

УДК 616.98:578.831.21.083.338

ИНГИБИРУЮЩИЙ ЭФФЕКТ АНТАГОНИСТОВ РЕЦЕПТОРА P2X7 НА ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 МАКРОФАГАМИ ЧЕЛОВЕКА В ОТВЕТ НА ДЕЙСТВИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ α -ДЕФЕНЗИНОВ

Ю. В. ЧАЛЫЙ¹⁾, Н. Н. НАШКЕВИЧ²⁾

¹⁾Университет Айовы, 2191 ML 500, ул. Ньютон-роуд, IA 52242, Айова Сити, США

²⁾Международный государственный экологический институт им. А. Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Миелоидные α -дефензины – мультифункциональные катионные пептиды системы врожденного иммунитета – играют важную роль в инфекционно-воспалительной патологии человека. Ранее нами было показано участие HNP 1–3 (human neutrophil peptides 1–3) в регуляции воспаления за счет стимуляции экспрессии ряда цитокинов, в том числе хемокина интерлейкина-8 (ИЛ-8, CXCL8), в моноцитах крови и других клетках человека, однако механизмы подобных эффектов HNP изучены недостаточно. При помощи антагонистов рецептора P2X7 – ингибиторов PPADS и KN-62 – показано эффективное подавление продукции ИЛ-8 в ответ на действие HNP в культуре макрофагов человека, в то время как вызванная фактором некроза опухолей- α продукция ИЛ-8 практически не ингибировалась KN-62. Данные указывают на возможное вовлечение пуриnergического рецептора P2X7 в клеточные ответы макрофагов при стимуляции миелоидными дефензинами и могут быть полезны для понимания механизмов участия HNP в воспалении в норме и при патологии, а также совершенствования методов диагностики и лечения дефензин-ассоциированных заболеваний.

Ключевые слова: α -дефензины; антагонисты рецептора P2X7; макрофаги; интерлейкин-8 (CXCL8).

Благодарность. Работа поддержана грантами 03-55-2196 и 03-50-4211 INTAS.

INHIBITORY EFFECT OF P2X7 RECEPTOR ANTAGONISTS ON NEUTROPHIL α -DEFENSIN-INDUCED INTERLEUKIN-8 PRODUCTION BY HUMAN MACROPHAGES

Y. V. CHALY^a, N. N. NASHKEVICH^b

^aUniversity of Iowa, 2191 ML 500, Newton Rd., IA 52242, Iowa City, USA

^bInternational Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University,
Daihabrodskaja Street, 23/1, 220070, Minsk, Belarus

Corresponding author: N. N. Nashkevich (nnash2001@mail.ru)

Myeloid α -defensins are multifunctional cationic peptides of innate immune system that play an important role in infection, inflammation and human disease. We previously showed participation of HNP 1–3 (human neutrophil peptides 1–3) in regulation of inflammation by stimulation of monocytes and non-monocytic cells to express some cytokines,

Образец цитирования:

Чалый Ю. В., Нашкевич Н. Н. Ингибирующий эффект антагонистов рецептора P2X7 на продукцию интерлейкина-8 макрофагами человека в ответ на действие нейтрофильных α -дефензинов // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2017. № 2. С. 25–30.

For citation:

Chaly Y. V., Nashkevich N. N. Inhibitory effect of P2X7 receptor antagonists on neutrophil α -defensin-induced interleukin-8 production by human macrophages. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2017. No. 2. P. 25–30 (in Russ.).

Авторы:

Юрий Владимирович Чалый – кандидат биологических наук; ассистент-профессор отдела педиатрии медицинского колледжа им. Д. В. Карвера Университета Айовы.

Наталья Николаевна Нашкевич – кандидат биологических наук; доцент кафедры радиационной гигиены и эпидемиологии.

Authors:

Yury Chaly, PhD (biology); research assistant professor of pediatrics – rheumatology, stead family department of pediatrics, Carver College of Medicine, University of Iowa.

