



УДК 571.27

ХАРАКТЕРИСТИКА СОВМЕСТНЫХ ЭФФЕКТОВ АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИСЛОРОДА, СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА И АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ *IN VITRO*¹

© 2025 г. И. А. Кренев*, #, Е. В. Егорова*, **, Н. П. Горбунов*, ***, В. А. Костевич*,
А. В. Соколов*, **, А. С. Комлев*, Я. А. Забродская****, *****,
О. В. Шамова*, **, М. Н. Берлов*, **

* Институт экспериментальной медицины, Россия, 197022 Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12

** Санкт-Петербургский государственный университет,
Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

*** Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. Пастера, Россия, 197101 Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

**** Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Россия, 195251 Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

***** Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева,
Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17

Поступила в редакцию 14.10.2024 г.

После доработки 29.10.2024 г.

Принята к публикации 04.11.2024 г.

При активации фагоцитов происходит выработка активных метаболитов кислорода (АМК), проявляющих антимикробное и повреждающее организм хозяина действие. Хотя основной объем работ указывает на усиливающее действие АМК на ключевое гуморальное звено врожденного иммунитета – систему комплемента, имеющиеся данные противоречивы. Слабо изученным остается вопрос и о совместном микробицидном действии АМК с антимикробными пептидами фагоцитов. Мы изучили влияние продуктов “окислительного взрыва” на активацию комплемента в различных моделях *in vitro*. Пероксид водорода, в том числе в среде с Fe-ЭДТА, не влиял на показатели активности комплемента в сыворотке крови человека. HOCl в миллимолярных концентрациях стимулировала генерацию анафилатоксинов C3a и C5a в 80%-ной сыворотке, эффект ингибировался в присутствии ЭДТА. Выявлено не зависящее от двухвалентных ионов расщепление C5 в присутствии 16 мМ HOCl. В то же время HOCl выступала в роли ингибитора альтернативного пути комплемента в модели поверхностной активации на эритроцитах кролика в 5%-ной сыворотке, подавляя выработку C3a (ИК₅₀ ~ 4 мМ) и C5a и гемолитическую способность сыворотки (ИК₅₀ ~ 0.2 мМ); ингибирование выработки C5a было менее выраженным в присутствии 4–16 мМ HOCl. Снижение генерации анафилатоксинов наблюдали и в системе с зимозаном в 5%-ной сыворотке. В аналогичных условиях, но без активирующих поверхностей промежуточные концентрации HOCl усиливали накопление C3a и C5a; ЭДТА ингибировал этот эффект полностью (C3a) или частично (C5a). Наконец, в 70%-ной сыворотке 16 мМ HOCl усиливала накопление анафилатоксинов, но в присутствии зимозана почти полностью его ингибировала. Мы предполагаем, что HOCl может атаковать тиоэфирную связь в белке C3 с образованием аддукта C3(HOCl), способного к формированию жидкофазных конвертаз, но атака C3b может препятствовать его ковалентной фиксации на мембранах, блокируя петлю усиления комплемента. Мы также продемонстрировали аддитивный характер совместного действия HOCl с антимикробными пептидами (кателицидин LL-37 и α -дефенсины HNPs) в отношении *Listeria monocytogenes* и *Escherichia coli*. Полученные данные уточняют представления о взаимодействии антимикробных факторов фагоцитов и комплемента как ключевых участников иммунной защиты и повреждения организма.

Ключевые слова: активные метаболиты кислорода, хлорноватистая кислота, комплемент, анти-микробные пептиды, фагоциты, нейтрофилы, воспаление, C3, анафилатоксины

DOI: 10.31857/S0132342325010016, **EDN:** MABDQX

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342325010016 для авторизованных пользователей.

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды; АМК – активные метаболиты кислорода; ИФИК – индекс фракционной ингибирующей концентрации; МАК – мембраноатакующий комплекс; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МПО – миелопероксидаза; ФИК – фракционная ингибирующая концентрация; ЦТАБ – цетил trimethylammonium bromide; Er^{lab} – эритроциты кролика (rabbit erythrocytes); Fmoc/tBu – флуоренилметилоксикарбонил/терт-бутил (fluorenylethoxycarbonyl/tert-butyl); GVBS/Mg-ЭГТА – 5 мМ вероналовый буфер, содержащий 0.05%-ный желатин, 0.15 М NaCl и 10 мМ Mg-ЭГТА, pH 7.4 (gelatin-veronal buffer saline); HNPs – α -дефенсины человека (human neutrophil peptides).

Автор для связи: (тел.: +7 (812) 234-07-64; эл. почта: il.krenevv13@yandex.ru).

ВВЕДЕНИЕ

В процесс воспаления нейтрофилы вовлекаются уже на начальных этапах. При распознавании потенциальной угрозы они активируются и выполняют задачу элиминации патогена за счет кислород-зависимых и кислород-независимых механизмов [1, 2]. Первая группа механизмов состоит в генерации активных метаболитов кислорода (АМК), обладающих высокой способностью окислять и модифицировать различные молекулы и, таким образом, отличающихся значительной биотоксичностью. При активации нейтрофила, в том числе за счет рецептора C5aR1 к анафилатоксину C5a комплемента, инициируется цепочка реакций, приводящая к “окислительному взрыву”. На фагосомной мембране индуцируется сборка комплекса НАДФН-оксидазы, под действием которой образуется супероксидный анион-радикал O_2^- [3]. При действии супероксиддисмутазы либо неферментативно O_2^- превращается в пероксид водорода H_2O_2 [4, 5]. С одной стороны, H_2O_2 может восстанавливаться до воды под действием каталазы, глутатионпероксидаз и пероксидредоксинов. С другой стороны, он способен превращаться в гидроксильный радикал HO^- в реакции Фентона с участием ионов Fe^{2+} . С третьей, H_2O_2 может служить в качестве субстрата в реакции, катализируемой миелопероксидазой (МПО) [5]. МПО – гем-содержащий фермент, использующий H_2O_2 и Cl^- для производства хлорноватистой кислоты $HOCl$ [6, 7]. В связистем, что K_a $HOCl$ составляет ~7.5, при физиологических значениях pH водный раствор хлорноватистой кислоты представляет собой почти эквимолярную смесь протонированной и депротонированной форм ее аниона – гипохлорита; далее в тексте под $HOCl$ подразумевается именно такая смесь. $HOCl$, терминальный агент в ряду названных АМК, наиболее быстро взаимодействует с остатками серосодержащих аминокислот Cys и Met, несколько медленнее – с His, Trp, Lys, Тир и Arg [8]. Продуцируемая нейтрофилами $HOCl$ достигает миллимолярных концентраций в очагах воспаления, где проявляет выраженное бактерицидное и повреждающее ткани организма-хозяина действие не только *per se*, но и за счет образования вторичных продуктов, в том числе хлораминов [9].

Вторая группа механизмов представлена действием антимикробных пептидов (АМП) и белков. АМП в типичном случае – катионные пептиды, которые дезинтегрируют мембрану, приводя к нарушению ионного баланса, утечке метаболитов и гибели клетки-мишени. Описаны и другие механизмы действия АМП. АМП привлекают

внимание исследователей как перспективные противоинфекционные, ранозаживляющие и иммуномодулирующие агенты [10]. В гранулах нейтрофилов человека присутствуют β -структурные цистин-содержащие пептиды α -дефенсины (human neutrophil peptides, HNPs) HNPs 1–4 [11], а также α -спиральный пептид кателицидин LL-37 [12].

В качестве ключевого гуморального фактора врожденного иммунитета выступает система комплемента, включающая ~30 белков крови. Запуск комплемента по классическому, лектиновому или альтернативному пути приводит к генерации анафилатоксинов – пептидных молекул C3a и C5a, действующих на мембранные рецепторы и стимулирующих клеточное звено иммунного ответа; выработке опсонинов (C4b, C3b, iC3b, C3dg); сборке мембраноатакующего комплекса (МАК) C5b-9. Центральный компонент системы – белок C3 [13], член суперсемейства белков, содержащих тиоэфирную связь. В белке C3 человека она образуется между боковыми группами Cys988 и Gln991 [14–16]. При действии C3-конвертаз классического/лектинового или альтернативного пути C3 расщепляется с высвобождением C3a и большего фрагмента C3b. Это сопровождается масштабным изменением конформации белка, в результате чего осуществляется разрыв тиоэфирной связи и немедленная ковалентная фиксация C3b на близко находящихся гидроксильных группах поверхностных молекул, что обеспечивает прицельный характер сборки конвертаз на патогенных клетках [15]. Тиоэфирная связь может гидролизоваться, и тогда C3 превращается в C3(H_2O), в конформационном и функциональном отношениях представляющий собой C3b-подобную молекулу. Обе формы белка, C3b и C3(H_2O), способны взаимодействовать с циркулирующим фактором B, эта ассоциация носит Mg^{2+} -зависимый характер и ингибируется ЭДТА. Сформированные комплексы подвергаются протеолизу фактором D с образованием C3bBb или C3(H_2O)Bb [17]. Первый комплекс стабилизируется фактором P (пропердином), образуя мембранный C3-конвертазу [18]. Второй комплекс – это жидкофазная C3-конвертаза, обеспечивающая холостую активацию альтернативного пути [19]. Деятельность мембраноассоциированных C3-конвертаз приводит к наработке большого числа C3b (петля усиления) и формированию C5-конвертаз. В результате сборки последних запускается терминальный путь комплемента, продукт которого – МАК – это литическая пора, действующая на клетки грамотрицательных бактерий, эритроциты и другие мишени [20].

