Санкт-Петербургский государственный университет

Биологический факультет

Кафедра биохимии

Макарова Тамара Олеговна

Изучение биологической активности пептидов слюны человека

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки Биология, основная образовательная программа бакалавриата

Научный руководитель:

Профессор кафедры биохимии, д.б.н. Шамова Ольга Валерьевна

Работа выполнена в

лаборатории дизайна и синтеза биологически активных пептидов

Отдела общей патологии и патофизиологии

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

(зав. лабораторией и отделом д.б.н., доцент Шамова О.В.)

Санкт-Петербург

2018

[ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 4](#_Toc514947385)

[ВВЕДЕНИЕ 5](#_Toc514947386)

[1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 7](#_Toc514947387)

1.1. [Белковый состав слюны 7](#_Toc514947388)

1.2. [Характеристика отдельных групп белков слюны 8](#_Toc514947389)

[1.2.1. Альбумины слюны 8](#_Toc514947390)

[1.2.2. Пролин-богатые белки слюны 9](#_Toc514947391)

[1.2.3. Тирозин-богатые белки 10](#_Toc514947392)

[1.3. Антимикробные пептиды 10](#_Toc514947393)

[1.3.1. Классификация антимикробных пептидов 11](#_Toc514947394)

[1.3.2. Механизмы действия антимикробных пептидов 11](#_Toc514947395)

[1.3.3. Другие биологические свойства АМП 13](#_Toc514947396)

[1.3.4. Антимикробные пептиды слюны человека 13](#_Toc514947397)

[1.4. Пролин-богатые АМП 16](#_Toc514947398)

[1.4.1. Пролин-богатые пептиды слюны человека 17](#_Toc514947399)

[2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 19](#_Toc514947400)

[2.1. Получение и подготовка пробы слюны человека 19](#_Toc514947401)

[2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография 19](#_Toc514947402)

[2.3. Электрофоретический анализ белков и пептидов 19](#_Toc514947403)

[2.3.1. Электрофорез в кислой буферной системе в присутствии мочевины 19](#_Toc514947404)

[2.3.2. Электрофорез в присутствии додецил сульфата натрия 20](#_Toc514947405)

[2.4. Методы оценки влияния белков и пептидов слюны на микроорганизмы 21](#_Toc514947406)

[2.4.1. Оценка антимикробной активности методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы 21](#_Toc514947407)

[2.4.2. Оценка антимикробной активности белковых фракций в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы 22](#_Toc514947408)

[2.4.3. Оценка совместного антимикробного действия исследуемых пептидов методом серийных разведений по принципу "шахматной доски" 22](#_Toc514947409)

[2.5. Масс-спектрометрия 23](#_Toc514947410)

[2.6. Статистическая обработка результатов 23](#_Toc514947411)

[3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 24](#_Toc514947412)

[3.1. Исследование пептидного состава слюны 24](#_Toc514947413)

[3.2. Оценка антимикробной активности пептидов слюны человека 29](#_Toc514947414)

[3.2.1. Оценка антимикробной активности индивидуальных фракций пептидов 29](#_Toc514947415)

[3.2.2. Оценка совместного действия пептидов 30](#_Toc514947416)

4. [ОБСУЖДЕНИЕ 32](#_Toc514947417)

[ВЫВОДЫ 33](#_Toc514947418)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 34](#_Toc514947419)

# ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМП – антимикробные пептиды

ББП — белки, богатые пролином

КОЕ- колониеобразующие единицы

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ОФ ВЭЖХ – обращено-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ПААГ – полиакриламидный гель

ПББ – пролин-богатый белок

ПБП – пролин-богатый пептид

**ВВЕДЕНИЕ**

Слюна - это важная биологическая жидкость, выполняющая множество функций, среди которых: работа в качестве смазочного материала для понижения трения, поддержка оптимального уровня pH, осуществление начальных этапов пищеварения, способствование образованию пищевых комков, предотвращение эрозии и деминерализации зубов, а также адгезии на их поверхности микроорганизмов, обеспечение вкусовых ощущений. Отдельно, в виду её бесспорной важности, стоит защитная функция, ведь ротовая полость выступает в качестве основного пути проникновения патогенных бактерий в организм. Однако, несмотря на факт попадания в ротовую полость различных групп микроорганизмов, потенциально способных вызвать инфекционные заболевания, в норме этого не происходит. Действительно, слюна, действуя как компонент естественной защиты организма против внешних патогенов, выполняет эту свою функцию с поразительной эффективностью. Её компоненты обладают противомикробными, противовирусными и противогрибковыми свойствами; играют важную роль в поддержании здоровья человека в целом (Huq, 2007; Pfaffe, 2011; Castagnola, 2011; Carpenter, 2013; Zasloff, 2002). Так, компонентом слюны являютсяантимикробные пептиды (АМП) врожденного иммунитета, представляющие собой небольшие катионные пептиды с массой до 10 кДа. К числу АМП слюны человека относятся альфа- и бета-дефенсины, кателицидины, гистатины и др. Кроме того, в секретах слюнных желез содержится большое количество белков и пептидов, часть которых хорошо изучена, но многие остаются совершенно не исследованными, и их функция не понятна.

Одними из мажорных компонентов секретов слюнных желез являются пролин-богатые пептиды. У ряда видов животных пролин-богатые пептиды (ПБП) содержатся в фагоцитах и играют роль основных противомикробных факторов. У человека ПБП отсутствуют в фагоцитирующих клетках, но содержатcя в слюне.

Изучение антибактериальной активности ПБП слюны человека, в том числе при их совместном действии с АМП, поможет понять биологическую значимость этих соединений, а в перспективе, возможно, и создать на их основе новые комбинированные антимикробные препараты для обработки полости рта при развитии инфекционного процесса. Поэтому детальное исследование биологической активности ПБП слюны является ***актуальной задачей*** биохимии и экспериментальной медицины.

**Целью** данной работы является оценка антимикробной активности белков и пептидов слюны человека, а также анализ сочетанного антибактериального действия синтетических аналогов пептидов, содержащихся в слюне (фрагмента пролин-богатого белка Р-F, кателицидина LL-37, гистатина 5).

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Разделение белков слюны человека с помощью обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) и последующий электрофоретический анализ белкового состава полученных фракций.
2. Оценка антимикробной активности белков и пептидов во фракциях, полученных после хроматографического разделения, масс-спектрометрический анализ состава фракций, в которых выявляется антимикробная активность, в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий.
3. Анализ состава фракций, имеющих антимикробную активность: на основании данных масс-спектрометрии сравнение молекулярных масс пептидов в этих фракциях с массами пептидов, описанных в литературе (фрагменты пролин-богатых белков слюны человека, антимикробные пептиды), с целью выяснения, какие соединения могут определять проявление антимикробной активности в слюне человека.
4. Оценка антимикробной активности синтетических аналогов пептидов, содержащихся в слюне (кателицидина LL-37, гистатина 5, фрагмента пролин-богатого белка Р-F), а также их совместного действия на грамотрицательные и грамположительные бактерии.

Таким образом, в результате выполнения задач работы будут получены новые данные о защитных свойствах компонентов слюны человека, впервые будет исследовано совместное антибактериальное действие фрагмента катионного пролин-богатого белка слюны и антимикробных пептидов, что предоставит новую информацию для выяснения роли пролин-богатых белков в противоинфекционной защите.

1.**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1****. Белковый состав слюны**

Слюна представляет собой секрет трех пар слюнных желез: околоушных, подъязычных и подчелюстных, а так же множества мелких железок, расположенных по всей поверхности слизистого эпителия полости рта. Однако, в полости рта находится жидкость, отличающаяся по составу от смеси секретов желез. Её, в свою очередь, принято называть смешанной слюной, или ротовой жидкостью; в ней присутствуют компоненты плазмы крови, бактерии, продукты их жизнедеятельности и жидкость из десневых бороздок (Zhang, 2013; Кочурова Е.В. 2014).

На сегодняшний день известно порядка 2000 белков и пептидов слюны, и считается, что протеом слюны уже изучен в достаточно полном объеме. Чуть менее половины секретируемых слюнными железами белков имеют низкую молекулярную массу (Ruhl, 2012; Spelmann, 2011; Amado, 2005).

Основную массу (около 90%) по сухому остатку всех белков слюны составляют полиморфные по составу группы белков: муцины, пролин- и тирозин-богатые белки, гистатины, статзерины, анионные и катионные гликопротеины. Большинство белков, синтезируемых слюнными железами, имеют в своей структуре специфический углеводный фрагмент, который может составлять до 70% от их общей массы. В жидкости ротовой полости также содержатся ферменты: α-амилаза, матриксные металлопротеазы, пероксидаза и другие; гормоны, среди которых соматотропин, пролактин и мелатонин (Cuevas-Córdoba, 2014; Колесов С.А., 2010). Множество плазматических компонентов, таких как альбумин, трансферин, иммуноглобулины G и М попадают в смешанную слюну из жидкости десневой бороздки. Диаграмма процентного содержания белков в слюне представлена на рисунке 1.

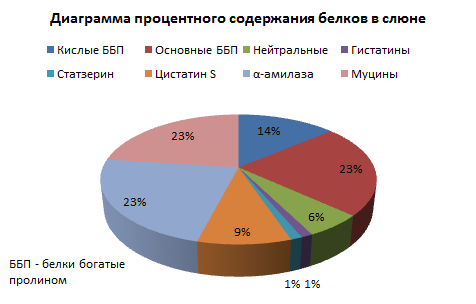


Рисунок 1. Диаграмма процентного содержания белков в слюне человека (Вавилова Т.П., 2014).

Остальные 10% белков слюны представляют собой секрет эпителиальных клеток слизистой оболочки, мелких железок и микрофлоры полости рта; источники некоторых белков до сих пор не известны (Castagnola, 2012).

Показано, что большинство слюнных белков выделяются всеми крупными железами ротовой полости, но секреция некоторых из них осуществляется лишь ограниченной группой желез. Например, только околоушные железы секретируют основные пролин-богатые пептиды, цистатин S-типа выделяется подчелюстными и подъязычными железами, а кислые пролин-богатые белки и статзерин секретируется тремя железами, но в разных количествах (Messana, 2008).

Большинство белков слюны подвергается сложной пост-трансляционной модификации, которая может включать в себя гликозилирование, фосфолирирование, ацетилирование, убиквитинирование, дезаминирование, сульфатирование и протеолитический процессинг. Благодаря процессам модификации увеличивается структурное, а следовательно и функциональное, разнообразие протеома слюны, они имеют важное значение в оценке состояния и динамики слюны как биологической системы и состояния всего организма (Oppenheim, 2007; Helmerhorst, 2007).

Показано, что белковый состав слюны меняется в зависимости от состояния организма. Поскольку слюна является ульрафильтратом плазмы крови, определенные изменения её состава можно использовать в качестве диагностических признаков различных заболеваний, среди которых: злокачественные опухоли молочных желез, различных тканей в области головы и шеи; вирусные заболевания (ВИЧ, парентальные вирусные гепатиты). Также анализ состава слюнной жидкости в некоторых случаях может способствовать оценке психологического состояния больного или степени его наркотической зависимости (Schulz, 2013; Zhang, 2013).

**1.2****. Характеристика отдельных групп белков слюны**

**1.2.1. Альбумины слюны**

Альбумины - это основные белки плазмы крови, на их долю приходится больше половины сухого веса всех белков плазмы. Молекула альбумина состоит из одной полипептидной цепи отрицательно заряженной при физиологических условиях с молекулярной массой порядка 40–52 кДа. Альбумины можно обнаружить также и в смешанной слюне, но в данном случае эта группа белков не является количественно доминирующей, в отличие от белков фракции β–глобулинов.

