Chawla, R. Marks // *Lancet.* – 1998. – Vol. 352. – P. 1857.

680. Woodburn, K.W. Designed Antimicrobial Peptides for Topical Treatment of Antibiotic Resistant Acne Vulgaris / K.W. Woodburn, J. Jaynes, L.E. Clemens // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9. – 23.
681. Worbs, T. Dendritic cell migration in health and disease / T. Worbs, S.I. Hammerschmidt, R. Förster // Nat. Rev. Immunol. – 2017. – Vol. 17. – P. 30–48.
682. World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance (2014). Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
683. Worth, L. L. Biologic response modifiers in pediatric cancer / L.L. Worth, S.S. Jeha, E.S. Kleinerman // Hematol Oncol Clin North Am. – 2001. – Vol. 15, № 4. – P. 723–740.
684. Wu, H.J. Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells / H.J. Wu // Immunity. – 2010. – Vol. 32. – P. 815–827.
685. Wuerth, K. New insights into cathelicidin modulation of adaptive immunity / K. Wuerth, R.E.W. Hancock // Eur. J. Immunol. – 2011. – Vol. 41. – P. 2817–2819.
686. Wysocka, M. Evaluating the antibacterial activity of muramyl dipeptide derivatives, retro-tuftsin derivatives, and anthraquinone oligopeptides against a range of pathogenic bacteria / M. Wysocka, K. Dzierzbicka, B. Krawczyk // Acta Biochim. Pol. – 2021. – Vol. 68. – P. 449–455.
687. XCR1+ dendritic cells promote memory CD8+ T cell recall upon secondary infections with *Listeria monocytogenes* or certain viruses / Y.O. Alexandre, S. Ghilas, C. Sanchez et al. // J Exp Med. – 2016. – Vol. 213. – P. 75–92.
688. Yamamura, Y. Biology of the mycobacterioses. Chemical and immunological studies on peptides and polysaccharides from tubercle bacilli / Y. Yamamura, K. Onoue, I. Azuma // Ann N Y Acad Sci. – 1968. – Vol. 154. – P. 88–97.
689. Yang, X. An introduction to epitope prediction methods and software / X. Yang, X. Yu // Rev. Med. Virol. – 2009. – Vol. 19. – P. 77–96. doi: 10.1002/rmv.602.
690. Yankelevich, I. A. Some features of the stress reaction in rats after exposure to stress and administration of antimicrobial peptide defensin ratnp-3 / I. A.

Yankelevich, G. M. Aleshina, V. N. Kokryakov // *Med. Acad. J.* – 2014. – Vol. 14. – P. 63–67. doi: <https://doi.org/10.17816/MAJ14463-67>.

691. Ye, J. Current Promising Strategies against Antibiotic-Resistant Bacterial Infections / J. Ye, X. Chen // *Antibiotics (Basel)*. – 2022. – Vol. 12. – 67. doi: [10.3390/antibiotics12010067](https://doi.org/10.3390/antibiotics12010067).

692. Yoneyama, M. Cytoplasmic recognition of RNA / M. Yoneyama, K. Onomoto, T. Fujita // *Adv. Drug Del. Rev.* – 2008. – Vol. 60. – P. 841–846.

693. Yoneyama, M. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors / M. Yoneyama, T. Fujita // *Immunological Reviews*. – 2009. – Vol. 227. – P. 54–65.

694. Yu, B. LPS-induced upregulation of the TLR4 signaling pathway inhibits osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells under inflammatory conditions / B. Yu, Q. Li, M. Zhou // *Int. J. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 43. – P. 2341–2351. doi: [10.3892/ijmm.2019.4165](https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4165).

695. Yu, J. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 $\beta$ , augments immune responses by multiple pathways / J. Yu // *J. Immunol.* – 2007. – Vol. 179. – P. 7684–7691.

696. Yuen, B. The characterization of sponge NLRs provides insight into the origin and evolution of this innate immune gene family in animals / B. Yuen, J.M. Bayes, S.M. Degnan // *Mol. Biol. Evol.* – 2014. – Vol. 31. – P. 106–120.

697. Zanetti, M. Cathelicidins: A novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain / M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo // *FEBS Lett.* – 1995. – Vol. 374. – P. 1–5.

698. Zárate-Potes, A. The putative immune recognition repertoire of the model cnidarian *Hydractinia symbiolongicarpus* is large and diverse / A. Zárate-Potes, I. D. Ocampo, L.F. Cadavid // *Gene*. – 2019. – Vol. 684. – P. 104–117. doi: [10.1016/j.gene.2018.10.068](https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.10.068).

699. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature*. – 2002. – Vol. 415. – P. 389–395.

700. Zasloff, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor / M. Zasloff // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 5449–5453.

701. Zelensky, A.N. The C-type lectin-like domain superfamily / A. N. Zelensky, J.E. Gready // *FEBS J.* – 2005. – Vol. 272. – P. 6179–6217.

702. Zeya, H.I. Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity / H.I. Zeya, J.K. Spitznagel // *J. Exp. Med.* – 1968. – Vol. 127. – P. 927–941.

703. Zeya, H.I. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. I.I. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action / H.I. Zeya, J.K. Spitznagel // *J. Bacteriol.* – 1966. – Vol. 91. – P. 755–762.

704. Zheng, D. Interaction between microbiota and immunity in health and disease / D. Zheng, T. Liwinski, E. Elinav // *Cell Res.* – 2020. – Vol. 30. – P. 492–506. doi: 10.1038/s41422-020-0332-7.

705. Zheng, P. Adaptor protein Crk-like (CrkL) controls natural killer cell function via regulating the accumulation of activating receptors and phosphorylated Vav-1 molecules at immunological synapses (INM2P.433) / P. Zheng, C. Hanson, D. Liu // *J. Immunol.* – 2014. – Vol. 192. – P. 56.16.

706. Zhong, Y. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases / Y. Zhong, A. Kinio, M. Saleh // *Front Immunol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 333.

707. Zidek, Z. Antiinflammatory effects of muramyl dipeptide in experimental models of acute inflammation / Z. Zidek, K. Masek, F. Sedevy // *Agents Actions.* – 1984. – Vol. 14. – P. 72-75.

708. Zielińska, D. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties / D. Zielińska, D. Kolożyn-Krajewska // *Biomed. Res. Int.* – 2018. – Vol. 1. – P. 1–115.