Несмотря на то что биологические эффекты АМК, АМП и комплемента направляются на избавление от инфекции или поддержание гомеостаза даже в ее отсутствие [21–23], они также могут наносить урон организму человека. АМК, включая генерируемые с участием МПО, участвуют в различных патологических процессах от повреждения клеток до хронического воспаления и сепсиса [6, 7, 24]. В целом поведение нейтрофилов, связанное с высвобождением во внеклеточное пространство их факторов, т.е. дегрануляция и образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, в очаге воспаления или внутри сосудов приводит к повреждению тканей [25]. Система комплемента также может выступать в роли патогенетического фактора [26].

Актуальной задачей представляется расшифровка путей, по которым взаимодействуют кислород-зависимые и кислород-независимые антимикробные механизмы нейтрофилов, а также путей, по которым факторы нейтрофилов модулируют активность комплемента в процессе реализации антимикробной защиты или при повреждении макроорганизма. Нейтрофилы содержат ряд протеиназ, способных расщеплять и активировать белки комплемента [27–33]. Хотя накоплены данные о действии неферментативных факторов гранул нейтрофилов на комплемент, существующая картина взаимодействия двух этих участников иммунитета противоречива [34]. Известно, что HNPs ингибируют классический и лектиновый пути комплемента, взаимодействуя с коллагеновыми доменами их инициаторных белков C1q и MBL (маннан-связывающий лектин) [35, 36]. С другой стороны, пептиды C4a и C3a комплемента проявляют собственную антимикробную активность [37–39].

В ряде исследований АМК способствовали активации комплемента, сопровождаемой конвертацией C3 и C5. В одной из ранних работ было показано появление хемотаксического фактора, сходного с C5a, при обработке H_2O_2 в концентрациях не выше 1.1 мМ как сыворотки, так и чистого C5; снижение хемотаксической активности при более высоких концентрациях H_2O_2 авторы связали с инактивацией нейтрофилов [40]. В другом исследовании обработка сыворотки H_2O_2 (миллимолярные концентрации; время инкубации – до 4 ч) приводила не только к потере гемолитической способности, но и к выработке анафилатоксинов. HOCl (миллимолярные концентрации) и активированные нейтрофилы также

приводили к подобному действию на активность комплемента [41].

В работе [42] было продемонстрировано, что обработка H_2O_2 белка C5 изменяет его конформацию без протеолиза, высвобождая сайт связывания с C6 и делая возможным запуск литического пути комплемента. Действие усиливалось в присутствии Fe-ЭДТА и аскорбиновой кислоты, а десферриоксамин B, хелатор ионов железа, и диметилсульфоксид, перехватчик гидроксильного радикала, снижали этот эффект. Авторы заключили, что эффект обусловлен главным образом радикалами HO^- . Важно указать, что исследовался очищенный белок C5 и не было проведено корректной оценки влияния АМК на другие белки-участники литического каскада. Исследованные концентрации H_2O_2 были слишком высоки (миллимолярный диапазон). Аналогично, инкубация C5 с хлорамином таурина и хлорсукцинидом приводила к появлению C5b-подобной молекулы. Обработка C5 хлорамином таурина была более эффективна, чем H_2O_2/Fe -ЭДТА/аскорбат [43, 44]. Авторы этой работы сделали вывод, что большой вклад в наблюдаемые феномены вносит окисление остатков Met в белке C5. Превращение C5 в C5b-подобную молекулу происходило, кроме того, в системе МПО/ H_2O_2/Cl^- (HOCl и хлораминами), а также в системе с активированными нейтрофилами [45].

К ряду этих работ можно добавить данные о подавлении хемотаксической активности C5a [46] и опсонизирующей активности C3b [47] в системе с H_2O_2 и МПО.

Резюмируя, можно сказать, что несмотря на устоявшееся представление об активирующем действии АМК на комплемент, представленные в литературе данные противоречивы и демонстрируют зависимость наблюдаемых эффектов от дизайна эксперимента, который в ряде случаев представляется не соответствующим условиям, реализующимся *in vivo*. Кроме того, малоизученным остается вопрос о характере совместного действия АМК и АМП. С одной стороны, показано, что система H_2O_2 /аскорбат делает грамотрицательные бактерии чувствительными к лизоциму [48], и показан синергизм H_2O_2 и HNPs в цитолизе [49], с другой – имеются данные об ингибировании HOCl ряда ферментов нейтрофилов, включая лизоцим [50–52].

Целью настоящей работы было исследование действия АМК на активацию комплемента в различных моделях *in vitro*, а также оценка ха-

рактера совместного бактерицидного действия HOCl и АМП фагоцитов – LL-37 и HNPs.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния обработки сыворотки крови человека H_2O_2 , в том числе в среде, благоприятствующей образованию HO^\cdot , на ее гемолитическую активность инкубировали 10%-ную сыворотку крови с 0, 10 или 20 mM H_2O_2 при 37 или 0°C в отсутствие или в присутствии Fe-ЭДТА в течение 30 мин, а затем проводили гемолитический тест. Мы не выявили эффектов предварительной инкубации сыворотки на ее литическое действие в отношении эритроцитов кролика – Er^{rab} . Инкубация контрольной сыворотки при 37°C не повлияла на ее гемолитическую способность по сравнению с сывороткой, содержащейся при 0°C в течение такого же времени (рис. 1). Таким образом, по нашим результатам, ни H_2O_2 , ни HO^\cdot не стимулируют запуск терминального каскада комплемента в сыворотке.

В модели жидкофазной активации комплемента, т.е. в условиях без мембран, благоприятствующих сборке конвертаз, обработка 80%-ной сыворотки 0.125–16 mM H_2O_2 в течение 60 мин при комнатной температуре (25°C) не изменяла концентрации анафилатоксинов C3a и C5a в пробах и не сказывалась на гемолитической активности сыворотки (рис. 2a, в, д).

Отсутствие действия H_2O_2 и HO^\cdot может объясняться наличием каталазной активности в сыворотке крови [53]. Действительно, в ходе инкубации с H_2O_2 в пробах наблюдали пузырьки газа, что может свидетельствовать о высвобождении O_2 . Это должно приводить и к снижению концентрации H_2O_2 в реакционной пробе, и к снижению выработки HO^\cdot в реакции Фентона. Кроме того, отсутствие эффектов можно объяснить наличием большого числа мишеней, отличных от C5. Этот белок присутствует в сыворотке крови в концентрации нескольких десятков мкг/мл [54], что составляет лишь малую долю от концентрации общего белка – нескольких десятков мг/мл. В условиях *in vivo* дополнительно в качестве мишеней действия АМК будут служить компоненты микробных и хозяйственных клеток. Измерение концентрации H_2O_2 в различных физиологических жидкостях и тканях представляется трудной методической задачей, однако, по всей видимости, концентрация H_2O_2 в плазме крови находится в микромолярном диапазоне [55]. При ряде состояний, связанных с окислительным стрессом, уровень H_2O_2 может возрастать [56, 57]. Тем не менее нам неизвестны данные о точной концентрации H_2O_2 в очаге воспаления.

Аналогично, мы изучили действие HOCl в 80%-ной сыворотке крови в жидкофазной модели активации комплемента. Сравнение концентраций

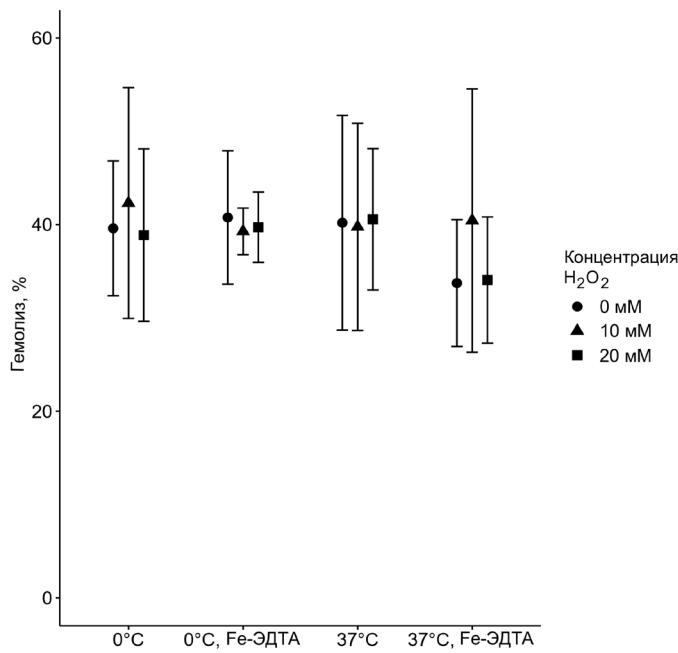


Рис. 1. Влияние инкубации сыворотки крови человека с H_2O_2 в различных условиях на гемолитическую активность сыворотки в отношении Er^{rab} .