В ротовую жидкость альбумины могут попадать не только из плазмы крови. Еще в 1997 году было показано, что секреция альбуминов в ротовую полость может осуществляться клетками эпителия, а также некоторыми группами микроорганизмов (Вавилова Т.П., 2014). По этой причине, количественные флуктуации альбуминов в слюне могут служить диагностическим признаком при некоторых патологических состояниях: например, их количество повышено относительно нормального при периодонтите и воспалении слюнных желез (Güliz, 2015).

Для большинства белков слюны плазматического происхождения, и альбумины не являются исключением, характерны возрастные изменения, вызванные, к примеру, присоединением различных лигандов, что сопровождается проявлением его модифицированных форм. Подобные изменения на молекулярном уровне, будучи не связанными с возрастом, могут, в том числе, служить диагностическим признаком различных патологий органов пищеварительной системы (Praffe, 2011). При заболеваниях полости рта и патологиях органов пищеварения содержание модифицированного альбумина в слюне повышается, например, при развитии катарального гингивита у детей его концентрация повышается в от 1,7 до 2,2 раза (Вавилова Т. П., 2014).

**1.2.2. Пролин-богатые белки слюны**

Околоушные железы в основном (порядка 70% от всего секрета) секретируют пролин-богатые белки (ББП — Белки Богатые Пролином). Молекулярная масса данной группы белков варьирует в пределах 6-12 кДа. При значении pH, соответствующему слюнной жидкости, эти белки можно поделить на три группы: кислые, основные (катионные) и нейтральные. Их относительное содержание в слюне подвержено возрастным изменениям: у детей в возрасте 6 месяцев в слюне появляются предшественники ББП, затем, приблизительно в возрасте полутора лет, в слюну начинают секретироваться функционально активные протеиназы, что приводит к появлению белков всех трех групп, однако их относительная концентрация все ещё варьирует. К примеру, основные ББП обретают стабильный уровень концентрации, соответствующий таковому у взрослого человека, лишь к 12 годам.

Кислые ББП могут адсорбироваться на поверхности эмали, и в данном случае являются компонентами приобретенной пелликулы зуба. Они функционируют в качестве своеобразного барьера: с одной стороны, они предотвращают преждевременную деминерализацию зуба, а с другой, будучи в комплексе с белком статзерином - излишнее осаждение минералов на поверхности эмали посредством образования связей при низких значениях pH с гидроксиапатитом. Таким образом, кислые ББП поддерживают постоянство количества кальция и фосфора в зубной эмали.

Нейтральные или гликозилированные ББП принимают участие в формировании и смачивании пищевого комка.

Функции основных ББП до сих пор остаются малоизученными. Известно, что они способны связывать танины пищи и таким образом защищают слизистую полости рта от их негативного действия. Помимо этого, предполагается, что присутствие белков данная группы в высокой концентрации придает вязкость и эластичность слюне (Вавилова Т.П., 2014).

**1.2.3. Тирозин-богатые белки**

Белки, богатые тирозином, или статзерины, представляют собой фосфопротеины с молекулярной массой 5,38 кДа, способные образовывать связи в N-концевой области с гидроксиапатитом зубной эмали; их секреция осуществляется околоушными слюнными железами. В их составе находится до 15% пролина и около 25% остатков кислых аминокислот. Они учувствуют в ингибировании отложения фосфорно-кальциевых солей на поверхности зубов, ротовой полости и в слюнных железах. Статзерины связывают кальций и препятствуют его осаждению и образованию гидроксиаппатитов в слюне еще в фазе образования затравки будущего кристалла. Так же вместе с гистатинами они способны подавлять рост аэробных и анаэробных бактерий. Статзерины могут принимать участие в формировании гетеротипных комплексов с муцином-1, α-амилазой, кислыми пролин-богатыми белками, которые защищают зубные ткани от повреждения (Вавилова Т.П., 2014).

**1.3. Антимикробные пептиды**

Антимикробные пептиды являются мажорными компонентами системы врожденного иммунитета, которые есть у многих животных: от беспозвоночных до млекопитающих (Zasloff, 2002; Dale, 2006; Martin, 2015).

У высших позвоночных до возникновения адаптивного иммунитета развилась относительно более простая и менее специфическая система защиты – врожденный иммунитет; у многих организмов она по-прежнему остается основной частью иммунной системы. Одним из основных действующих элементов врожденного иммунитета для защиты против патогенных грамположительных и грамотрицательных бактерий является группа катионных пептидов, получивших название антимикробные пептиды (АМП) (Akalin, 1993; Allaker, 1999; Allgrove, 2008). Механизмы действия АМП в основном связаны с нарушением структуры мембран микроорганизмов (Quinones-Mateu, 2003; Sinha, 2003; Wang, 2004; Yasin, 2004; Gordon, 2005a, b).

АМП широко представлены в организме человека: они содержатся в слюне, на поверхности эпителиальных оболочек, а также в определенных гранулах нейтрофилов. За счет их активности обеспечивается защита слизистых оболочек от патогенных микроорганизмов (Zasloff, 2002; Gordon, 2005a,b). Большинство антимикробных пептидов высших эукариот образуются путем протеолитического расщепления молекул-предшественников, и содержат сигнальную последовательность для посттрансляционной модификации (Dale, 2006).

### 1.3.1. Классификация антимикробных пептидов

Антимикробные пептиды представляют достаточно большой и разрозненный класс пептидов, поэтому существует несколько их классификаций, но самой распространённой является классификация по вторичной структуре молекулы пептида. Согласно данной классификации АМП делятся на следующие группы:

* Линейные, содержащие α-спирали,
* Содержащие дисульфитные связи, которые стабилизируют β-слои,
* Циклические или содержащие в своем составе петли
* С неупорядоченной структурой, насыщенные определенной аминокислотой (Boman, 2003).

### 1.3.2. Механизмы действия антимикробных пептидов

Известно, что механизм действия антимикробных пептидов обеспечивается в основном за счет их способности связываться с мембраной и разрушать ее, но в качестве мишеней могут служить и внутриклеточные компоненты. Так, действие дефенсинов, протегринов и кателицидина человека LL-37 опосредовано повреждением мембран бактерий, в то время как пептиды, богатые пролином, скорее всего, взаимодействуют с внутриклеточными мишенями (Brogden 2005; Jenssen, 2006;Yeaman, 2003).

За счет амфипатичности молекулы АМП способны встраиваться в липидные мембраны, тем самым нарушая их целостность. Процесс инактивации бактерий можно разделить на следующие этапы. На первом этапе молекулы АМП за счет электростатического взаимодействия связываются с мембраной бактерии: положительно заряженные аминокислоты АМП взаимодействуют с фосфатными группами тейхоевых и липотейхоевых кислот, которые находятся в клеточной оболочке грамположительных бактерий, и липополисахаридов грамотрицательных (Pasupuleti,2012). Второй этап – процесс проникновения молекулы АМП через бактериальную капсулу, состоящую из пептидогликана, еще не достаточно изучен. Следующий этап – это собственно нарушение структуры цитоплазматической мембраны микробной клетки за счет встраивания в нее молекул АМП, и, как следствие, гибель данной бактерии.

На сегодняшний день существует три модели, которые описывают мембранолитическое действие АМП: модель бочки, модель тора и ковровый механизм (Рис. 2).

Механизм бочки, или поры, характерен для АМП, которые токсичны в отношении эукариотических клеток и мало специфичны в отношении бактерий. При достижении определенной концентрации АМП на поверхности мембраны, молекулы пептида начинают встраиваться своими гидрофобными участками в липидный слой, а гидрофильные формируют внутреннюю поверхность образовавшийся поры. За счет этого клеточные компоненты вытекают наружу, и клетка погибает.

Модель тороидальной поры заключается в том, что молекулы адсорбированных на мембране пептидов формируют поры таким образом, что гидрофильные области молекул АМП электростатически связываются с головками фосфолипидов мембраны. Получается, что такие поры ориентированы вдоль плоскости мембраны.

Согласно ковровому механизму молекулы пептидов образуют своеобразный «ковер» на поверхности мембраны бактерии. Молекулы АМП адсорбируются на мембране бактерии параллельно ее поверхности, образовывая сплошной слой. Затем клеточная мембрана разрывается с образованием мицелл (Жаркова М. С., 2014; Naseem, 2015).

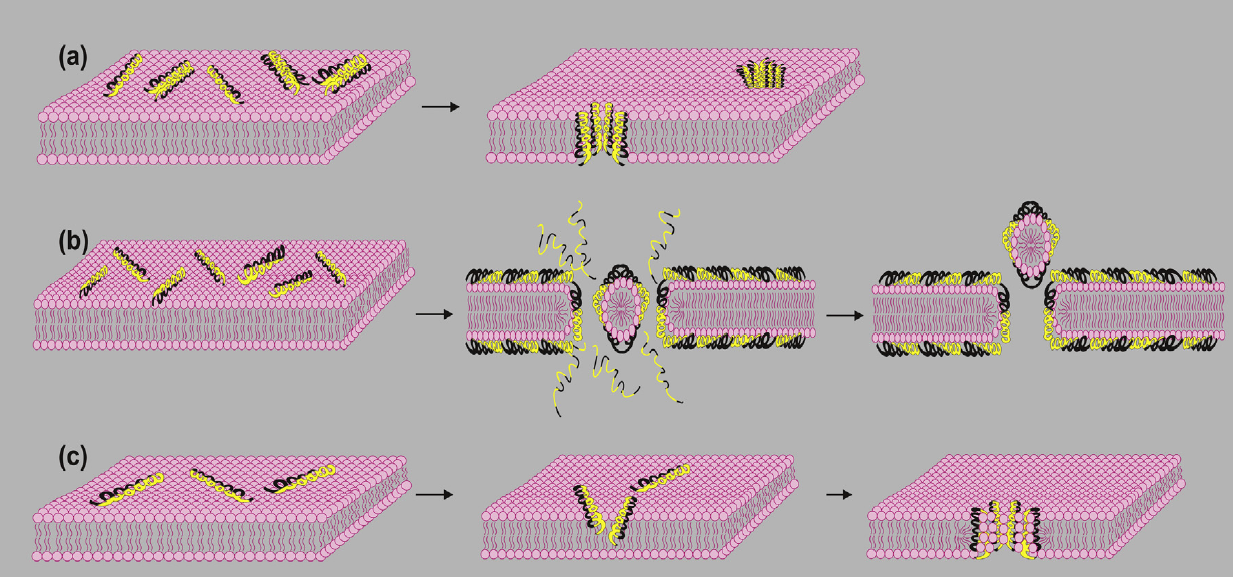


Рисунок 2. Различные механизмы влияния АМП на липидные мембраны бактерий. a – механизм бочки, b – ковровый механизм, с – механизм тороидальной поры (Naseem, 2015).

Так же некоторые АМП способны вызывать бактериальную гибель, не воздействуя на мембрану, а путем взаимодействия с внутриклеточными компонентами. АМП могут влиять на такие важные процессы как: синтез мембранных белков и ДНК, взаимодействие белков с ДНК, образование перекиси водорода, синтез клеточной стенки (DeSmet, 2005).