Natallia Nashkevich, PhD (biology); associate professor at the department of radiation hygiene and epidemiology.
nnash2001@mail.ru

i. e. chemokine interleukin-8 (IL-8, CXCL8), in response to HNP, but mechanisms of this induction remained unclear. Using P2X7 receptor antagonists PPADS and KN-62 an effective inhibition of HNP-dependent IL-8 induction in cultures of human macrophages was shown. In contrast to the effect of P2X7 antagonists on, TNF α -induced IL-8 induction was resistant to the action of KN-62. The data suggest the possible involvement of purinergic P2X7 receptor in cell effects of macrophages mediated by neutrophil-released HNP. Our data are useful for understanding of a role of HNP in inflammatory responses and pathological events, as well as for development of tools for neutralization of HNP-mediated detrimental cell effects and improving of diagnostic and therapy methods for HNP-dependent pathologies.

Key words: α -defensins; P2X7 receptor antagonists; macrophages; interleukin-8 (CXCL8).

Acknowledgements. The work is supported by grants 03-55-2196 and 03-50-4211 INTAS.

Введение

Полиморфно-ядерные нейтрофильные гранулоциты (далее – ПМН) преобладают среди лейкоцитов крови и являются важнейшим элементом врожденного иммунитета. В азурофильных гранулах ПМН человека присутствуют в основном α -дефензины (human neutrophil peptides, HNP-1, -2, -3, -4), эффективно нейтрализующие любые инфекционные агенты внутри фаголизосомы, а также экстраклеточно, после дегрануляции ПМН, чаще всего в ответ на наиболее значимый для ПМН хемотаксический и активирующий стимул – α -хемокин интерлейкин-8 (ИЛ-8) [1–3]. Мощные катионные микробициды HNP могут накапливаться в высоких концентрациях, которые многократно повышаются локально при инфильтрации нейтрофилами тканей в очаге инфекции [1–3]. При этом нередко реализуются не только полезные эффекторные функции дефензинов, но и патофизиологические явления, приводящие к развитию патологии с их участием [4–8].

Роль HNP как эндогенного антибиотика особенно важна в инфекционной патологии человека. Свои функции α -дефензины выполняют также в барьерных эпителиальных тканях и физиологических жидкостях, где отмечается накопление HNP при развитии патологии (например, в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с воспалительными заболеваниями легких различного генеза). Генетические дефекты, связанные с нарушениями экспрессии и регуляции HNP, часто выступают причиной иммунодефицитных состояний. С гиперпродукцией HNP могут быть связаны заболевания кожи, аллергические состояния, онкологические изменения [2–6]. В силу катионности α -дефензины могут оказаться губительными для эукариотических клеток при отсутствии защитных белковых факторов организма, обладают исключительной способностью сорбироваться на белках и клетках и долго сохраняются в тканях даже после гибели короткоживущих ПМН в очаге инфильтрации, вызывая разнообразные физиологические эффекты [8; 9]. Внутрисосудистую активацию и дегрануляцию ПМН рассматривают как механизм, приводящий к развитию системного воспалительного ответа, септического шока и мультиорганной дисфункции при генерализированных гнойно-воспалительных заболеваниях, осложнениях после тяжелых травм, ожогов и т. д. [5–7].

В предыдущих исследованиях [9–12] нами было показано участие HNP в регуляции воспаления за счет стимуляции экспрессии фактора некроза опухолей- α (ФНО- α (англ. tumor necrosis factor, TNF)), интерлейкина- 1β (ИЛ- 1β) и ИЛ-8 в моноцитах и цельной крови, а также в эпителиальных, эндотелиальных, почечно-эмбриональных и других клетках человека [11–13].

Таким образом, высокая концентрация HNP системно либо локально инициирует (усиливает) воспалительный ответ через индукцию ИЛ-8 в клетках различного тканевого происхождения, среди которых моноциты и макрофаги являются наиболее реактивными и потенциально мощными продуцентами провоспалительных цитокинов.

Многие катионные микробициды, в том числе HNP, вызывают в клетках моноцитарного ряда человека экспрессию хемокинов *in vitro* [14; 15]. В связи с этим возникает вопрос: отвечают ли сходные структурные домены этих катионных молекул за хемокиновую экспрессию и взаимодействуют ли они с теми же гипотетическими рецепторами на моноцитах/макрофагах?