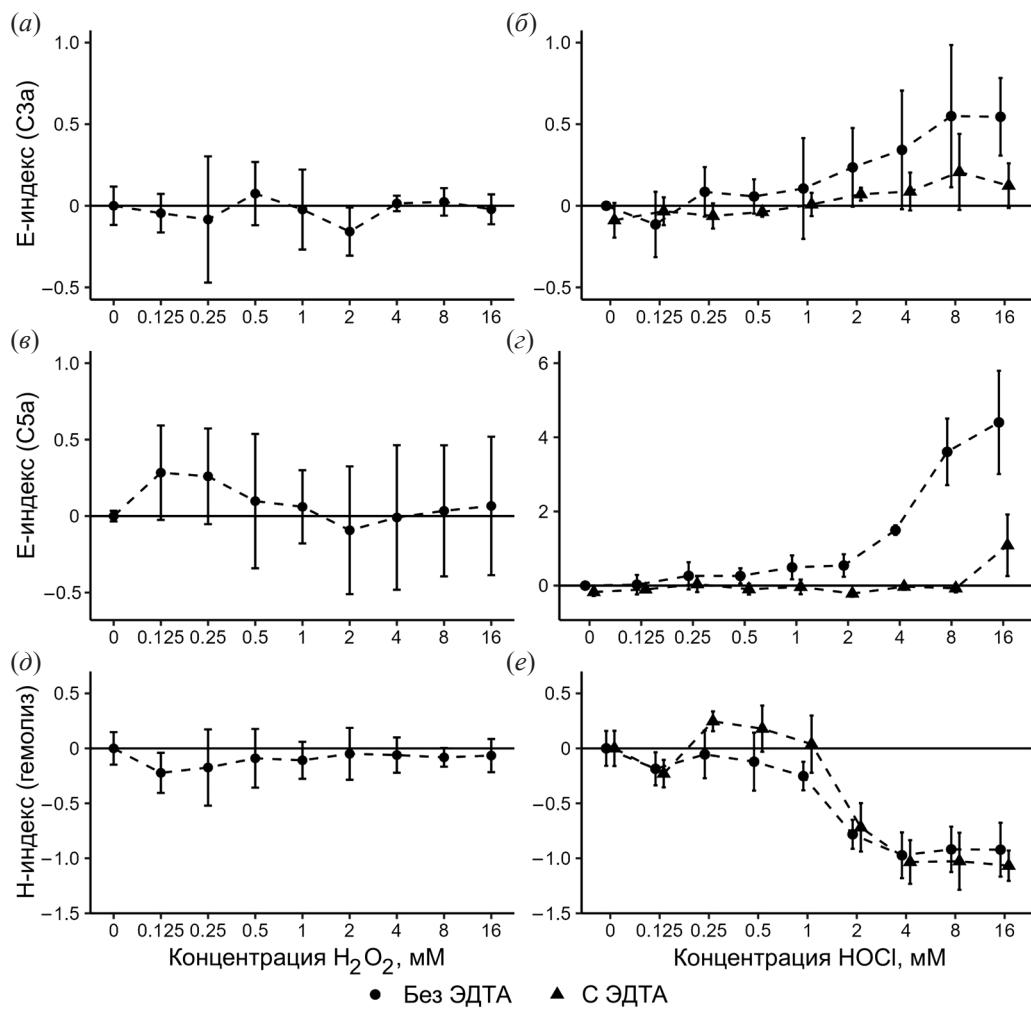


Рис. 2. Действие H_2O_2 (a, c, d) и HOCl (b, c, e) на комплемент в модели жидкокомбинированной активации. (a, b) – Действие на продукцию анафилатоксина $\text{C}3\text{a}$; (c, e) – влияние на продукцию анафилатоксина $\text{C}5\text{a}$; (d, e) – действие на гемолитическую активность сыворотки в отношении Er^{rab} . Ось абсцисс представлена в логарифмическом масштабе.

$\text{C}3\text{a}$ в отсутствие и в присутствии ЭДТА показывает, что жидкокомбинированная конвертация $\text{C}3$ в контрольных пробах (в отсутствие HOCl) почти не происходит, а регистрируемый в этих пробах $\text{C}3\text{a}$ в основном приходится на предсуществующий сывороточный анафилатоксин, что является ожидаемым результатом (рис. 2a). Мы зафиксировали 50%-ное повышение уровня $\text{C}3\text{a}$ при действии 8–16 mM HOCl , а добавление ЭДТА отменяло этот эффект, что предполагает зависимость процесса усиления жидкокомбинированной конвертации от ионов Mg^{2+} (рис. 2b). Накопление $\text{C}5\text{a}$ усиливалось в присутствии 1–16 mM HOCl до 7 раз (рис. 2c). Более выраженное влияние на выработку $\text{C}5\text{a}$ по сравнению с $\text{C}3\text{a}$ может объясняться каскадным характером действия комплемента и дает основание предположить, что расщепление $\text{C}5$ обусловлено действием специ-

фической конвертазы. Добавление ЭДТА отменяло наблюдаемый эффект, и лишь в концентрации 16 mM HOCl несколько повышала генерацию $\text{C}5\text{a}$. Таким образом, зависимость усиления жидкокомбинированной активации комплемента от ионов Mg^{2+} проявляется и на уровне конвертации $\text{C}5$. Тем не менее двукратное повышение $\text{C}5\text{a}$ в присутствии 16 mM HOCl и ЭДТА указывает на расщепление $\text{C}5$ не относящимися к системе комплемента протеиназами сыворотки. Известно, что на белки комплемента действует ряд дополнительных протеаз. Белок $\text{C}5$ может расщепляться трипсинами, калликреинами, триптазой, гранзимами, протеиназами системы свертывания крови, плазмином, катепсинами D и E [58]. HOCl способна увеличивать активность некоторых протеиназ [52, 59–62], в том числе за счет инактивации их ингибиторов.

В частности, показано ингибирование антипротеиназной активности α_1 -антитрипсина и α_2 -макроглобулина под действием HOCl, что стимулирует неконтролируемый протеолиз [63]. Этими механизмами можно объяснить и усиленное расщепление белка C5, индуцированное HOCl.

Таким образом, наши данные подтверждают активирующую (с конвертацией C3 и C5) действие HOCl, но не H_2O_2 и генерируемых из нее HO[·], на комплемент в жидкой фазе [40, 41].

Предполагая, что запускаемая HOCl жидкофазная активация комплемента может привести к частичному истощению комплемента, после инкубации мы незамедлительно использовали образцы для проведения гемолитических тестов в модели альтернативного пути активации с использованием Er^{rab} в присутствии Mg-ЭГТА. Гемолитическая активность сыворотки после обработки 1–16 мМ HOCl была снижена вплоть до полного ингибирования. Однако этот эффект наблюдался и в сыворотке, обработанной ЭДТА, где жидкофазная активация комплемента не происходила (рис. 2e). Важно отметить, что после инкубации в жидкофазной системе сыворотку разбавляли буфером с избытком Mg²⁺, что компенсировало присутствие остаточного ЭДТА, и гемолитическая активность контрольных проб, обработанных и не обработанных ЭДТА, была одинакова.

Ингибирование гемолитической активности комплемента в этих экспериментах нельзя объяснить исключительно его истощением в жидкой фазе, поскольку потерю активности наблюдали и в пробах с ЭДТА. Мы провели опыты в модели альтернативного пути активации с одновременным присутствием HOCl в тех же концентрациях сыворотки (5%) и Er^{rab} в условиях с Mg-ЭГТА. Оказалось, что HOCl ингибирует альтернативный путь комплемента. Так, образование C3a снижалось в присутствии 2–16 мМ HOCl (ИК₅₀ ~ 4 мМ), образование C5a – в присутствии 0.25–16 мМ HOCl (ИК₅₀ ~ 0.2 мМ). Интересно, что и в этом случае высокие концентрации HOCl (4–16 мМ) приводили к некоторому усилению накопления C5a, несмотря на в целом ингибированный комплемент (рис. 3a). Это согласуется с вышеописанным наблюдением накопления C5a в жидкой фазе. Закономерным образом, сыворотка теряла гемолитическую активность в присутствии 0.25–4 мМ HOCl (ИК₅₀ ~ 0.2 мМ) (рис. 3b). В более высоких концентрациях HOCl проявляла собственную гемолитическую активность в прогретой, т.е. содержащей инактивированный комплемент, сыворотке (данные не представлены).

Мы изучили роль HOCl в другой модели поверхности активации комплемента, а именно с использованием полисахарида зимозана. Его использовали вместо Er^{rab} с сохранением прочих условий эксперимента (состав буфера, время и температура инкубации) и регистрировали уровни продукции анафилатоксинов. HOCl выступала в роли ингибитора и в этой системе, подавляя генерацию C3a и C5a со значениями ИК₅₀ ~ 4 и ~2 мМ соответственно (рис. 3в, г). Следовательно, ингибирование поверхности активации комплемента под действием HOCl не связано с природой поверхности, а обусловлено модификацией белков сыворотки.