### 1.3.3. Другие биологические свойства АМП

Некоторые антимикробные пептиды способны оказывать антимикотическое действие, например, α- дефенсины, кателицидин LL-37 и гистатин-5 проявляют активность против грибов рода *Candida* (Naseem, 2015).

Антимикробные пептиды способны привлекать иммунокомпетентные клетки в очаг воспаления. Например, кателицидин человека LL-37 является хемоаттрактантом для Т-лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов. Так же АМП могут привлекать иммунные клетки в очаг посредством использования механизмов приобретенного иммунитета, активируя тучные клетки (Жаркова М. С., 2014).

Большинство мембранотропных АМП в концентрациях выше, чем то необходимо для проявления антимикробной активности, оказывает токсичное действие в отношении опухолевых, и, хотя и в меньшей степени, нормальных клеток организма.

Известно два механизма действия АМП на опухолевые клетки: пептиды способны образовывать неселективные ионные каналы в клеточной мембране (дефенсины) или проникать через последнюю и способствовать запуску апоптоза (Шамова О.В., 2007).

Причины селективности пептидов в отношении опухолевых клеток прояснены не полностью. В литературе высказывается два основных предположения: 1) во внешнем слое мембраны опухолевой клетки повышается содержание отрицательно заряженных фосфолипидов, что способствует взаимодействию с ними катионных пептидов (Жаркова М. С., 2014) и 2) за счет увеличения площади поверхности мембраны опухолевой клетки большее количество АМП способны к адсорбции не её мембране (Guiliani, 2007; Hoskin, 2008).

При лизисе большого числа бактерий в кровь попадает значительное количество компонентов их клеточных стенок, что может вызывать усиленный иммунный ответ. Показано, что АМП способны нейтрализовать данные эффекты путем взаимодействия со свободными липополисахаридами (эндотоксин грамотрицательных бактерий) и со свободными тейхоевыми и липотейхоевыми кислотами (эндотоксин грамположительных бактерий) (Жаркова М. С., 2014).

### 1.3.4. Антимикробные пептиды слюны человека

В слюне человека обнаружено несколько классов антимикробных пептидов: дефенсины, гистатины, кателицидины (LL-37).

*Дефенсины*. Это семейство коротких катионных пептидов с молекулярной массой 4-5 кДа, они содержат 6-8 остатков цистеина, которые способны образовать 3-4 внутримолекулярные дисульфидные связи (White, 1995). Дефенсины обладают антимикробной, антивирусной и антимикотической активностью (Ganz, 2003; Wang, 2004; Diamond, 2011).

Классификация дефенсинов основана на их вторичной структуре. Выделяют три подкласса дефенсинов: α-, β- и θ- дефенсины (Abiko, 2007; Greer, 2013).

Первые α-дефенсины были выделены из нейтрофилов человека и названы HNP-1 (human neutrophil peptides), HNP-2 и HNP-3 (Selsted, 1985). Данные три пептида имеют практически идентичную аминокислотную последовательность за исключением того, что HNP-1 и HNP-3 имеют по одному дополнительному аминокислотному остатку в N – концевой области: аланин и аспартат, соответственно. Несмотря на столь незначительную разницу в последовательности, за счет этих отличий изменяется спектр антимикробной активности дефенсинов. Известно, что HNP-3 менее активен, чем HNP-1 или HNP-2, в отношении грамотрицательных бактерий (Ganz, 1985). Дефенсин 4 (HNP-4) состоит из 33 аминокислотных остатков и так же содержится в нейтрофилах человека.

Дефенсины HNP-5 и HNP-6 обнаружены в клетках Панета тонкого кишечника и смешанной слюне (Gomes, 2010).

В норме в слюне больше всего HNP-1-3, в то время как содержание HNP-4 примерно в 100 раз ниже (Gabay, 1989). Концентрация HNP-1 повышается при заболеваниях полости рта. Также показано, что уровень HNP-1-3 понижен при отсутствии десневых выемок (Fanali, 2007).

Подкласс β-дефенсинов включает в себя 6 пептидов HBD 1-6. В основном они экспрессируются в эпителиальных клетках барьерных тканей, таких как кожа, слизистая рта, носа, дыхательных путей, мочеполовой системы и желудочно–кишечного тракта (Gorr, 2011). В слюне обнаружены только HBD 1-3. HBD -1,2 экспрессируются в надбазальном слое десны, а HBD-3 экспрессируется в недифференцированных эпителиальных клетках в базальном слое слизистой ротовой полости (Dale, 2001; Pisano, 2005). В связи с этим предполагают, что HBD-1 постоянно присутствует в ротовой жидкости, а HBD-2 и HBD-3 выделяется только в ответ на бактериальные липополисахариды и провоспалительные медиаторы (il-1b, TNF-α, IFN-c) и они более эффективно убивают патогенные микроорганизмы (Krisanaprakornkit, 1998).

*Гистатины,* или пептиды обогащенные гистидином*.* Это семейство слюнных низкомолекулярных катионных пептидов, секретируемых околоушными и подчелюстными железами. Они состоят из 7-38 аминокислотных остатков и содержат несколько остатков гистидина.

В слюне человека найдены три пептида данной группы: His-1, His-3 и His-5 (MacKay, 1984; Troxler, 1990). Они обладают противогрибковыми свойствами: способны ингибировать рост грибов рода *Candida*. К примеру, при синдроме Шегрена His-5 активно ингибирует рост таких патогенных микроорганизмов как *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, что препятствует развитию орального кандидоза (Raj, 1990). Этими же исследователями было показано, что средняя часть молекулы His-3 обладает такой же противогрибковой активностью, как и исходная молекула, в перспективе можно разработать пероральные мази с содержанием гистатинов для лечения кандидозов. Механизм действия гистатинов хорошо изучен и включает следующие стадии: адсорбция молекул пептида на мембране, проникновение через мембрану внутрь клетки, ингибирование митохондриального дыхания в клетке-мишени путем образования активных форм кислорода, что, в свою очередь, вызывает её гибель (Xu, 1991). Помимо этого они способны связывать ионы металлов в слюне (Bercieretal., 1999; Oudhoffetal., 2009). Так же His-5 обладает цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток.

*Кателицидины.* Это пептиды из группы линейных молекул, содержащих α-спирали. Общим для пептидов данного семейства является то, что молекула-предшественник содержит консервативный N-концевой участок, гомологичный белку кателину - ингибитору катепсина L (Lehrer, 2002; Kosciuczuk,2012).

В слюне, фагоцитах, эпителии дыхательных путей человека имеется лишь один представитель этого семейства – кателицидин LL-37 (Murakami,2002; Tecle, 2010). Кателицидины синтезируются и хранятся в секреторных пузырьках в виде молекул-предшественников и при вторжении патогенных микробов расщепляются протеазами на белок кателин и антимикробный пептид. LL-37 состоит из 37 аминокислотных остатков и содержит на N-конце два остатка лейцина (Zanetti, 2002).

LL-37 является хемоаттрактантом для моноцитов, нейтрофилов, тучных клеток и Т-лимфоцитов. Также кателицидин LL-37 человека имеет высокую активность против грамотрицательных, грамположительных бактерий, вирусов и грибов (Tanaka, 2000; Isogai, 2003; Lo' pez-Garcı'aetal., 2005).

*Статзерин.* Пептид, обогащенный гистидином, молекулярная масса которого составляет 5,4 кДа. Статзерин обнаружен в слюне и жидкости десневой бороздки (Pisano, 2005). Он секретируется подчелюстной и околоушной железами и ингибирует рост анаэробных бактерий в полости рта (Vitorino, 2004; Wilmarth, 2004; Denny, 2008).

*Хемокин С-С 28* состоит из 128 аминокислотных остатков и эксперессируется в различных эпителиальных клетках, включая клетки слюнных желез (Denny, 2008). С-концевой 28 аминокислотный хвост имеет сходство с гистатином-5 и обладает антимикробным действием в отношении большого спектра патогенов (Hieshima, 2003).

*Азуроцин* катионный антимикробный белок с молекулярной массой 37 кДа, содержащийся в азурофильных гранулах нейтрофилов. Он состоит из 251 аминокислотного остатка и обладает сильным антибактериальным действием в отношении грамотрицательных бактерий по причине наличие высокой аффинности к липополисахариду их капсул (Gorr, 2009; Dhaifalah, 2014).

*Нейропептиды*. В слюне так же обнаружены нейропетиды: нейропептид Y и вазоактивный интестинальный пептид (VIP) (Dawidson, 1997). Но их антимикробные действия ограничены, так как в слюне они содержатся в концентрации (от 2 до 45 пг/мл) на несколько порядков меньше, чем МИК против, например, грибов *Candida albicans* (Karim, 2008).

## 1.4. Пролин-богатые АМП

Несмотря на различие во вторичной структуре, все пролин-богатые антимикробные пептиды имеют схожие черты: большое содержание пролина (30-50%) и высокий суммарный положительный заряд молекулы из-за большого относительного количества остатков аргинина и лизина. Такие АМП были идентифицированы у организмов различных филогенетических групп, от беспозвоночных до млекопитающих. Данное семейство пептидов является основным классом АМП у насекомых. У млекопитающих пролин-богатые АМП широко распространены только у животных отряда парнокопытных, где составляют доминирующую группу АМП нейтрофилов. Пролин-богатые пептиды являются мажорным компонентом белков слюны различных отрядов млекопитающих.

Высокое содержание пролина в аминокислотной последовательности опосредует наличие особых свойств ПБП. Известно, что пролин-богатые пептиды вступают в белок-белковые взаимодействия с SH3-доменом, также часто называемым пролин-распознающим. Последний входит в состав многих белков (в том числе протеин-киназ), участвующих в ряде важнейших внутриклеточных сигнальных и регуляторных каскадов (Makrossian, 2004; Freund, 2008). Нарушения процесса связывания пептидов с SH-3 доменом данных белков может приводить к развитию таких заболеваний, как болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, а также ряду опухолевых образований (Roy, 2014, Niu, 2016).

Пролин-богатые пептиды врожденного иммунитета обладают антимикробной активностью преимущественно против грамотрицательных бактерий, некоторые АМП проявляют и хемотаксическое действие для клеток иммунной системы.

В отличие от большинства АМП, действие которых обусловлено их мембранотоксичностью, действие ПБП напрямую зависит от концентрации. Так, если последняя находится на низком уровне, близком к МИК, происходит нарушение процессов фолдинга белка посредством ингибирования функции шаперона DnaK (Podda, 2006). По последним данным (Scocchi, 2011; Zahn, 2014), однако, основной внутриклеточный механизм действия ПБП заключается в блокировании трансляции белка посредством инактивации рибосомального аппарата бактерий. При высоких концентрациях ПБП обретают способность к повреждению клеточной мембраны. Низкая резистентность бактерий к ПБП отчасти объясняется вариабельностью механизма действия в зависимости от концентрации, а также наличием как минимум нескольких внутриклеточных мишеней, связь с которыми нарушает базовые клеточные процессы, необходимые для нормальной жизнедеятельности бактерии.

### 1.4.1. Пролин-богатые пептиды слюны человека

У человека до сегодняшнего момента не было обнаружено ПБП в нейтрофилах. С другой стороны, они идентифицированы в секретах слюнных и слезных желез, эпителиальных клетках слизистой оболочки носоглотки и трахеи (Gorr, 2011). На сегодняшний день заболевания ротовой полости очень распространены, особенно у людей старшего возраста, что делает задачу нахождения условий максимальной функциональной активности данных пептидов крайне актуальной (Gulizet, 2015). Качественный состав микробиоты ротовой полости различных индивидов может быть в достаточной степени сходным, однако степень подверженности инфекциям, вызываемым одними и теми же группами организмов, варьирует. Многие исследования показывают, что одним из основных факторов, определяющим вышеуказанную вариабельность, являются флуктуации качественного и количественного состава АМП ротовой полости. Причем данная зависимость имеет сложную природу из-за эффекта синергичности: АМП могут взаимно усиливать антибактериальный эффект друг друга (Diamond, 2008).