Мы оценили действие HOCl в тех же условиях, но без активирующих поверхностей (т.е. Er^{rab} или зимозана). В такой жидкофазной модели мы также зафиксировали повышение накопления C3a в присутствии 0.5–1 мМ HOCl (рис. 3д) и C5a в присутствии 0.5–16 мМ HOCl (рис. 3е). ЭДТА полностью ингибировал воздействие HOCl на накопление C3a (рис. 3д), а на накопление C5a – лишь частично (рис. 3е). Таким образом, комплемент-независимая выработка C5a, стимулируемая HOCl, подтверждается и в 5%-ной сыворотке, но этот феномен более выраженный, чем в 80%-ной сыворотке. Однако в этих условиях вслед за усилением мы зафиксировали ингибирование накопления C3a до контрольного уровня (2 мМ HOCl) и ниже контрольного уровня (4–16 мМ HOCl) (рис. 3д). Аналогично, уровень C5a в присутствии 8–16 мМ HOCl был ниже, чем в присутствии средних концентраций HOCl, хотя не ниже, чем в контрольных образцах (рис. 3е). По-видимому, ингибирующий эффект обусловлен неспецифическим окислением и инактивацией белков сыворотки. Поскольку наблюдали это только в 5%-ной, но не в 80%-ной сыворотке, мы подвергаем сомнению возможность физиологической значимости данного феномена. Следует отметить, что в этих условиях в контрольных пробах накопление обоих анафилатоксинов происходит быстрее, чем в условиях, использованных в первой жидкофазной модели (ср. контрольные пробы без и с ЭДТА на рис. 2б, г и на рис. 3д, е). Это можно связать с добавлением Mg²⁺ и разной температурой инкубации. Мы дополнительно провели единичный опыт в 5%-ной сыворотке с Mg-ЭГТА, но инкубацию осуществляли в течение 60 мин при комнатной температуре. Результаты оказались аналогичными, т.е. несколько менее выраженное усиление выработки анафилатоксинов в присутствии более высоких

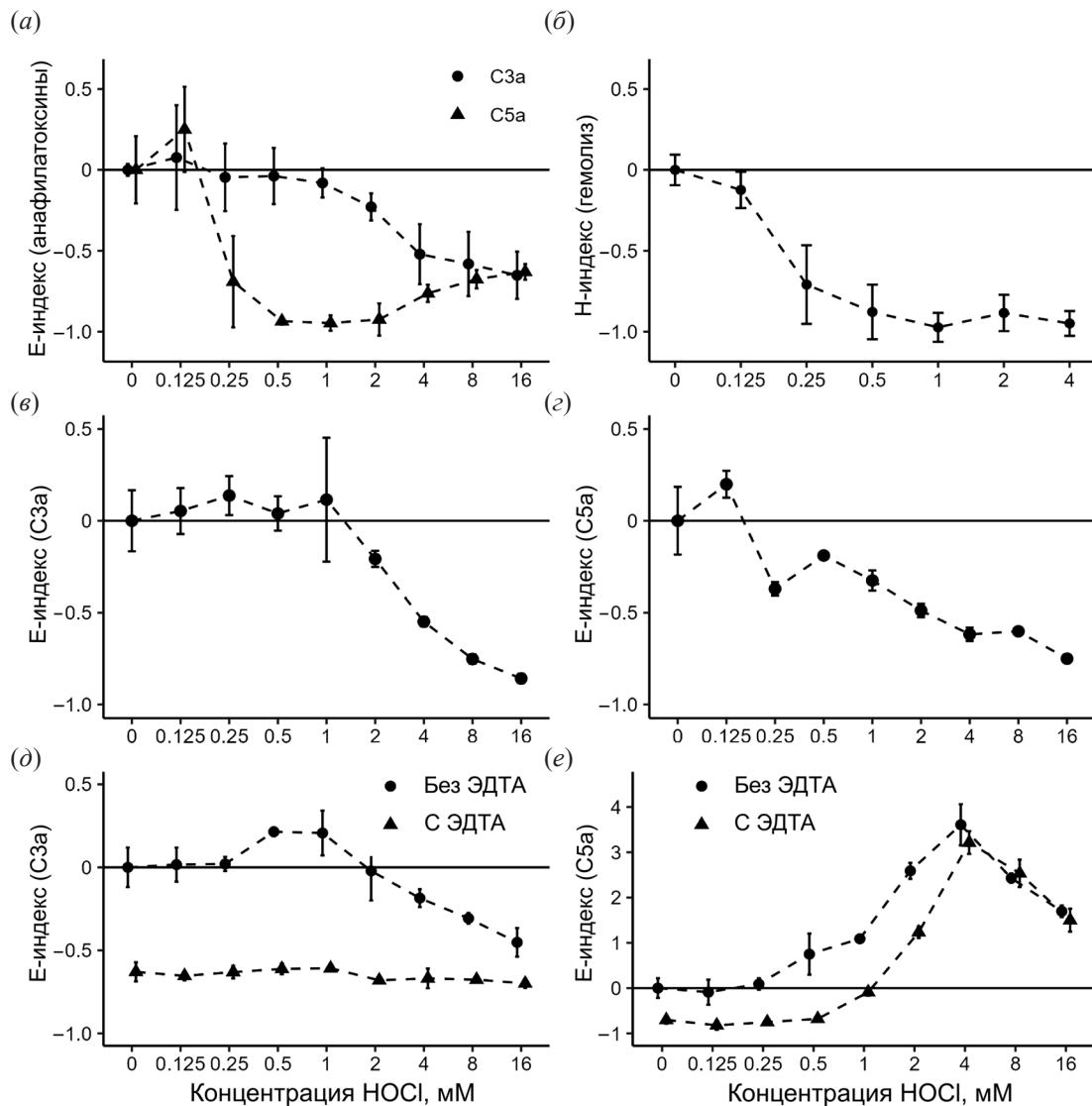


Рис. 3. Действие HOCl на активацию комплемента в 5%-ной сыворотке в присутствии Mg-ЭГТА в ходе инкубации при 37°C в течение 30 мин. (а) – Действие на продукцию анафилатоксинов C3a и C5a в присутствии Er^{rab}; (б) – влияние на гемолитическую активность сыворотки в отношении Er^{rab}; (в) – действие на продукцию C3a в присутствии зимозана; (г) – действие на продукцию C5a в присутствии зимозана; (д) – влияние на продукцию C3a в отсутствии Er^{rab} и зимозана; (е) – действие на продукцию C5a в отсутствии Er^{rab} и зимозана. Ось абсцисс представлена в логарифмическом масштабе.

концентраций HOCl, чем более низких (рис. S1, дополнительные материалы).

Таким образом, наши эксперименты свидетельствуют о том, что HOCl запускает жидкофазную, но ингибирует мембраноассоциированную активацию комплемента. На наш взгляд, такой результат не парадоксален, поскольку оба эффекта могут объясняться атакой молекулой HOCl тиоэфирной связи в молекуле C3. Во-первых, можно предположить, что в жидкой фазе HOCl действует подобно H₂O, и атом кислорода HOCl атакует δ-атом углерода остатка Gln⁹⁹¹ и вместе с атомом

хлора присоединяется к нему, но реакция с участием HOCl протекает значительно быстрее, чем с участием H₂O. Как и в случае с C3(H₂O), образующаяся гипотетическая молекула C3(HOCl) имеет конформацию, благоприятную для Mg²⁺-зависимого связывания фактора B, что косвенно подтверждается блокированием усиления активации комплемента в жидкофазной модели при добавлении ЭДТА (рис. 2б, г, е). Предположительно, отличие функциональной активности C3(HOCl) Bb от C3(H₂O)Bb состоит в том, что C3(HOCl)Bb вызывает жидкофазную конвертацию не только C3, но и C5, т.е. действует подобно CVF-Bb

(CVF, cobra venom factor, фактор яда кобры) [64]. Во-вторых, в модели мембраноассоциированной активации альтернативного пути комплемента ингибирующее действие HOCl может объясняться атакой тиоэфирной связи в молекуле C3b, в результате которой модифицированный остаток Gln991-COOCl теряет способность связываться с мембранами и участвовать в дальнейшей сборке C3- и C5-конвертаз. Другими словами, HOCl выигрывает в конкуренции с поверхностными молекулами за взаимодействие с реакционным центром белка C3b. Не исключено, что модификация тиоэфирной связи отлична от предложенной схемы и состоит в окислении атома серы боковой группы Cys988, поскольку остатки Met и Cys наиболее подвержены действию HOCl [8]. Однако эти гипотезы плохо согласуются с представлением о коротком времени жизни HOCl, скорость окисления мишени которой выше, чем скорость активации комплемента, поэтому можно предположить роль продуктов окисления в его ингибиции. Если HOCl действует на тиоэфирную связь, то следует ожидать ее влияния на функциональную активность других содержащих такую связь белков – C4 и α_2 -макроглобулина. Как указывалось выше, HOCl – признанный инактиватор антипротеазной активности α_2 -макроглобулина [63], но на сегодняшний день нет доказательств роли расщепления тиоэфирной связи в этой инактивации.

Можно предположить иную схему, при которой в жидкой фазе образуется C3(HOCl), формирующий C3-конвертазу, но, подобно C3(H₂O), не способный служить субстратом C3-конвертаз. Следовательно, после обработки HOCl даже в присутствии ЭДТА гемолитическая активность сыворотки в отношении Er^{rab} может быть потеряна (рис. 2e), но не из-за ингибирующего действия HOCl или продуктов окисления, как предложено выше, а из-за перевода части молекул C3 в форму C3(HOCl) в ходе предварительной инкубации в жидкофазной модели. Аналогично, в мембранный модели образование C3(HOCl) делает невозможным образование и фиксацию C3b на Er^{rab}, что будет выражаться в ингибиции петли усиления. Однако такое объяснение может лишь частично объяснять ингибирующий эффект, поскольку не весь C3 в присутствии HOCl переходит в форму, не подверженную действию конвертаз, что доказывается, наоборот, усиленной конвертацией C3 (рис. 2б и рис. 3d).

Маловероятным представляется ингибиция комплемента за счет модификации мембран, т.к. основные мишени для ковалентного

взаимодействия C3b – это гидроксильные группы, с которыми HOCl реагирует крайне медленно. Способность HOCl модифицировать липиды и другие компоненты клеточных мембран не может объяснить ингибицию комплемента, поскольку ингибиция наблюдалась и в системе с зимозаном.

Неспецифическая окислительная модификация белков сыворотки может объяснить ингибицию комплемента в модели активации на мембранах лишь частично, поскольку в отсутствие мембран HOCl ингибитирует накопление анафилатоксинов в основном в более высоких концентрациях (рис. 3d, e), чем в присутствии активирующих поверхностей (рис. 3a, b, г). Это различие более выражено для C5a (ингибиция образования C5a начинается с 0.25 мМ HOCl в обеих моделях поверхностной активации и с 8 мМ в модели жидкофазной), чем для C3a, поскольку, по-видимому, в 5%-ной сыворотке может быть более значима не ингибируемая HOCl жидкофазная конвертация C3 за счет C3(H₂O)Bb, что нерелевантно для C5.

Тем не менее мы приняли решение более строго доказать отсутствие значимой роли неспецифического окисления белков в слаборазбавленной сыворотке (70%-ной) и напрямую сравнить действие 16 мМ HOCl в условиях с преимущественно жидкофазной и преимущественно поверхностной активацией комплемента. Для последней применяли зимозан, Er^{rab} же не представляется возможным использовать при такой высокой концентрации сыворотки из-за интенсивного гемолиза. В отсутствие зимозана HOCl повышала генерацию обоих анафилатоксинов (более выраженный эффект опять наблюдался для C5a в сравнении с C3a). Присутствие зимозана в несколько раз повышало продукцию анафилатоксинов, свидетельствуя о запуске поверхностной активации петли усиления комплемента. Добавление HOCl почти полностью блокировало этот процесс (рис. 4). Таким образом, и при прямом сравнении HOCl была активатором жидкофазной и ингибитором поверхностной активации комплемента, причем в слаборазбавленной сыворотке. Отсутствие блокирования генерации анафилатоксинов (и даже ее усиление) в жидкофазной модели в 70%-ной сыворотке (в отличие от 5%-ной сыворотки, рис. 3d, e) опровергает неспецифический характер ингибиции петли усиления комплемента, демонстрируя специфическое действие на уровне ассоциированных с поверхностями конвертаз.

Мы не исключаем, что при различных значениях pH способность HOCl модулировать

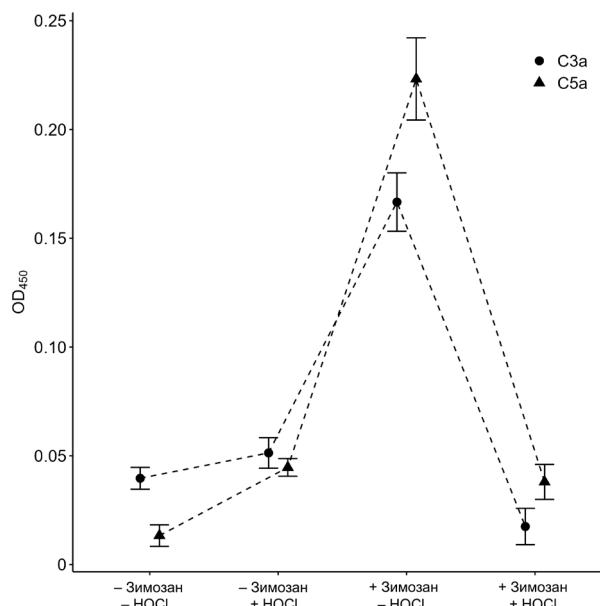


Рис. 4. Влияние 16 мМ HOCl на накопление анафилатоксинов в отсутствие и в присутствии зимозана в 70%-ной сыворотке крови в ходе инкубации при 37°C в течение 30 мин.

активность комплемента может быть неодинакова ввиду изменения соотношения концентраций протонированной и депротонированной формы хлорноватистой кислоты.

В условиях, при которых доминирует жидкофазная активация комплемента, эффект HOCl следует считать активирующим, выражющимся в усиленной выработке C3a и особенно C5a. Тем не менее в условиях работы петли амплификации комплемента, т.е. на патогенных клетках или других активирующих поверхностях, результирующий эффект HOCl будет ингибирующим, выражющимся в снижении отложения опсонинов-производных C3 и формирования МАК. Ингибирование комплемента на мембранах согласуется с результатами уже цитированной работы о снижении активности C3b как опсонина на обработанных сывороткой клетках дрожжей под действием HOCl в системе с МПО [47]. Таким образом, полученные нами результаты позволяют пересмотреть роль HOCl в модуляции комплемента при воспалении и сделать вывод, что эта роль ингибирующая, а не активирующая.

С учетом высокой концентрации C3 в плазме крови (~1 мг/мл, ~5 мКМ) и наличия реакционноспособной тиоэфирной связи в его молекуле, можно предположить, что модуляция комплемента – это один из существенных патофизиологических эффектов HOCl. Описанное выше образование C5b-подобной молекулы без расщепления под действием HOCl и хлораминов [45] мы считаем

эффектом *in vitro*, не имеющим физиологического значения.

Для выяснения характера совместного действия АМП и HOCl мы провели антимикробные тесты в микропланшетном формате с последующим высевом из лунок и подсчетом колоний. В отношении *Listeria monocytogenes* МИК HOCl составила 3 мКМ, LL-37 – 0.25 мКМ, HNPs – 32 мКМ. В отношении *Escherichia coli* МИК HOCl составила 16 мКМ, LL-37 – 8 мКМ, HNPs – более 32 мКМ. ИФИК (индекс фракционной ингибирующей концентрации) HOCl и LL-37 в отношении обеих бактерий составил 1; ИФИК HOCl и HNPs в отношении *L. monocytogenes* – 0.75; совместное действие HOCl и HNPs против *E. coli* не оценивали из-за высокого значения МИК HNPs (табл. 1, рис. S2). Во всех случаях тип совместного действия АМП с HOCl может быть интерпретирован как аддитивизм. Тем не менее следует с осторожностью экстраполировать эти данные на другие АМП, антисептические соединения и другие виды микроорганизмов [65].

Интегральное представление о взаимодействии АМК, АМП и комплемента с учетом литературных и полученных в настоящем исследовании данных представлено на рис. 5. Правая часть рисунка показывает, что в ходе “окислительного взрыва” в фагоцитах вырабатываются АМК, способствующие элиминации патогенов за счет окислительной модификации их компонентов и аддитивного действия с АМП; АМК и протеазы ответственны

Таблица 1. Характеристика совместного действия антимикробных пептидов LL-37 и HNPs с HOCl в отношении микроорганизмов. Антимикробная активность веществ представлена как МИК в мкМ, ИФИК – безразмерная величина.

Соединение	Условия	<i>L. monocytogenes</i> EGD	<i>E. coli</i> ML-35p
LL-37	– HOCl	0.25	2
	+ HOCl	0.125	1
HNPs	– HOCl	32	>32
	+ HOCl	8	–
HOCl	– LL-37, – HNPs	3	16
	+ LL-37	1.5	8
	+ HNPs	1.5	–
ИФИК _{LL-37/HOCl}		1	1
ИФИК _{HNPs/HOCl}		0.75	–

Примечание: ИФИК – индекс фракционной ингибирующей концентрации.

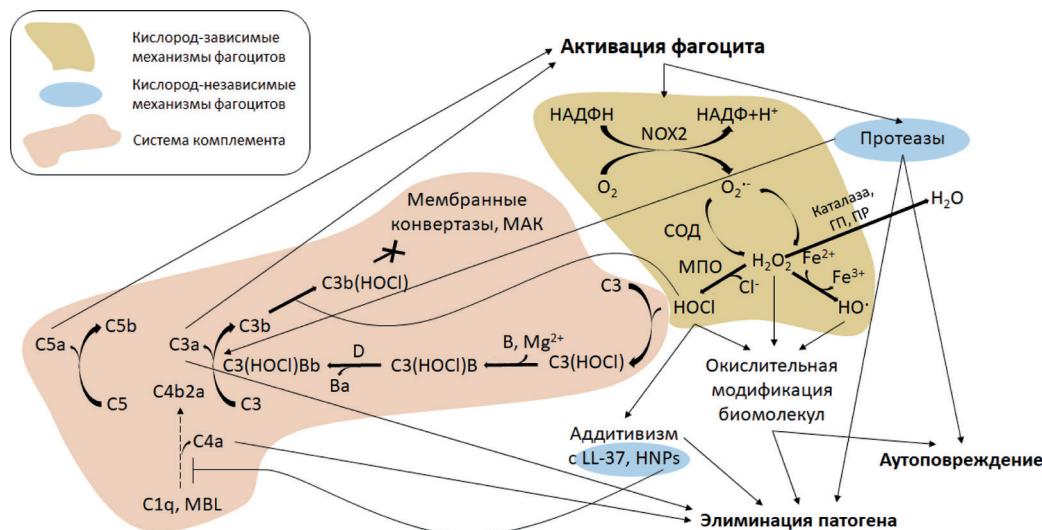


Рис. 5. Интегральное представление о взаимодействии АМК, АМП и комплемента в ходе реализации фагоцитарного ответа с учетом гипотезы о взаимодействии HOCl с C3 и C3b и полученных данных об аддитивном характере совместного микробицидного действия HOCl и АМП. Для облегчения восприятия не проиллюстрировано влияние HOCl на активность протеаз/антипротеаз и лизоцима. Сокращения: ГП – глутатионпероксидаза, МАК – мембраноатакующий комплекс, МПО – миелопероксидаза, ПР – пероксисидоксины, СОД – супероксидредуктаза, HNPs – α -дефенсины человека (human neutrophil peptides), МBL – маннан-связывающий лектин (mannan-binding lectin), NOX2 – НАДФН-оксидаза 2 (NADPH oxidase 2).