Большинство обогащенных пролином пептидов человека по сути представляют собой фрагменты больших белковых молекул, которые подверглись протеолизу. ПБП в смешанной слюне являются мажорными компонентами и представлены тремя группами: катионные, анионные и гликозилированные пептиды (Schenkels, 1995).

Группа катионных белков включает в себя IB-1, IB-4, IB-6, IB-9, P-B, P-H, P-D, P-F и другие. Они представляют собой молекулы массой 10-40 кДа, которые при попадании в ротовую полость подвергаются протеолитическому расщеплению до фрагментов 8-25 аминокислотных остатков. Большинство протеаз, осуществляющих это превращение, имеют бактериальное происхождение (Helmerhorst, 2008).

Все перечисленные группы ПБП на настоящий момент являются плохо изученными.

Согласно данным (Amergonen, 2002) катионные ПБП способны к проявлению антимикотической активности, однако последняя низка по сравнению с таковой у АМП фагоцитов. Другой группой исследователей (Fabian, 2012) было показано, что протеолитический фрагмент p1932 белка, обогащенного пролином, проявляет антивирусную активность и может проникать в эукариотические клетки.

Поскольку в ротовой полости содержится большое количество эндогенных и экзогенных (бактериальных) протеаз, а белки-предшественники ПБП имеют много сайтов для протеолитического расщепления, в слюне происходит протеолиз ПББ с образованием фрагментов различного размера. Было проведено исследование данных фрагментов, которое показало, что не все из них способны к проявлению антимикробной активности (Trindade, 2014).

К сожалению, на данный момент количество работ, посвященных изучению ПБП, не столь обширно. Учитывая важность понимания фундаментальных основ функционирования защитных систем ротовой полости, изучение новых аспектов проявления биологической активности белков и пептидов слюны человека, в частности ПБП, является актуальным направлением биомедицинских исследований. Данное направление и стало основным в представленной квалификационной работе.

**2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

## 2.1. Получение и подготовка пробы слюны человека

Слюну получали методом сплевывания: в течение минуты испытуемый физиологически стимулировал слюноотделение с помощью активных движений языком и имитации процесса жевания, затем сплевывал в стерильную пробирку. Полученную пробу слюны пропускали через фильтр с размером пор 2 нм.

* 1. **Высокоэффективная жидкостная хроматография**

Полученную пробу слюны фракционировали, используя обращено-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ), на установке Gold System фирмы Beckman (США). Для разделения белков и пептидов слюны применяли колонку Vydac С-18 (4.6 x250 мм; 10 х 250 мм; диаметр частиц сорбента 5 мкм) с использованием линейного градиента концентрации вода – ацетонинтрил, в качестве противоиона использовалась 0,1% трифторуксусная кислота, скорость потока 1.5 мл/мин, объем фракций 1.5 мл. Фракции высушивали под вакуумом на установке SpeedVak фирмы Savant (США), затем растворяли в 0,01% уксусной кислоте. После этого анализировали антимикробную активность полученных проб и их белковый состав с помощью аналитического электрофореза и масс-спектрометрии.

* 1. **Электрофоретический анализ белков и пептидов**

**2.3.1. Электрофорез в кислой буферной системе в присутствии мочевины**

**Для анализа спектра катионных белков и пептидов в слюне человека использовали метод аналитического электрофореза в кислой буферной системе в присутствии мочевины (**Panyim, Chalkley, 1969**).**

**Для электрофореза использовали пластины полиакриламидного геля, которые имели размер** 80x100x0,75 мм и **следующий состав:** 12,5% акриламид (Sigma, США), 0,325% N,N-метилен-бис-акриламид (Sigma, США), 0,025% N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин (Sigma, США), 0,025% персульфат аммония (Sigma, США), 37,56% мочевина (Sigma, США), 7,8% уксусная кислота (Вектон, Россия). Полимеризация проходила в течение 45-60 минут. Электрофорез проводили в приборе фирмы Hoeffer (США). Раствор 5% уксусной кислоты (pH 2,2) использовали в качестве электродного буфера. Преэлектрофорез и электрофорез проводили в течении 60 минут, при напряжении 20 В/см длины пластины геля. Пробы разбавляли раствором, содержащим 9 М мочевину, 15% уксусную кислоту и 0,09 % метиленового зеленого в соотношении 2:1. За ходом электрофореза следили по продвижению красителя метиленового зеленого. После проведения электрофореза белки и пептиды в ПААГ окрашивали раствором, содержащим Кумасси бриллиантовый голубой G-250. Окрашивающий раствор содержал 0.1% Кумасси бриллиантового голубого G-250, 27% метанола и 5,7% формалина. Гели помещали в раствор на 20-30 минут, затем избыток красителя отмывали 5% раствором уксусной кислоты.

**2.3.2 Электрофорез в присутствии додецил сульфата натрия**

**Для оценки гетерогенности полученных проб после ОФ ВЭЖХ и приблизительного определения молекулярной массы содержащихся в них белков и пептидов использовали метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия** (Schägger, VonJagow, 1987). Электрофорез проводили в приборе фирмы Hoeffer (США).

Состав разделяющего геля был следующий: 16% акриламида, 0,5%-N,N’-метиленбисакриламида, 0,1% додецилсульфата натрия в 1М трис-HCl буфере, pH 8,45, 11% глицерина, 0,05%-N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамина, 0,05% персульфата аммония. Полимеризация геля проходила 50-60 минут.

Состав концентрирующего геля был следующий: 4% акриламида, 0,25% N,N’-метиленбисакриламида, 0,025% додецилсульфата натрия в 0,25М трис-HCl буфере, pH 8,45, 0,08% N,N,N’,N’-тетраметилэтилендиамина, 0,08% персульфата аммония. Полимеризация геля проходила 100-120 минут.

Раствор для проб содержал: 2% додецилсульфата натрия, 40мМ дитиотреитол, 7% глицерин в 80мМ трис-HCl буфере, pH 8,8. Перед электрофорезом пробы прогревали на водяной бане при 100ºС в течение пяти минут.

В качестве катодного буфера использовали раствор содержащий: 0,1% додецил сульфат натрия, 0,1 М трис-ОН, 0,1 М трицин, pH 8,25. В качестве анодного буфера использовали буфер трис-HCl0,2 М, рН 8,9.

Электрофорез проводили в пластинах размерами 80x100x0,75 мм, сила тока – 30 мА на гель, длительность 1,5-2 часа. За ходом электрофореза следили по продвижению красителя бромфенолового синего, который был добавлен в пробы. После электрофореза гели фиксировали в растворе 27%-го метанола и 5,7%-го формалина в течение 10-15 минут. Затем окрашивали раствором, содержащим Кумасси бриллиантовый голубой G-250, как описано выше.

Набор фирмы «Fermentas» использовали для определения приблизительной молекулярной массы белков и пептидов в пробах. Набор состоит из следующих белков:100кДа, 35кДа, 20кДа, 10кДа, 5кДа, 3,4кДа.

## 2.4. Методы оценки влияния белков и пептидов слюны на микроорганизмы

### 2.4.1. Оценка антимикробной активности методом серийных разведений в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы

Метод серийных разведений пептидов, содержащихся в слюне человека, в среде с микроорганизмом использовали для определения минимальной ингибирующей рост бактерий концентрации этих веществ. Использовали модификацию данного метода, предложенную Тосси и соавторами (Tossi et. al., 1998). Антимикробную активность изучали в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35р и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG511.

Бактерии с твёрдой питательной среды пересеивали в жидкую питательную среду – 2,1 % Бульон Мюллера-Хинтона (HiMеdia, Индия). После 18 часовой инкубации при температуре 37 С° в термостате на шейкере пересеивали в свежую питательную среду, затем инкубировали 2,5 - 3 часа, чтобы получить культуру микроорганизмов в логарифмической фазе роста. После этого измеряли оптическую плотность (ОD) полученной культуры на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 620 нм, в качестве раствора сравнения использовали 2,1% стерильный бульон Мюллера-Хинтона. Затем определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) по формуле: 1 × OD620 = 2.5×108 KOE/мл. Исходя из этого, культуру микроорганизмов разводили стерильным 2,1% бульоном Мюллера-Хинтона до концентрации 1∙105 КОЕ/мл.

Двукратные серийные разведения пептидов производили в 0,01 М натрий-фосфатном буфере рН 7,4 и вносили по 5 мкл в лунки планшета Терасаки. Затем туда же вносили по 5 мкл полученной суспензии микроорганизмов. Так же в экспериментах использовали два вида контролей: контроль среды (в лунки вносили буфер, не содержащий бактерии) и контроль бактерий (в лунки вносили суспензию микроорганизмов). Микрокамеры инкубировали при температуре 37 С в термостате в течение ночи (18-20 часов).

Результаты оценивали на следующий день. За минимальную ингибирующую рост бактерий концентрацию исследуемого пептида принимали наименьшую концентрацию вещества, при которой не наблюдалось роста бактерий в лунке, т.е. полностью ингибировался рост микроорганизмов. Окончательные результаты рассчитывали как медианы на основании данных трех независимых экспериментов, в каждом из которых делали по три опытные параллели проб.

**2.4.2. Оценка антимикробной активности белковых фракций в жидкой питательной среде, содержащей микроорганизмы**

Данный метод использовался для оценки антимикробной активности полученных фракций после ОФ ВЭЖХ. Антимикробную активность изучали в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35р и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG511.

Культуру микроорганизмов в логарифмической фазе роста получали по алгоритму описанному выше.

В лунки планшета Терасаки вносили по 5 мкл фракции полученной после ОФ ВЭЖХ, затем вносили 5 мкл полученной культуры микроорганизмов. В результате чего конечный объем фракций составлял 10 мкл. Использовали два вида контролей: контроль среды и контроль роста бактерий. Планшеты инкубировали в течение ночи в термостате при 37 С.

Регистрацию результатов проводили на следующий день, визуально оценивая рост бактерий в лунках камеры. Окончательные результаты рассчитывали как медианы из трех независимых экспериментов, в каждом из которых было по две параллели.

### 2.4.3Оценка совместного антимикробного действия исследуемых пептидов методом серийных разведений по принципу "шахматной доски"

Метод серийного разведения по принципу «Шахматной доски» (Orhanetal., 2005) использовали для выявления синергических эффектов при исследовании совместного действия пептидов слюны.

Оценку совместного действия пептидов проводили в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35р и грамположительной бактерии *Staphylococcus aureus* SG511.

Культуру микроорганизмов в логарифмической фазе роста получали аналогично описанному выше алгоритму для метода серийных разведений. Согласно методу «шахматной доски» одно из исследуемых веществ двукратно разводиться по горизонтали, а второе по вертикали. В результате этого в каждой лунке экспериментального планшета Терасаки получают определенную комбинацию концентраций исследуемых пептидов. В данной работе проводили упрощенный эксперимент, используя для второго вещества одну концентрацию.