и за борьбу с патогенами, и за повреждение макроорганизма. Левая часть рисунка показывает гипотезу, согласно которой HOCl модифицирует C3 и C3b для усиления жидкокапнной активации комплемента и блокирования петли усиления. На рисунке также показаны расщепление C3 под действием протеаз фагоцитов, ингибирование классического и лектинового путей дефенсины HNPs, а также активация фагоцитов анафилотоксинами. Не показаны выявленное комплементнезависимое расщепление C5 в присутствии HOCl и действие антипротеаз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Влияние пероксида водорода на комплемент-зависимый гемолиз (10%-ная сыворотка крови в присутствии Mg-ЭГТА). Для проверки значимости эффекта превращения C5 в C5b-подобную молекулу под действием H_2O_2/NO в присутствии сыворотки крови человека изучали ее гемолитическую активность после предварительной обработки H_2O_2 в течение 10 мин при 37 либо 0 °C (чтобы избежать возможной частичной активации комплемента во время инкубации) в присутствии или в отсутствие 50 мкМ Fe-

ЭДТА (среда Фентона). Каждая предварительно инкубируемая проба имела объем 200 мкл, включая 20 мкл пулированной сыворотки крови человека (конечная концентрация – 10%); 10 мкл раствора H_2O_2 (конечные концентрации – 10 и 20 мМ); 20 мкл Fe-ЭДТА (конечная концентрация – 50 мкМ). Сыворотку крови получали медицинские работники от не менее чем 20 здоровых добровольцев. Все растворы готовили на 5 мМ вероналовом буфере, содержащем 0.05%-ный желатин, 0.15 M NaCl и 10 мМ Mg-ЭГТА, pH 7.4 (GVBS/Mg-ЭГТА); остальной объем пробы составлял этот же буфер. В качестве контрольных проб использовали пробы без добавления H_2O_2 . Fe-ЭДТА готовили следующим образом: смешивали водный раствор $FeSO_4$ с эквимолярным раствором ЭДТА, содержащим NaOH (pH 7.4), а затем разбавляли буфером до рабочей концентрации железа 500 мкМ. После 10 мин инкубации 20 мкл проб (четыре типа проб – инкубированные при двух разных температурах в присутствии или в отсутствие Fe-ЭДТА) смешивали с 20 мкл эритроцитов кролика (Er^{rab}) в GVBS/Mg-ЭГТА (конечная концентрация Er^{rab} – $2.5 \times 10^8 \text{ мл}^{-1}$). Для выделения Er^{rab} получали кровь из краевой ушной вены одного кролика, смешивая ее с раствором Олсвера (30 мМ цитратный буфер, содержащий 71 мМ NaCl и 110 мМ глюкозы, pH 6.1), и затем переводили в рабочий буфер. Таким образом, конечная концентрация сыворотки при инкубации с Er^{rab} составила 5%. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C, затем останавливали реакцию добавлением 6.5 объемных частей PBS (~0°C). Для получения проб, соответствующих 100%-ному лизису, добавляли дистиллированную воду вместо PBS. Пробы центрифугировали при 500 g в течение 5 мин на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, США) при комнатной температуре. Отбирали 200 мкл супернатанта в плоскодонный 96-луночный планшет (Sarstedt Inc, США). Измеряли ОП₄₁₄ на спектрофотометре Multiskan MS (Labsystems, Финляндия). Контроль представлял собой центрифугированные в тех же условиях Er^{rab} с добавлением буфера вместо сыворотки. Результаты выражали в процентах от полного лизиса. Данные представляли в формате среднее арифметическое ± стандартное отклонение.

Модель жидкофазной активации комплемента (80%-ная сыворотка крови). В модели жидкофазной активации комплемента использовали 80%-ную сыворотку и исследуемые вещества (H_2O_2 или HOCl) в концентрациях 0.125–16 мМ, объем проб составлял 50 мкл (для всех разведений использовали PBS). Пробы инкуби-

ровали при комнатной температуре 60 мин, добавляли 350 мкл холодного PBS. Часть каждой пробы (20 мкл) смешивали с 20 мкл Er^{rab} (концентрация сыворотки на этом этапе – 5%), инкубировали 30 мин при 37°C и далее действовали так же, как описано в предыдущем пункте, для оценки изменения гемолитической активности сыворотки. Другую часть каждой пробы разбавляли PBS до концентрации 1% и использовали для проведения ИФА с целью определения накопления анафилатоксинов C3a и C5a, как описано ранее [66]. Модуляцию гемолитической активности сыворотки и выработки анафилатоксинов выражали с помощью *H*- и *E*-индексов соответственно – так же, как в цитируемой работе. Кратко, индексы рассчитывали как отрицательное или положительное приращение высвобождения гемоглобина (ОП₄₁₄) либо накопления анафилатоксина (ОП₄₅₀) относительно контрольных проб. Значения *H*- и *E*-индексов, равные 0, соответствуют отсутствию изменения активности комплемента по сравнению с контрольной сывороткой, положительные значения – усилению активности, отрицательные – ингибированию; значения, равные –1, означают полное ингибирование.

Модель поверхностной активации комплемента по альтернативному пути на эритроцитах кролика (5%-ная сыворотка крови в присутствии Mg-ЭГТА). На мембранах Er^{rab} происходит запуск петли усиления альтернативного пути комплемента. Исследовали действие 0.125–16 мМ HOCl на альтернативный путь, как описано ранее [67]. Кратко, концентрация сыворотки составляла 5%, Er^{rab} – $2.5 \times 10^8 \text{ мл}^{-1}$. Пробы объемом 50 мкл инкубировали при 37°C в течение 30 мин, реакцию останавливали добавлением 325 мкл холодного PBS. В качестве показателей активности комплемента также использовали гемолитическую активность сыворотки и накопление C3a и C5a. Собственную гемолитическую активность HOCl оценивали в сыворотке, прогретой при 57°C в течение 30 мин.

Модель поверхностной активации комплемента по альтернативному пути на зимозане (5%-ная сыворотка крови в присутствии Mg-ЭГТА). Полисахарид зимозан используется в качестве классического объекта для исследования активации комплемента по альтернативному пути [68]. Зимозан (Биолар, СССР) обрабатывали на кипящей бане в течение 2 ч, а затем переводили в GVBS/Mg-ЭГТА. Проводили опыт в тех же условиях, что и в модели с Er^{rab} (тот же состав буфера, время и температура инкубации, конечные концентрации HOCl), концентрация

зимозана в инкубуемых пробах составляла 20 мг/мл. Регистрировали уровни накопления анафилатоксинов С3а и С5а в пробах и представляли данные по модуляции так же, как описано выше.

Модель жидкостной активации комплемента (5%-ная сыворотка крови в присутствии Mg-ЭГТА). Действие HOCl на накопление анафилатоксинов также оценивали в аналогичной системе, но в отсутствие Er^{rab} и зимозана. Проводили опыты с инкубацией при 37°C в течение 30 мин, а также однократный опыт с инкубацией при комнатной температуре в течение 60 мин.

Активация комплемента в 70%-ной сыворотке крови. Действие HOCl на накопление анафилатоксинов оценивали также в 70%-ной сыворотке крови в PBS в присутствии или в отсутствие зимозана. В состав проб входили 10 мкл супензии зимозана, предварительно обработанного на кипящей бане и переведенного в PBS, 5 мкл HOCl в конечной концентрации 16 мМ и 35 мкл сыворотки. Пробы инкубировали 30 мин при 37°C и регистрировали анафилатоксины, как описано выше.

Получение АМП. Кателицидин LL-37 человека получали методом твердофазного синтеза по Fmoc/*t*Bu (флуоренилметилоксикарбонил/*трем*-бутил)-стратегии с использованием стандартного протокола [69]. Молекулярную массу подтверждали методом масс-спектрометрии в рефлекторном режиме регистрации положительных ионов с использованием MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометра Ultraflextreme (Bruker, Германия). В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (DHB, Bruker, Германия). HNPs выделяли из экстрактов лейкоцитов человека, как описано ранее [70]. Кратко, серию экстрактов получали с помощью 0.3%-ного цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ) в гомогенизаторе Поттера, позднее экстракты подвергали твердофазной экстракции на картридже C18 (элюент – 13%-ный ацетонитрил) с последующей вакуумной сушкой; затем HNPs очищали с помощью оффВЭЖХ при изократической элюции 23%-ным ацетонитрилом в присутствии 0.1%-ной трифтторуксусной кислоты, присутствие и чистоту HNPs определяли с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии уксусной кислоты и мочевины [71]. Результаты масс-спектрометрии MALDI-TOF LL-37 и результаты очистки HNPs приведены на рис. S3 и рис. S4 в дополнительных материалах.

Оценка совместного действия АМП и HOCl. Антимикробные тесты проводили в отношении грамположительной бактерии *Listeria*

monocytogenes EGD и грамотрицательной бактерии *Escherichia coli* ML-35р методом подсчета колоний [72]. Оба штамма были любезно предоставлены проф. Р. Лерером из Калифорнийского университета (Лос-Анджелес, США). Бактерии в логарифмической фазе роста отмывали от среды в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7.4). В круглодонные лунки планшета добавляли по 10 мкл супензии бактерии (10^4 КОЕ/мл) и по 5 мкл растворов исследуемых веществ (LL-37 либо HNPs и HOCl), полученных с помощью двукратных серийных разведений. Планшет инкубировали 60 мин при 37°C на шейкере. Затем по 10 мкл проб инокулировали на чашки Петри, заливали средой Trypticase Soy Agar (Himedia, Индия), термостатированной при 45°C, и инкубировали в течение ночи при 37°C. Подсчитывали число колоний на чашках и выражали выживаемость бактерий в процентах от контроля, т.е. в пробах с буфером без добавления antimикробных веществ. Рассчитывали минимальную ингибирующую концентрацию (МИК, т.е. минимальную концентрацию, приводящую к отсутствию колоний на чашках Петри) веществ в отсутствие и в присутствии второго исследуемого вещества, фракционную ингибирующую концентрацию (ФИК) и индекс фракционной ингибирующей концентрации (ИФИК):

$$IFIK = FIK_{HOCl} + FIK_{AMP} = \frac{MIK_{HOCl(+AMP)}}{MIK_{HOCl}} + \frac{MIK_{AMP(+HOCl)}}{MIK_{AMP}}.$$

Значения ИФИК от 0.5 до 1 интерпретировали как аддитивизм.