В лунки микрокамеры Терасаки вносили по 2 мкл соответующих разведений исследуемых веществ в в 0,01 М натрий-фосфатном буфере рН 7,4. После этого в эти лунки добавляли по 4 мкл бактериальной суспензии, таким образом, конечный объём пробы составлял 8 мкл. Начальная концентрация исследуемого пептида равнялась МИК/2, а второго была постоянной и равнялась МИК/4.

Так же как и в методе серийных разведений использовали два вида контролей среды и бактерий.

Планшеты с пробами инкубировали в термостате при 37 С в течение ночи. Результаты оценивали на следующий день, не вооруженным глазом оценивали наличие или отсутствие роста бактерий в лунках микрокамеры. Индекс фракционных ингибирующих концентрация является показателем характера совместного действия веществ (Jacobs, 1999).

иФИК = ФИК A + ФИК B = [A]/[МИК A] + [B]/[МИК B], где где [А] и [В] – концентрации веществ А и В соответственно в их смеси (комбинации), ингибирующей рост бактерии.

При иФИК ≤ 0,5, совместное действие препаратов является синергическим, иФИК=1 аддитивным ;иФИК> 2 – антагонистическим.

* 1. **Масс-спектрометрия**

Масс-спектрометрия MALDITOF выполнялась в ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины». Данные любезно предоставлены д.х.н. Б.Л. Мильманом.

## 2.6 Статистическая обработка результатов

Значения минимальных ингибирующих концентраций и индексов фракционных ингибирующих концентраций препаратов, представлены как медианы, полученные по данным трех-пяти независимых экспериментов, в каждом из которых использовались две-три параллельные пробы.

**3.** **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

## 3.1 Исследование пептидного состава слюны

Чтобы определить, какие белки слюны вносят наибольший вклад в реализацию антимикробной защиты ротовой полости, было проведено разделение белков и пептидов слюны на фракции с помощью ОФ ВЭЖХ, а затем проведен электрофоретический анализ их белкового состава и оценка антимикробной активности. Пробу слюны пропускали через фильтр с диаметром пор 2 нм, а затем наносили ее на хроматографическую колонку. На рисунке 3 представлен профиль элюции белков и пептидов с колонки при проведении хроматографии.

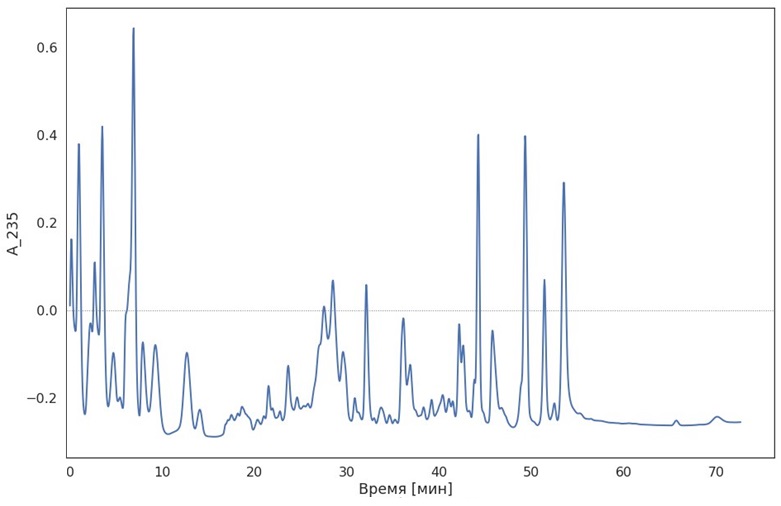


Рисунок 3. Профиль элюции белков и пептидов слюны с колонки при проведении ОФ ВЭЖХ (колонка VydacC-18, 25 x 1 см; линейный градиент концентраций ацетонитрила (с 0.1% ТФУ) 0 – 60%, 60 мин, 1.5 мл/мин).

Полученные фракции, высушили и перерастворили в воде с 0,01% уксусной кислотой, затем анализировали их электрофоретическую подвижность и антимикробную активность.

Для проведения электрофореза из фракций отбирали аликвоты по 15 мкл. С помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецил сульфата натрия оценили приблизительный состав фракций по молекулярной массе, сравнивая их с молекулярными массами маркерных белков (Рис. 4).



кДа

100

30

25

20

15

10

5

3,4

Рис. 4 А и Б электрофорограммы фракций после проведения электрофореза в присутствии додецил–сульфата натрия

|  |  |
| --- | --- |
| А  1 фракция №1  2 фракция №2  3 фракция № 16  4 фракция №17  5 фракция №18  6 фракция №20  7 фракция №21  8 фракция №22  9 фракция №24  10 фракция №25  11фракция №26  12 фракция №27  13 фракция №29  14 фракция №30  15 маркер молекулярных масс | Б  1 фракция №31  2 фракция №32  3 фракция № 35  4 фракция №36  5 фракция №38  6 фракция №39  7 фракция №41  8 фракция №42  9 фракция №43  10 фракция №44  11фракция №45  12 фракция №49  13 фракция №51  14 фракция №52  15 маркер молекулярных масс |

А

кДа

100

30

25

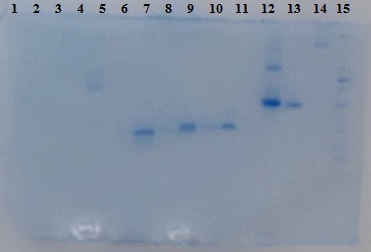
20

15

10

5

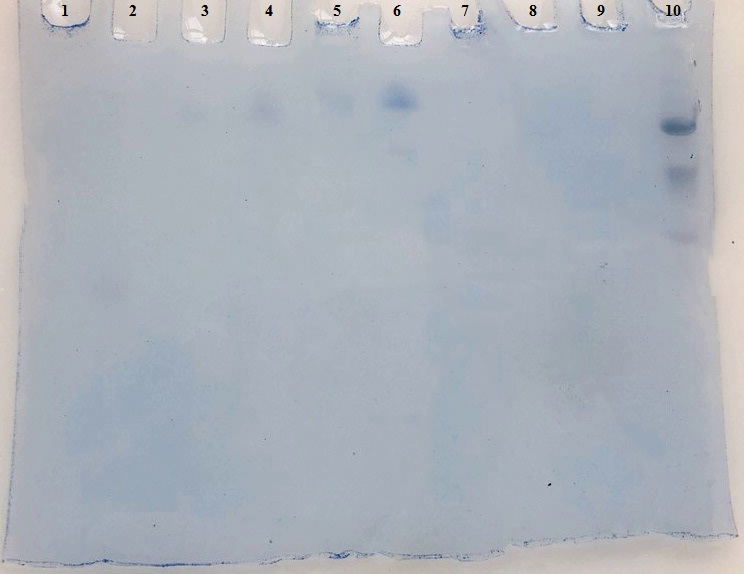
3,4



Б

По данным аналитического электрофореза в присутствии додецил-сульфата натрия в составе проб, где детектируется антимикробная активность, содержатся преимущественно пептиды и белки с молекулярными массами 3-16 кДа.

С помощью кислого электрофореза в присутствии мочевины оценивали электрофоретическую подвижность пептидов по направлению к катоду (Рис. 5). По данным электрофореза можно сделать вывод о том, что в некоторых фракциях, которые обладают антимикробной активностью, присутствуют компоненты, имеющие более высокую подвижность. На основании этого можно предположить, что у данных компонентов фракций более высокий суммарный положительный заряд.

Б

А

Рисунок 5. А и Б электрофорограммы фракций после электрофореза в кислой буферной системе в присутствии мочевины.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| А  1 фракция №38  2 фракция №39  3 фракция № 41  4 фракция №42  5 фракция №43 | 6 фракция №44  7 фракция №45  8 фракция №46  9 фракция№47  10 фракция № 49 | Б  1 фракция №50  2 фракция №51  3 фракция № 53  4 фракция №54 |
|  | |  |

Результаты масс-спектрометрического анализа представлены на рисунках 6 и 7. Во фракциях №1 - № 20 наблюдались слабые пики. К сожалению, получившееся пики не четкие, поэтому ошибка полученных данных примерно ± несколько десятков Да. В дальнейшем мы повторим эти эксперименты и более точно установим молекулярные массы.

На основании данных масс-спектрометрии видно, что каждая из полученных фракций содержит несколько компонентов. Установленные молекулярные массы занесли в сводную таблицу (Таблица 1).



Рисунок 6.Масс-спектры пептидов во фракциях 22- 35, полученных после разделения полипептидов слюны человека. Масс-спектрометрический анализ (MALDITOF) выполнялся в ФГБНУ «ИЭМ».

Рисунок 7.Масс-спектры пептидов во фракциях 36-49 , полученных после разделения полипептидов слюны человека. Масс-спектрометрический анализ (MALDITOF) выполнялся в ФГБНУ «ИЭМ».

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Номер фракции | 22 | 24 | 25 | 26 | 27 | 29 | 31 | 32 | 35 |
| Масса, Да | 3834.5  3981.2 | 3320.4  3720.1 | 3295.2  4009.3  4079.8  4206.6  4494.5 | 3498.6  3810.0  3937.0  4058.6  4250.4  4376.0  4532.6 | 3752.5  3931.0  4245.3  4373.5  4440.6  4528.9  4666.4 | 4193.0  4661.1 | 3804.7  4531.5  4605.9 | 3227.3  3736.7  3803.9  4332.4 | 3368.6  3933.1  4314.8 |
| Номер фракции | 36 | 38 | 39 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 49 |
| Масса, Да | 3366.6  4650.6 | 3666.1  3999.7 | 3295.0  3445.5  3601.3  4095.1  4513.0 | 3273.2  3304.4  3435.1  3618.1  3724.2  3827.5  4342.0  4434.2  4549.6 | 3253.1  3436.5  3678.3  4545.3 | 3254.7  3440.8  3588.1  3801.0  3972.3  4129.3 | 3313.0  3523.0  3638.9  399.4  3971.7  4189.5  4436.4  4611.2 | 3370.2  3523.6  3743.6  3878.5  4033.1  4189.7  4365.9  4611.6 | 3311.7  3585.8  3876.8  4030.8  4433.6  4607.4  5796.5  7153.6  9546.1  14300.8  21897.9  29067.6 |

Таблица 1. Сводная таблица данных масс-спектрометрии.

Показано, что в ряде фракций проявляется антимикробная активность в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (Схема 1 и 2). Номер фракции соответствуют минуте ее выхода с хроматографической колонки. Зеленым цветом отмечены активные фракции, то есть рост микробов в данных лунках микрокамеры не наблюдался, красным те лунки, где бактерии выросли – антимикробная активность не выявлялась. Фракции №1, №2, №22, № 25, №29, №41 и № 49 обладали антимикробной активностью против грамположительной бактерии *S. aureus* SG511, а фракции по номерами №2, №22, №29 и № 42 обладали активностью против грамотрицательной бактерии *E. coli* ML35p.

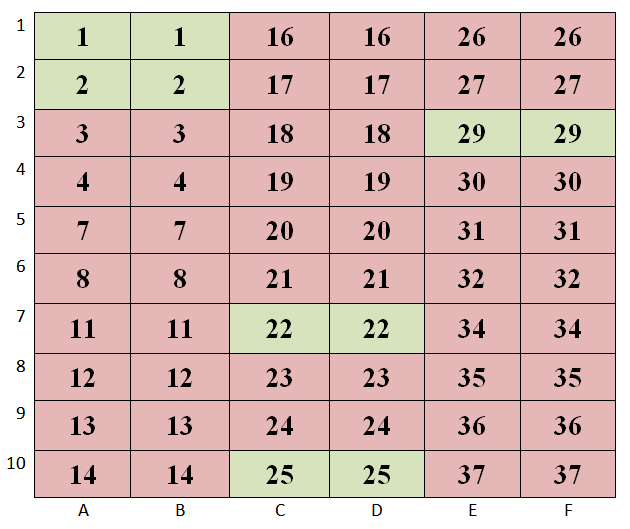


Схема 1*.* Схема камер Терасаки при проведении антимикробного теста в жидкой питательной среде (бульон Мюллера-Хинтона).

\*Номера соответствуют минуте выхода фракции с колонки. Зеленым цветом отмечены лунки, в которых рост бактерий не наблюдался, красным - где бактерии выросли.

Таким образом, были выявлены фракции, содержащие полипептиды, обладающие антимикробной активностью. Также перед нами стояла задача - определить какие пептиды могут содержаться в фракциях. По данным статей и баз данных (UniProt Knowlegebase и PDB – Protein Data Bank), а так же данных о массах протеолитических фрагментов белков слюны, которые любезно предоставила О.Н. Рогачева, был проведен поиск пептидов с соответствующими массами в полученных нами фракциях слюны.

Ниже приводятся массы описанных в литературе антимикробных пептидов, которые, как сообщалось, присутствуют в слюне:

**Альфа дефенсины**: HNP-1 - 3448 Da

HNP-2 – 3371 Da

HNP-3 – 3486 Da

**Бета дефенсины**: hBD1 – 3926 Da

hBD2 – 4325 Da

hBD3 – 5161 Da

**Катецилидины:** LL-37 – 4491 Da

Фрагмент LL-37 (KS27)-3326 Da

Фрагмент LL-37 (KS30)- 3343 Da

**Гистатины:** Гистатин-1 - 6962 Da

Гистатин-5 – 3036 Da

Лизоцим – 14297Da

Лактоферрицин – 3019 Da

**Пролин-богатые катионные полипептиды**:

IB1 9525 Da

IB6 11494 Da

Peptide P-H 5571 Da

Peptide P-D 6946 Da

Basic peptide P-F 5839 Da

Peptides IB9 and the same peptide P-D 6020 Da

**Протеолитические фрагменты пролин-богатых белков слюны**:

GNKPQGPPPPGKPQGPPAQGGSKSQSARAPPGKPQ 3383 Da

GNKPQGPPPPGKPQGPPAQGGSKSQSARAPPGKP 3256 Da

GPPPQGGNKPQGPPPPGKPQGPPAQGGSKSQSARAPPGK 3692 Da

GGNKPQGPPPPGKPQGPPAQGGSKSQSARAPPGKPQGP 3594 Da

QGGNKPQGPPPPGKPQGPPAQGGSKSQSARAPPGKPQG 3625 Da

QNLNEDVSQEESPSLIAGNPQGAPPQGGNKPQG 3358 Da

PQGPPQQEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRP 3965 Da

QGPPQQEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRP 3868 Da

GPPQQEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRPP 3837 Da

QGPPQQEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPR 3771 Da

GPPQQEGNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRP3740Da

GNNPQGPPPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGPPRPP 3200 Da

В результате анализа пептидного состава фракций мы предположили, что: во фракции № 25, возможно, содержится фрагмент ПББ; во фракциях № 26 , № 27, № 32, № 35 - hBD2 и фрагменты ПББ; во фракциях № 36, № 39, и № 44 - фрагменты ПББ; во фракции № 38 - бета-дефенсинhBD1; во фракциях № 41 и № 42 - альфа-дефенсинHNP-1, бета-дефенсин hBD-2, фрагмент LL-37 и фрагменты ПББ; во фракции № 45 - HNP-2 и фрагменты ПББ; во фракции № 49 - лизоцим, IB6 и фрагменты ПББ.

**3.2. Оценка антимикробной активности пептидов слюны человека**

* + 1. **Оценка антимикробной активности индивидуальных фракций пептидов**

Известно, что многие антимикробные пептиды демонстрируют синергическое антимикробное действие в комбинации с другими соединениями, даже если сами по себе вещества проявляют слабую активность.

В задачи нашей работы входило проверить имеется ли синергическое действие при совместном действии синтетических пептидов слюны и фрагмента 41-63 пролин-богатого белка P-F. Для анализа сочетанного антимикробного действия сначала определили активность индивидуальных фракций. Для этого использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде.

Пример эксперимента для определения минимальной ингибирующей концентрации гистатина-5 представлен на схеме 2, при двукратном разведении пептида. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию пептида, при которой видимого роста бактерии не было.

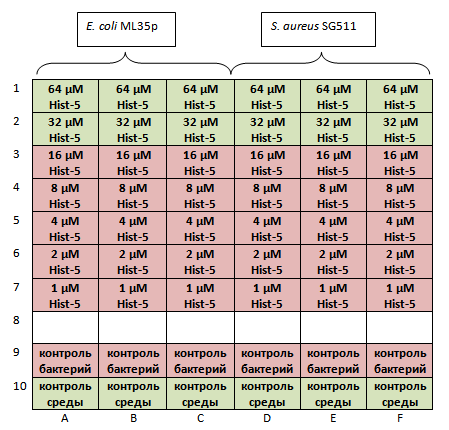


Схема 2. Схема камеры Терасаки при оценке антимикробной активности гистатина 5.

\*- Розовым цветом выделены лунки микрокамеры Терасаки, в которых наблюдался рост бактерий, зеленый цветом – лунки, где рост бактерий не наблюдался – в этих лунках пептид содержался в минимальной ингибирующей концентрации.

Было проведено четыре независимых эксперимента, в каждом из которых было по три параллели концентрации изучаемого вещества. В результате определили МИК гистатина–5 как значение медианы экспериментов, и она составляет 32 µМ для *E. coli* ML-35p и *S. aureus* SG-511.

Также определили минимальные ингибирующие концентрации кателицидина LL-37 и фрагмента пролин-богатого белка P-F (Таблица 2).

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вещество | МИК, µМ | |
| *S. aureus* SG-511 | *E. coli* ML-35p |
| Гистатин 5 | 32 | 32 |
| Кателицидин LL-37 | 32 | 16 |
| Фрагмент ПББ P-F\* | >64 | >64 |

Таблица 2. Антибактериальная активность синтетических пептидов слюны и фрагмента пролин-богатого белка P-F. Данные представлены как медианы трех-пяти независимых экспериментов.

\*-Фрагмент белка P-F:PPGKPQGPPPQGGSKSRSA

Полученные данные использовались для оценки совместного действия данных веществ.

* + 1. **Оценка совместного действия пептидов**

Для того чтобы оценить совместное действие пептидов использовали упрощённый метод «шахматной» доски: концентрация фрагмента пролин-богатого белка P-F была постоянной.

На рисунке 8 показан пример одного из опытов по оценке совместного действия кателицидина LL-37 и фрагмента пролин-богатого белка человека P-F (human polin-rich peptide – HPRP). Пептиды брали в концентрациях, в 2 и 4 раза ниже их МИК и оценивали результаты их совместного действия по формуле, приведенной ниже – для расчета индексов фракционных ингибирующих концентрации. Для каждого из сочетаний было проведено три независимых опыта, по три параллели для каждой из исследуемых комбинаций.

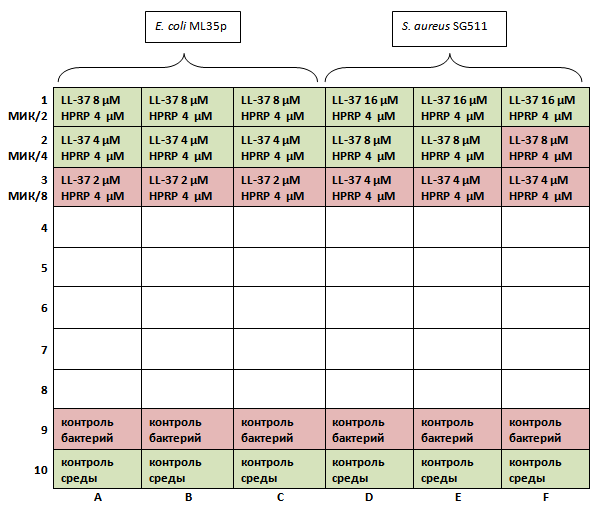


Рисунок 8. Пример одного из опытов по оценке совместного действия кателицидина LL-37 и фрагмента пролин-богатого белка человека P-F (human polin-rich peptide – HPRP). Пептиды брали в концентрациях, в 2 и 4 раза ниже их МИК. Представлена схематически камера Терасаки, куда вносили пептиды и бактерии в жидкой питательной среде.

Для определения характера взаимодействия исследуемых веществ используют индекс фракционной ингибирующей концентрации (иФИК), который рассчитывается по формуле:

иФИК = ФИК A + ФИК B = [A]/[МИК A] + [B]/[МИК B],

где [А] и [В] – концентрации веществ А и В, соответственно в их смеси (комбинации), ингибирующей рост бактерии.

Если иФИК≤ 0.5 совместно действие веществ является синергическим, т. е. соединения усиливают антимикробный эффект друг друга; если 0.5<иФИК≤1- взаимодействие препаратов является аддитивным, т. е. антимикробный эффект веществ аддитивно складывается; если 1<иФИК≤2 – взаимодействие индифферентное, т. е. эффекты веществ не зависят от присутствия друг друга; если иФИК> 2 – взаимодействие антагонистическое эффект веществ в комбинации снижается (Jacobs. 1999).

Пример расчета иФИК для комбинации

Таким образом, кателицидин LL-37 в комбинации с фрагментом пролин-богатого белка оказывает синергический эффект в отношении грамотрицательной бактерии *E.coli* ML35p.

Рассчитанные данные иФИК представлены в таблице 3.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Комбинации | иФИК | |
| *S. aureus* SG511 | *E. coli* ML35p |
| LL-37 + HРRP\* | 0,31 | 0,31 |
| Hist 5 + HРRP\* | 0,31 | 0,56 |

Таблица 3. Индексы фракционной ингибирующей концентрации для сочетанного действия синтетических пептидов слюны и фрагмента пролин-богатого белка.

\*-Фрагмент белка P-F:PPGKPQGPPPQGGSKSRSA

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что при использовании комбинаций кателицидина и фрагмента ПББ P-F наблюдаются синергические эффекты совместного антимикробного действия в отношении *E. coli* ML35p и *S. aureus* SG511, а комбинации гистатина 5 и фрагмента P-F – в отношении *S. aureus* SG511.

**4.** **ОБСУЖДЕНИЕ**

В защите ротовой полости от патогенных микробов принимают участие различные факторы, в том числе белки и пептиды. В состав слюны входят ферменты-протеазы, в результате реализации активности которых белки слюны дают начало многообразным пептидным молекулам. Кроме эндогенных протеиназ, в слюну могут поступать и бактериальные ферменты, которые тоже вносят вклад в формирование новых пептидов. В ротовую полость секретируются и специализированные защитные соединения – антимикробные пептиды (АМП), которые продуцируются эпителиальными клетками и нейтрофилами, причем концентрация АМП существенно повышается при инициации инфекционного процесса.

Инфекции ротовой полости – различные виды стоматита, глоссита, гингивит и др. - представляют в настоящее время серьезную проблему в связи с участившимися случаями снижения иммунной функции организма, вызванного разными причинами. Поэтому исследование факторов, принимающих участие в противоинфекционной защите, является важной задачей биомедицины. Результаты такого исследования могут, как объяснить причины нарушений защитных функций и развития патологии, так и помочь в создании новых средств для обработки полости рта на основе пептидов слюны.