Определение концентрации веществ, эритроцитов и бактерий. Концентрации исследуемых веществ, Er^{rab} и бактерий рассчитывали по данным оптической плотности соответствующих растворов и супензий, определенной на спектрофотометре DU720 (Beckman Coulter Inc., США). Концентрацию H_2O_2 определяли с помощью коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{240} = 43.6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$; концентрацию HOCl (в виде NaOCl) определяли в присутствии 0.1 М NaOH с использованием $\epsilon_{292} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [73]; концентрацию LL-37 – с использованием $\epsilon_{214} = 58\,639 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$; концентрацию суммарной фракции HNPs – с использованием одинакового для всех трех мажорных изоформ $\epsilon_{280} = 10\,345 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Концентрацию Er^{rab} определяли, добавляя к супензии эритроцитов дистиллированную воду для осмотического лизиса и вы свобождения гемоглобина в раствор, считая, что $10^9 Er^{rab}/\text{мл}$ дают значение ОП₅₄₁ ~ 0.35. Концентрацию бактерий определяли, считая, что 1 ед. ОП₆₂₀ соответствует 10^8 КОЕ/мл.

Обработка экспериментальных данных и программное обеспечение. Полученные экспериментальные данные в виде значений оптической плотности или выживаемости бактерий обрабатывали с помощью языка R v4.3.0 в интегрированной среде разработки RStudio v2023.03.0 [74]. Для визуализации данных использовали пакеты ggplot2 v3.4.2 [75] и ggpubr v0.6.0 [76].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование уточняет представления о регуляции активности системы комплемента АМК. H_2O_2 и HO^- , по нашим представлениям, не принимают участия в модуляции комплемента, при этом HOCl усиливает жидкофазную и ингибирует поверхностную активацию комплемента за счет неуточненных механизмов. Модулирующие эффекты HOCl достигаются при ее концентрациях выше бактерицидных. Таким образом, HOCl во внеклеточной среде и в концентрациях, достаточных для проявления собственной антимикробной активности может супрессировать работу петли усиления комплемента. С одной стороны, это может приводить к подавлению генерации провоспалительных производных (C3a, C5a) и снижению ответа макроорганизма в условиях воспаления, сопровождающегося избыточной активацией и дегрануляцией фагоцитов, с другой – к снижению опсонизации патогенных частиц. HOCl и АМП проявляют бактерицидное действие по типу аддитивизма, т.е. можно заключить, что кислород-зависимые и кислород-независимые механизмы не препятствуют, но и не помогают антимикробному действию друг друга в фагосоме. Полученные нами результаты *in vitro*, даже с использованием различных моделей, могут не отражать корректно процессы, происходящие *in vivo*. Характер модуляции комплемента и совместное бактерицидное действие АМК с эндогенными АМП могут быть учтены при применении гипохлорита натрия как антисептика, при разработке и внедрении в клиническую практику пептидных антибиотиков нового поколения и модуляторов системы комплемента.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории диагностики вирусных инфекций отделения клинической микробиологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова за получение и предоставление сыворотки крови; Д.А. Юдину и М.В. Гальяновой за участие в синтезе LL-37.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (государственное задание № 122020300189-6).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическими стандартами институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Сыворотка крови была получена медицинскими работниками с информированного согласия здоровых добровольцев.

Эритроциты получали от кролика, содержавшегося в виварии в условиях, соответствующих ветеринарно-гигиеническим требованиям. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равнозначенный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uribe-Querol E., Rosales C. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01066>
2. Burn G.L., Foti A., Marsman G., Patel D.F., Zychlinsky A. // *Immunity*. 2021. V. 54. P. 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2021.06.006>
3. Katsuyama M. // *J. Pharmacol. Sci.* 2010. V. 114. P. 134–146. <https://doi.org/10.1254/jphs.10r01cr>
4. Zheng M., Liu Y., Zhang G., Yang Z., Xu W., Chen Q. // *Antioxidants (Basel)*. 2023. V. 12. P. 1675. <https://doi.org/10.3390/antiox12091675>
5. Andrés C.M.C., Pérez de la Lastra J.M., Juan C.A., Plou F.J., Pérez-Lebeña E. // *Stresses*. 2022. V. 2. P. 256–274. <https://doi.org/10.3390/stresses2030019>
6. Aratani Y. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2018. V. 640. P. 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>

7. Arnhold J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 8057. <https://doi.org/10.3390/ijms21218057>
8. Pattison D.I., Davies M.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 2001. V. 14. P. 1453–1464. <https://doi.org/10.1021/tx0155451>
9. Weiss S.J. // *N. Engl J. Med.* 1989. V. 320. P. 365–376. <https://doi.org/10.1056/NEJM198902093200606>
10. Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
11. Lehrer R. I., Lu W. // *Immunol. Rev.* 2012. V. 245. P. 84–112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01082.x>
12. Ridyard K.E., Overhage J. // *Antibiotics (Basel)*. 2021. V. 10. P. 650. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060650>
13. Ricklin D., Reis E.S., Mastellos D.C., Gros P., Lambris J.D. // *Immunol. Rev.* 2016. V. 274. P. 33–58. <https://doi.org/10.1111/imr.12500>
14. Tack B.F., Harrison R.A., Janatova J., Thomas M.L., Prahl J.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 5764–5768. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.5764>
15. Law S.K., Dodds A.W. // *Protein. Sci.* 1997. V. 6. P. 263–274. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060201>
16. Shokal U., Eleftherianos I. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 759. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00759>
17. Forneris F., Ricklin D., Wu J., Tzekou A., Wallace R.S., Lambris J.D., Gros P. // *Science*. 2010. V. 330. P. 1816–1820. <https://doi.org/10.1126/science.1195821>
18. Fearon D.T., Austen K.F. // *J. Exp. Med.* 1975. V. 142. P. 856–863. <https://doi.org/10.1084/jem.142.4.856>
19. Lachmann P.J., Lay E., Seilly D.J. // *FASEB J.* 2018. V. 32. P. 123–129. <https://doi.org/10.1096/fj.201700734>
20. Xie C.B., Jane-Wit D., Pober J.S. // *Am. J. Pathol.* 2020. V. 190. P. 1138–1150. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.02.006>
21. D'Autréaux B., Toledano M.B. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
22. Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. P. 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>
23. Hawksworth O.A., Coulthard L.G., Woodruff T.M. // *Mol. Immunol.* 2017. V. 84. P. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.11.010>
24. Alfadda A.A., Sallam R.M. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2012. P. 936486. <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
25. Gierlikowska B., Stachura A., Gierlikowski W., Demkow U. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 666732. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.666732>
26. Mastellos D.C., Hajishengallis G., Lambris J.D. // *Nat. Rev. Immunol.* 2024. V. 24. P. 118–141. <https://doi.org/10.1038/s41577-023-00926-1>
27. Goldstein I.M., Weissmann G. // *J. Immunol.* 1974. V. 113. P. 1583–1588. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.113.5.1583>
28. Johnson U., Ohlsson K., Olsson I. // *Scand. J. Immunol.* 1976. V. 5. P. 421–426. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1976.tb00296.x>
29. Orr F.W., Varani J., Kreutzer D.L., Senior R.M., Ward P.A. // *Am. J. Pathol.* 1979. V. 94. P. 75–83.
30. Taylor J.C., Crawford I.P., Hugli T.E. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 3390–3396. <https://doi.org/10.1021/bi00634a016>
31. Venge P., Olsson I. // *J. Immunol.* 1975. V. 115. P. 1505–1508. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.115.6.1505>
32. Vogt W. // *Immunobiology*. 2000. V. 201. P. 470–477. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(00\)80099-6](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(00)80099-6)
33. Ward P.A., Hill J.H. // *J. Immunol.* 1970. V. 104. P. 535–543. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.104.3.535>
34. Кренев И.А., Берлов М.Н., Умякова Е.С. // *Иммунология*. 2021. Т. 42. С. 426–433. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2021-42-4-426-433>
35. van den Berg R.H., Faber-Krol M.C., van Wetering S., Hiemstra P.S., Daha M.R. // *Blood*. 1998. V. 92. P. 3898–3903. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.10.3898>
36. Groeneveld T.W., Ramwadhdoebé T.H., Trouw L.A., van den Ham D.L., van der Borden V., Drijfhout J.W., Hiemstra P.S., Daha M.R., Roos A. // *Mol. Immunol.* 2007. V. 44. P. 3608–3614. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.03.003>
37. Nordahl E.A., Rydengård V., Nyberg P., Nitsche D.P., Mörgelin M., Malmsten M., Björck L., Schmidtchen A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. P. 16879–16884. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406678101>
38. Sonesson A., Ringstad L., Nordahl E.A., Malmsten M., Mörgelin M., Schmidtchen A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2007. V. 1768. P. 346–353. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.10.017>
39. Pasupuleti M., Walse B., Nordahl E.A., Mörgelin M., Malmsten M., Schmidtchen A. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 2520–2528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607848200>
40. Shingu M., Nobunaga M. // *Am. J. Pathol.* 1984. V. 117. P. 201–206.
41. Shingu M., Nonaka S., Nishimukai H., Nobunaga M., Kitamura H., Tomo-Oka K. // *Clin. Exp. Immunol.* 1992. V. 90. P. 72–78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb05834.x>
42. Vogt W., Damerau B., von Zabern I., Nolte R., Brunahl D. // *Mol. Immunol.* 1989. V. 26. P. 1133–1142. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(89\)90057-6](https://doi.org/10.1016/0161-5890(89)90057-6)
43. Vogt W., Zimmermann B., Hesse D., Nolte R. // *Mol. Immunol.* 1992. V. 29. P. 251–256. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(92\)90106-8](https://doi.org/10.1016/0161-5890(92)90106-8)
44. Vogt W., Hesse D. // *Immunobiology*. 1992. V. 184. P. 384–391. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(11\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(11)80595-4)
45. Vogt W. // *Immunobiology*. 1996. V. 195. P. 334–346. [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(96\)80050-7](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(96)80050-7)