В дипломной работе нами были проанализированы компоненты слюны, обладающие антимикробными свойствами. Особое внимание уделялось исследованию возможности участия пролин-богатых белков и их фрагментов в обеспечении защитных функций, так как описанные в литературе пролин-богатые пептиды (ПБП) нейтрофилов животных обладают высокой антимикробнй активностью. Однако, антимикробные свойства ПБП слюны человека остаются малоизученными. Не известно также, оказывают ли ПБП слюны какое-либо влияние на антибактериальные свойства известных антимиробных пептидов, содержащихся в слюне (кателицидина, дефенсинов, гистатинов)

**Целью** данного исследования была оценка антимикробной активности белков и пептидов слюны человека, а также анализ сочетанного антибактериального действия синтетических аналогов пептидов, содержащихся в слюне.

Чтобы выяснить, какие компоненты жидкой среды ротовой полости обладают антибактериальным действием, нами было проведено фракционирование полипептидов слюны с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с последующим анализом антимикробных свойств полученных фракций. Оказалось, что в числе 53 фракций активность выявляется в восьми. При анализе белков, содержащихся в этих фракциях, установлено, что в ряде проб присутствуют пептиды с высокой электрофоретической подвижностью по направлению к катоду в кислой среде, то есть, очевидно, имеющие высокий суммарный положительный заряд молекул (например, во фракции 49). По данным электрофореза в присутствии додецил-сульфата натрия, в состав активных фракций входят белки и пептиды с молекулярными массами 3-16 кДа. Чтобы сделать предположение, что именно за пептиды имеются в этих пробах, проведен масс-спектрометрический их анализ и сравнение полученных данных с данными литературы о массах антимикробных пептидов человека. Наше внимание было сконцентрировано, в основном на полипептидах с молекулярными массами 3-5 кДа и 6-14 кДа. Белки с массами более 15 кДа не рассматривали, так как это требовало более сложных подходов для проведения масс-спектрометрического анализа, а также не входило в задачи нашей работы, направленной на исследование антибиотических пептидов, массы которых обычно не превышают 5 кДа. Единственным интересующим нас полипептидом, имеющим относительно более высокую молекулярную массу, был лизоцим, роль которого в обеспечении защитных функций различных биологических жидкостей хорошо известна.

На основании полученных данных нами было сделано предположение, что в состав фракций слюны, обладающих антимикробной активностью, входят альфа-дефенсины (HNP-1), бета-дефенсины (hBD2), лизоцим, кателицидин LL-37, фрагменты катионных пролин-богатых белков. Получение индивидуальных фракций данных ПБП и изучение их антимикробных свойств войдет в задачи нашей дальнейшей работы.

Чтобы выяснить, могут ли ПБП слюны влиять на проявление антимикробных свойств АМП, нами было исследовано сочетанное действие химически синтезированного фрагмента пролин-богатого белка P-F с антимикробными пептидами - кателицидином человека LL-37 или гистатином 5. Хотя активность исследуемого ПБП была слабовыраженной, но при его совместном действии с кателицидином, как и с гистатином 5, наблюдалось синергическое антибактериальное действие, в результате которого значительно повышались антибактериальные свойства кателицидина и гистатина 5. Полученные данные позволяют предположить, что пролин-богатые пептиды слюны человека могут участвовать в обеспечении антимикробной защиты ротовой полости, повышая эффективность действия антимикробных пептидов врожденного иммунитета. С практической точки зрения эти результаты работы могут иметь значение при создании различных средств обработки ротовой полости, способствующих повышению антибактериального действия эндогенных защитных систем организма.

**ВЫВОДЫ**

# По данным аналитических электрофорезов, показано, что в составе фракций, полученных после ОФ ВЭЖХ, детектируются белки и пептиды с суммарным положительным зарядом и с молекулярными массами 3-16 кДа.

1. В составе фракций, полученных после хроматографического разделения белков слюны человека, имеются пробы, содержащие белки с высокой антимикробной активностью в отношении грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML35p и грамположительной *Staphylococcus aureus* SG511.
2. Данные полученные с помощью аналитического электрофореза в присутствии додецил-сульфата натрия, подтверждаются результатами масс-спектрометрического анализа, на основании которого можно предположить, что фракции, в которых детектируется антимикробная активность, включают дефенсины HNP-1, hBD2, лизоцим, кателицидин LL-37, фрагменты катионных пролин-богатых белков.
3. Анализ сочетанного антимикробного действия синтетических аналогов пептидов, которые по данным литературы, присутствуют в слюне человека, показал, что при применении комбинации кателицидина или гистатина-5 и фрагмента ПББ P-F наблюдаются синергические эффекты совместного антимикробного действия в отношении *E. coli* ML35p и *S. aureus* SG511.

Таким образом, на основе полученных данных можно предположить, что одним из важных факторов, обеспечивающих антимикробную защиту ротовой полости, является совместное действие антимикробных пептидов врожденного иммунитета (АМП), а также АМП и фрагментов пролин-богатых катионных белков слюны.