46. *Clark R.A., Klebanoff S.J.* // *J. Clin. Invest.* 1979. V. 64. P. 913–920.
<https://doi.org/10.1172/JCI109557>
47. *Coble B.I., Dahlgren C., Hed J., Stendahl O.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 802. P. 501–505.
[https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90369-6](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90369-6)
48. *Miller T.E.* // *J. Bacteriol.* 1969. V. 98. P. 949–955.
<https://doi.org/10.1128/jb.98.3.949-955.1969>
49. *Lichtenstein A.K., Ganz T., Selsted M.E., Lehrer R.I.* // *Cell. Immunol.* 1988. V. 114. P. 104–116.
[https://doi.org/10.1016/0008-8749\(88\)90258-4](https://doi.org/10.1016/0008-8749(88)90258-4)
50. *Vissers M.C., Winterbourn C.C.* // *Biochem. J.* 1987. V. 245. P. 277–280.
<https://doi.org/10.1042/bj2450277>
51. *Shao B., Belaaouaj A., Verlinde C.L., Fu X., Heinecke J.W.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 29311–29321.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M504040200>
52. *Hawkins C.L., Davies M.J.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2005. V. 18. P. 1600–1610.
<https://doi.org/10.1021/tx050207b>
53. *Krishna H., Avinash K., Shivakumar A., Al-Tayar N.G.S., Shrestha A.K.* // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2021. V. 251. P. 119358.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.119358>
54. *Peffault de Latour R., Brodsky R.A., Ortiz S., Risitano A.M., Jang J.H., Hillmen P., Kulagin A.D., Kulasekararaj A.G., Rottinghaus S.T., Aguzzi R., Gao X., Wells R.A., Szer J.* // *Br. J. Haematol.* 2020. V. 191. P. 476–485.
<https://doi.org/10.1111/bjh.16711>
55. *Forman H.J., Bernardo A., Davies K.J.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 603. P. 48–53.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.005>
56. *Pravda J.* // *Mol. Med.* 2020. V. 26. P. 41.
<https://doi.org/10.1186/s10020-020-00165-3>
57. *Lipcsey M., Bergquist M., Sirén R., Larsson A., Huss F., Pravda J., Furebring M., Sjölin J., Janols H.* // *Biomedicines.* 2022. V. 10. P. 848.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines10040848>
58. *Huber-Lang M., Ekdahl K.N., Wiegner R., Fromell K., Nilsson B.* // *Semin. Immunopathol.* 2018. V. 40. P. 87–102.
<https://doi.org/10.1007/s00281-017-0646-9>
59. *Weiss S.J., Peppin G., Ortiz X., Ragsdale C., Test S.T.* // *Science.* 1985. V. 227. P. 747–749.
<https://doi.org/10.1126/science.2982211>
60. *Peppin G.J., Weiss S.J.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. P. 4322–4326.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.12.4322>
61. *Fu X., Kassim S.Y., Parks W.C., Heinecke J.W.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 41279–41287.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M106958200>
62. *Wang Y., Rosen H., Madtes D.K., Shao B., Martin T.R., Heinecke J.W., Fu X.* // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 31826–31834.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M704894200>
63. *Siddiqui T., Zia M.K., Ali S.S., Rehman A.A., Ah-san H., Khan F.H.* // *Arch. Physiol. Biochem.* 2016. V. 122. P. 1–7.
<https://doi.org/10.3109/13813455.2015.1115525>
64. *DiScipio R.G., Smith C.A., Muller-Eberhard H.J., Hugli T.E.* // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 10629–10636.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44503-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44503-0)
65. *Zharkova M.S., Komlev A.S., Filatenkova T.A., Sukhareva M.S., Vladimirova E.V., Trulioff A.S., Orlov D.S., Dmitriev A.V., Afinogenova A.G., Spiridonova A.A., Shamova O.V.* // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. P. 291.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010291>
66. *Krenev I.A., Umnyakova E.S., Eliseev I.E., Dubrovskii Y.A., Gorbunov N.P., Pozolotin V.A., Komlev A.S., Panteleev P.V., Balandin S.V., Ovchinnikova T.V., Shamova O.V., Berlov M.N.* // *Mar. Drugs.* 2020. V. 18. P. 631.
<https://doi.org/10.3390/md18120631>
67. *Umnyakova E.S., Gorbunov N.P., Zhakhov A.V., Krenev I.A., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N., Berlov M.N.* // *Mar. Drugs.* 2018. V. 16. P. 480.
<https://doi.org/10.3390/md16120480>
68. *Fearon D.T., Austen K.F.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. P. 1683–1687.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.4.1683>
69. *Fields G.B., Noble R.L.* // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990. V. 35. P. 161–214.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>
70. *Pozolotin V.A., Umnyakova E.S., Kopeykin P.M., Komlev A.S., Dubrovskii Y.A., Krenev I.A., Shamova O.V., Berlov M.N.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 741–748.
<https://doi.org/10.1134/S1068162021030158>
71. *Smith B.J.* // *Methods Mol. Biol.* 1984. V. 1. P. 63–73.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:63>
72. *Berlov M.N., Korableva E.S., Andreeva Y.V., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N.* // *Biochemistry (Moscow).* 2007. V. 72. P. 445–451.
<https://doi.org/10.1134/S0006297907040128>
73. *Świerczyńska M., Ślowiński D., Michałski R., Romański J., Podsiadły R.* // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 6055.
<https://doi.org/10.3390/molecules28166055>
74. *A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
<https://www.R-project.org/>
75. *Wickham H.* // *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* New York: Springer-Verlag, 2016.
76. *Kassambara A.* // *ggsplot: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots.* R package version 0.6.0, 2023.
<https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>

Characterization of Combined Effects of Reactive Oxygen Metabolites, Complement System, and Antimicrobial Peptides *In Vitro*

I. A. Krenov*, #, E. V. Egorova*, **, N. P. Gorbunov*, *, V. A. Kostevich*, A. V. Sokolov*, **, A. S. Komlev*, Y. A. Zabrodskaya****, *****,
O. V. Shamova*, **, and M. N. Berlov*, ****

*Phone: +7 (812) 234-07-64; e-mail: il.krenov13@yandex.ru

* Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197022 Russia

** St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7–9, St. Petersburg, 199034 Russia

*** St. Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology,
ul. Mira 14, St. Petersburg, 197101 Russia

**** Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University,
ul. Politekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia

***** A. A. Smorodintsev Research Institute of Influenza,
ul. Professora Popova 15/17, St. Petersburg, 197376 Russia

Phagocytes activation results in the production of reactive oxygen metabolites (ROM) exerting antimicrobial and host-damaging activity. Although the main pool of papers shows their potentiating action on a key humoral nexus of innate immunity, complement system, the data are controversial. Combined action of ROM with antimicrobial peptides of phagocytes also remains poorly characterized. We have investigated the influence of oxidative burst products on complement activation in different *in vitro* models. Hydrogen peroxide, including that in medium with Fe-EDTA did not affect parameters of complement activity in human blood serum. HOCl in millimolar concentrations stimulated production of C3a and C5a anaphylatoxins in 80% serum, the effect was inhibited by EDTA. We have identified bivalent ions-independent C5 cleavage in the presence of 16 mM HOCl. At the same time, HOCl served as an inhibitor of the alternative complement pathway in the model of surface-associated activation on rabbit erythrocytes in 5% serum. It inhibited production of C3a ($IC_{50} \sim 4$ mM) and C5a as well as serum hemolytic activity ($IC_{50} \sim 0.2$ mM); the inhibition of C5a generation was less pronounced in the presence of 4–16 mM HOCl. Decrease in anaphylatoxins generation was also observed in the system with zymosan in 5% serum. Under similar conditions but without activating surfaces, moderate HOCl concentrations enhanced C3a and C5a accumulation; EDTA inhibited this effect completely (C3a) or partially (C5a). Finally, in 70% serum, 16 mM HOCl enhanced the anaphylatoxins accumulation but in the presence of zymosan it inhibited this process almost completely. We hypothesize that HOCl can attack the thioester bond in C3 protein to form C3(HOCl) adduct which is capable of fluid-phase convertases formation; however, the attack of C3b can prevent its covalent fixation on membranes and blocks the complement amplification loop. Besides, we have demonstrated the additive character of the combined action of HOCl with antimicrobial peptides (LL-37 cathelicidin and α -defensins) towards *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. The data obtained precise the picture of the interaction between bactericidal factors of phagocytes and complement as key participants of the immune defense and host damage.

Keywords: reactive oxygen metabolites, hypochlorous acid, complement, antimicrobial peptides, phagocytes, neutrophils, inflammation, C3, anaphylatoxins