.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вавилова Т. П., Янушев О.О., Островская И. Г. Слюна. Аналитические возможности и перспективы. // Издательство БИНОМ, 2014. – 312с.
2. Жаркова М. С.,Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. АНТИМИКРОБНЫЕПЕПТИДЫМЛЕКОПИТАЮЩИХ: КЛАССИФИКАЦИЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯРОЛЬ, ПЕРСПЕКТИВЫ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ. // Вестник СПбГУ. Сер. 3. 2014. Вып. 1 УДК 577.1; 615.281.9
3. Колесов С.А., Коркоташвили Л.В., Широкова Н.Ю. и др. Концентрация эпидермального фактора роста в биосубстратах и количество макрофагов при заживлении дефекта у детей и подростков с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки // Клиническая лабораторная диагностика. 2010. № 11. С. 11.
4. Кокряков В.Н. Очерки о врожденном иммунитете. // СПб.: Наука, 2006. 261 с.
5. Кочурова Е.В., КозловС. В. Диагностическиевозможностислюны. // Клиничсекая лабораторная диагностика 2014. Vol. 1 F13-5
6. Шамова О. В., Сакута Г.А., Орлов Д. С., Зенин В.В. и др.Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре. // Жур. Цитология Том 49, 2007.
7. AbikoY., SaitohM., NishimuraM., YamazakiM., SawamuraD., KakuT. Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. // Med. Mol. Morphol, 2007. Vol. 40 (4) P. 179–184.
8. Amado F.M.,Vitorino R.M., Domingues P.M. et al. Analysis of the human saliva proteome // Expert. Rev. Proteomics. 2005. Vol. 2. № 4. P.521
9. Akalin F.A., Bulut S., Yavuzyilmaz E. Beta 2-microglobulin levels in serum and saliva of patients with juvenile periodontitis. //J. Nihon Univ. Sch. Dent1993. Vol. 35 (4) P. 230–234
10. Allaker R.P., Zihni C., Kapas S. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedull in on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. //FEMS Immunol. Med. Microbiol, 1999. Vol. 23 (4) P. 289–293.
11. Allgrove J.E., Gomes E., Hough J., Gleeson M. Effects of exercise intensity on salivary antimicrobial proteins and markers of stress in active men.//J. Sports Sci. 2008Vol. 26 (6) P. 653–661.
12. Amerongen A., Veerman V. Saliva - the defender of the oral cavity // Oral Diseases., 2002. Vol. 8. P. 12-22.
13. Bercier J.G., Al-Hashimi I., Haghighat N., Rees T.D., Oppenheim, F.G. Salivary histatins in patients with recurrent oral candidiasis. // J. Oral Pathol. Med., 1999. Vol. 28 (1) P. 26–29.
14. Boman H. G. Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts  // J. Inter. Med. 2003. Vol. 254. P. 197–215.
15. Brogden, K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?.// Nat. Rev. Microbiol. , 2005. Vol. 3 (3) P. 238–250.
16. Carpenter GH. The secretion, components, and properties of saliva. //Annu Rev Food Sci. Technol 2013. Vol. 4 F267–76.
17. Castagnola M., Cabras T., Iavarone F., Fanali C., Nemolato S., Peluso G. et.al. The human salivary proteome : a critical overview of the results obtained by different proteomic platforms. //Expert Rev. Proteomics 2012. Vol. 9(1) P. 33-46
18. Castagnola M., Picciotti P.M., Messana I., Fanali C., Fiorita A., Cabras T., et al. Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. //Acta Otorhinolaryngol Ital 2011. Vol. 31 P. 347–57
19. Cuevas-Córdoba B., Santiago-García J. Saliva: a fluid of study for OMICS // OMICS. 2014. Vol. 18. № 2. P. 87.
20. Dale B.A., Tao R., Kimball J.R., Jurevic R.J. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries. // BMC Oral Health 6 (Suppl. 1), S13, 2006.
21. Dale B.A., Krisanaprakornkit S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. // J. Oral Pathol. Med, 2001. Vol. 30 (6) P. 321–327.
22. Dawidson I., Blom M., Lundeberg T., Theodorsson E., AngmarMansson B. Neuropeptides in the saliva of healthy subjects. // Life Sci., 1997. Vol. 60 (4–5) P. 269–278.
23. De Smet K., Contreras R. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. // BiotechnolLett, 2005 Vol. 27 F1337–47
24. Denny P., Hagen F.K., Hardt M., Liao L., Yan W., Arellanno M., Bassilian, Set al. The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. // J. Proteome Res., 2008Vol. 7 (5) P. 1994–2006.
25. Diamond G., Beckloff N., Ryan L.K. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. // J Dent Res., 2008. Vol. 87(10) P. 915-927.
26. Diamond G., Ryan L., 2011. Beta-defensins: what are they really doing in the oral cavity?.//Oral Dis. Vol. 17 (7) P. 628–635.
27. Dhaifalah I., Andrys C., Drahosova M., Musilova I., Adamik Z., Kacerovsky, M.Azurocidin levels in maternal serum in the first trimester can predict preterm prelabor rupture of membranes. // J. Matern. Fetal Neonatal. Med., 2014. Vol. 27 (5) P. 511–515.
28. Fabian T., Hermann P., Beck A., Fejerdy F, Fabian G. Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity // Int J Mol Sci., 2012 Vol. 13(4) P. 4295–4320
29. Fanali C., Inzitari R., Cabras T., Pisano E., Castagnola M., Celletti R., Manni A., Messana I. Alpha-defensin levels in whole saliva of totally edentulous subjects. // Int. J. Immunopathol. Pharmacol, 2007. Vol. 21 (4) P. 845–849.
30. Freund C.Schmalz H.G. Sticht J. KuhneR. Proline-rich sequence recognition domains (PRD): ligands, function and inhibition.// Handb. Exp. Pharmacol., 2008. Vol. 186 P. 407-429.
31. Gabay J.E., Scott R.W., Campanelli D., Griffith J., Wilde C., Marra M.N., Seeger M., Nathan C.F. Antibiotic proteins of human polymorphonuclear leukocytes. // Proc. Natl. Acad. Sci., 1989. Vol. 86 (14) P. 5610–5614.
32. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. // Nat. Rev. Immunol, 2003. Vol. 3 (9) P. 710–720.
33. Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S., DaherK., Bainton D.F., Lehrer R.I.Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. J. Clin. Invest, 1985. Vol. 76 (4) P. 1427.
34. Giuliani A., Pirri G., Fabiole S., Nicoletto S. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics // Central European Journal of Biology, 2007. Vol. 2. P. 1-33
35. Gomes Pde, S., Fernandes, M.H. Defensins in the oral cavity: distribution and biological role.//J. Oral Pathol. Med, 2010 Vol. 39 (1) P. 1–9.
36. Gordon Y.J., Huang L.C., Romanowski E.G., Yates K.A., Proske R.J., McDermott A.M. Human cathelicidin LL-37, a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. // Curr. Eye Res., 2005a. Vol. 30 (5) P. 385–394.
37. Gordon Y.J., Romanowski E.G., McDermott A.M. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. // Curr. Eye Res., 2005b. Vol. 30 (7) P. 505–515.
38. Gorr S.-U. Antimicrobial peptides in periodontal innate defense. // 2011
39. Gorr S.U. Antimicrobial peptides of the oral cavity. // Periodontology,2009. Vol. 51P. 152–180.
40. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease // J ClinPeriodontol., 2011. Vol. 38 Suppl 11:126-41
41. Greer A., Zenobia C., Darveau R.P. Defensins and LL-37: a review of function in the gingival epithelium. // Periodontology 2000 , 2013. Vol.63 (1) P. 67–79
42. Guliz N.G., Dogukan Y. ,EijaK, Gursoy U.SalivaryAntimicrobial Peptides in Early Detection of Periodontitis Front. //Cell.Infect.Microbiol,2015, 5:99.
43. Huq NL, Cross KJ, Ung M, Myroforidis H, Veith PD, Chen D, et al. A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. //Int J Pept Res Ther 2007. Vol. 13 F547–64.
44. Helmerhorst E.J., Oppenheim F.G. Saliva: a dynamic proteome // J. Dent. Res. 2007. Vol. 86. № 8. P. 680.
45. Helmerhorst E.J., Sun X Salih E, Oppenheim F.G. Identification of Lys-Pro-Gln as a novel cleavage site specificity of saliva-associated proteases.// J. Biol.Chem. 2008 Vol. 283 P. 19957–19966.
46. Hieshima K., Ohtani H., Shibano M., Izawa D., Nakayama T., Kawasaki, Y., Shiba, F., Shiota M., Katou F., Saito T., Yoshie O. CCL28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity.//J. Immunol., 2003. Vol. 170 (3) P. 1452–1461.
47. Hoskin D., Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides // BiochimBiophys Acta,2008. Vol. 1778. P. 357-375.
48. Isogai, E., Isogai, H., Matuo, K., Hirose, K., Kowashi, Y., Okumuara, K., Hirata, M., Sensitivity of genera Porphyromonas and Prevotella to the bactericidal action of Cterminal domain of human CAP18 and its analogues. // Oral Microbiol. Immunol., 2003b Vol. 18 (5) P. 329–332.
49. Jenssen H., Hamill P., Hancock R. Peptide Antimicrobial Agents // Clinical Microbiology Reviews, 2006. Vol. 19 P. 491-511.
50. KarimE.I., LindenI.A, OrrG.J., LundyD.F. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of microorganisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. //J. Neuroimmunol, 2008. Vol. 200 (1–2) P. 11–16.
51. Kosciuczuk, E.M., Lisowski P., Jarczak J., Strzalkowska N., Jozwik A., Horbanczuk J., Krzyzewski J., Zwierzchowski L., Bagnicka E. Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. // A review. Mol. Biol. Rep., 2012. Vol. 39 (12) P. 10957–10970.
52. Krisanaprakornkit S., Weinberg A., Perez C.N., Dale B.A.. Expression of the peptide antibiotic human b-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. // Infect. Immun., 1998Vol. 66 (9) P.4222–4228.
53. Lehrer R.I., Ganz T. Cathelicidins: a family of endogenous antimicrobial peptides. // Curr. Opin. Hematol., 2002. Vol. 9 (1) P. 18–22
54. Lo´pez-Garcı´a B., Lee P., YamasakiK., Gallo R.L. Antifungal activity of cathelicidins and their potential role in Candida albicans skin infection. //J. Invest. Dermatol., 2005. Vol. 125 (1) P.108–115.
55. MacKay B., Pollock J., Iacono V., Baum B. Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. // Infect. Immun., 1984.Vol. 44 (3) P. 688–694.
56. Markossian K.A. Zamyatnin A.A.Kurganov B.I. Antibacterial proline-rich oligopeptides and their target proteins. // Biochem (Mosc)., 2004. Vol. 69 P. 1082-1091
57. Martin E.,Cardot Michel A., Raynal B., Badiou C., Laurent, F.Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Dumitrescu, O. Community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus strain USA300 resists staphylococcal protein A modulation by antibiotics and antimicrobial peptides.//Int. J. Antimicrob. Agents 2015. Vol.45 (1) P. 19–24
58. Messana I., Cabras T., Pisano E. et al. Trafficking and postsecretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides: a proteomics approach // Mol. Cell. Proteomics. 2008. Vol. 7. № 5. P. 911.
59. Murakami M., Ohtake T., Dorschner R., Gallo R. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. // J. Dent. Res., 2002. Vol. 81 (12) P. 845–850.
60. Naseem M.,Khurshid Z., Sheikh Z., Najeeb S.,Shahab S.,Sohail M.Z. Oral antimicrobial peptides: Types and role in the oral cavity. // Saudi Pharmaceutical Journal 2015 (2016) Vol. 24 P. 515–524
61. NiuK ., Shao Z., Zhao L. LASP1-S100A11 axis promotes colorectal cancer aggressiveness by modulating TGF.//Smad signaling. Sci Rep., 2016. Vol.16. - 6:26112 .
62. Oppenheim F.G., Salih E., Siqueira W.L. et al. Salivary proteome and its genetic polymorphisms // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007. F1098:22.
63. Oudhoff M.J., van den Keijbus P.A., Kroeze K.L., Nazmi K., Gibbs S., Bolscher J.G., Veerman E.CHistatins enhance wound closure with oral and non-oral cells. //J. Dent. Res., 2009. Vol. 88 (9) P. 846–850.
64. PasupuletiM., SchmidtchenA., Malmsten M. Antimicrobial peptides: key components of the innate immune system // Critical reviews in biotechnology, 2012. Vol.32 (2). P. 143-171
65. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. // ClinChem 2011. Vol. 57 F675–87
66. Pisano E., Cabras T., Montaldo C., Piras V., Inzitari R., Olmi C., Castagnola M., Messana I. Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS.// Eur. J. Oral Sci., 2005. Vol. 113 (6) P. 462–468.
67. Podda E., Benincasa M., Pacor S., Micali F., Mattiuzzo M., Gennaro R., Scocchi M. Dual mode of action of Bac7, a proline-rich antibacterial peptide // BiochimicaBiophysicaActa., 2006. Vol. 1760 P. 1732-41700.
68. Quinones-Mateu M.E., Lederman M.M., Feng Z., Chakraborty B., Weber J., Rangel H.R., Marotta M.L., Mirza M., Jiang B., Kiser P., Medvik K., Sieg S.F., Weinberg A. // Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. AIDS 17 2003. Vol. 16 P. 39–48.
69. Raj P.A., Edgerton M., Levine M. Salivary histatin 5: dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity.//J. Biol. Chem., 1990. Vol. 265 (7) P. 3898–3905.
70. Roy K., Chakrabarti O., Mukhopadhyay D. Interaction of Grb2 SH3 domain with UVRAG in an Alzheimer‟s disease-like scenario. // Biochem Cell Biol., 2014. Vol. 92(3) P. 219-25.
71. RuhlS. Thescientific exploration of saliva in the post-proteomic era: from database back to basic function. // Expert Rev. Proteomics. 2012. Vol. 9(1) P. 85-96
72. Scocchi M., Tossi A., Gennaro R. // Cell. Mol. Life Sci., 2011. Vol. 68. P. 2317–2330.
73. Schulz B.L., Cooper-White J., Punyadeera C.K. Saliva proteome research: current status and future outlook // Crit. Rev. Biotechnol. 2013. Vol. 33. № 3. P. 246
74. Schenkels L., Veerman E., Nieuw A. Biochemical Composition of Human Saliva in Relation To Other Mucosal Fluids // Crit. Rev. Oral. Biol. Med.,1995. Vol. 6. P. 161-175.
75. Selsted M.E., Harwig S., Ganz T., Schilling J.W., Lehrer R. Primary structures of three human neutrophil defensins. // J. Clin. Invest., 1985. Vol. 76 (4) P. 1436.
76. Sinha S., Cheshenko N., Lehrer R.I., HeroldB.C.. NP-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. //Antimicrob. Agents Chemother. , 2003 Vol. 47 (2) P. 494–500.
77. Spelmann N., Wong D.T. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. // Oral Dis. 2011.Vol. 17(4) F 345-54
78. Tanaka D., Miyasaki K., Lehrer R. Sensitivity of Actinobacillusactinomycetemcomitans and Capnocytophaga spp. to the bactericidal action of LL-37: a cathelicidin found in human leukocytes and epithelium.//Oral Microbiol. Immunol., 2000. Vol. 15 (4) P. 226– 231.
79. Tecle T., Tripathi S., Hartshorn K.L Review: defensins and cathelicidins in lung immunity. //Innate Immun., 2010.Vol. 16 (3) P. 151– 159.
80. Trindade F, Amado F, Pinto da Costa J, Ferreira R, Maia C, Henriques I, Colaco B, Vitorino R. Salivary peptidomic as a tool to disclose new potential antimicrobial peptides. JProteomics., 2015. Vol. 6:115 P.49-57.
81. Vitorino R., Lobo M.J., Ferrer-Correira A.J., Dubin J.R., Tomer K.B., Domingues P.M., Amado F.M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. // Proteomics 4., 2004. Vol.4 P. 1109–1115.
82. Wang W., Owen S.M., Rudolph D.L., Cole A.M., Hong T., Waring A.J., Lal R.B., Lehrer R.I. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. //J. Immunol,2004. Vol. 173 (1) P. 515–520.
83. White S.H., Wimley W.C., Selsted M.E. Structure, function, and membrane integration of defensins. //Curr. Opin. Struct. Biol, 1995. Vol.5 (4) P. 521–527.
84. Xu T., Levitz S., Diamond R., Oppenheim F. Anticandidal activity of major human salivary histatins. // Infect. Immun., 1991. Vol. 59 (8) P. 2549–2554
85. Yasin B., Wang W., Pang M., Cheshenko N., Hong T., Waring A.J., Herold B.C., Wagar E.A., Lehrer R.I. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. // J. Virol., 2004. Vol. 78 (10) P. 5147–5156.
86. Yeaman M., Yount N. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance // Pharmacological Reviews, 2003. Vol. 55 P. 28-55.
87. Zanetti, M., Gennaro, R., Scocchi, M., Skerlavaj, B. Structure and Biology of Cathelicidins. //The Biology and Pathology of Innate Immunity Mechanisms. Springer, 2002. P. 203–218.
88. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellullar organisms. // Nature. 2002. Vol. 415. P. 359–365.
89. Zhang A., Sun H., Wang X. Salivary proteomics in biomedical research. // Clin. Chim. Acta. 2013. Vol. 415 F 216-5
90. Zahn M., Kieslich B., Berthold N., Knappe D., Hoffmann R., Strater N. // Protein PeptLett., 2014. V. 21. № 4. P.407-412