Поскольку HNP может выступать стрессовым фактором для моноцитов, вызывая синтез цитокинов [8–13], мы предположили участие механизма пуринергической передачи сигнала в реализации данных эффектов HNP. У макрофагов и дендритных клеток пуринергическая передача сигналов, сопровождающаяся мобилизацией внутриклеточного кальция, служит важным «сигналом опасности» при воспалении, но вместе с тем может играть патофизиологическую роль [16; 17]. В пользу такой гипотезы говорит факт подавления ингибиторами рецепторов P2X7 продукции интерлейкина- 1β в супернатантах моноцитов крови человека в ответ на катионное производное кателицидина пептид LL-37 [15].

Рецепторы P1 и P2 (семейств P1, P2X и P2Y) являются функциональными рецепторами для экстраклеточных нуклеотидов и участвуют в пуринергической передаче сигнала, важной для функционального ответа на экстраклеточные стимулы [16; 17]. Семейство пуринорецепторов P2X (1–7) представляет

собой активируемые аденозинтрифосфатом (АТФ) катионные каналы, которые экспрессируются в том числе на макрофагах и клетках микроглии [17; 18]. Пуринорецептор P2X7, кодируемый геном P2RX, функционирует как паттерн-распознающий рецептор при апоптозе и воспалении. Присоединение лиганда в случае P2X7 влечет за собой активацию трансмембранных паннексиновых каналов, пропускающих ионы, АТФ и прочие малые молекулы из клетки, что может приводить к «кальциевым волнам» в цитоплазме и в конечном итоге к АТФ-зависимому лизису макрофагов. Активация P2X7-рецептора макрофагов ведет к быстрому созреванию и высвобождению ИЛ-1 β . К антагонистам P2X7-рецептора относят пиридоксальфосфат-6-азофенил-2',4'-дисульфоновую кислоту (PPADS), аналог сурамина NF279, а также производное изохиномина KN-62 (антагонист Ca²⁺/кальмодулин-зависимой протеинкиназы, или II CaM-киназы), который считают неконкурентным антагонистом рецептора P2X7, и др. [18].

В настоящем исследовании изучено влияние ингибиторов рецептора P2X7 на HNP-индуцированную продукцию ИЛ-8 в клетках дифференцированных макрофагов человека.

Материалы и методы исследования

Очистка и тестирование препарата HNP 1–3. Дефензины были очищены из нейтрофилов здоровых доноров, как описано в [19]. Пептиды HNP 1–3 экстрагировали из пулированных азурофильных гранул и фракционировали методом гель-фильтрации с Bio-Gel P6 (*Bio-Rad*, США). Содержащие HNP фракции подвергали высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хромато-масс-спектрометре с диодно-матричным детектором (*Agilent1100*, США) с помощью колонки *Zorbax C18 (Pharmacia)*. Элюирование проводили в линейном градиенте с использованием следующей системы: ацетонитрил (А), вода и 0,1 % трифторуксусной кислоты (ТФУ) (Б). Полученный препарат HNP растворяли в 0,01 % уксусной кислоте и хранили при –20 °С до проведения анализа. В конечном препарате HNP с помощью хромогенного LAL-теста (*Hbt*, Уден, Нидерланды) контролировали содержание липополисахарида, которое не превышало 5 пг/мл в расчете на 100 мкг/мл пептидов. Приемлемый уровень чистоты препарата (> 98 %) подтверждали с помощью трицин-ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле, гель-электрофореза для катионных белков и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации. Очищенный препарат HNP содержал смесь HNP1, -2 и -3 в соотношении 5 : 3 : 2 соответственно.

Протоколы выделения и культивирования клеток. Мононуклеары периферической крови человека получали из гепаринизированной донорской крови по стандартной методике с помощью *Ficoll/Paque (Amersham)*. Нейтрофилы изолировали из гепаринизированной крови после седиментации эритроцитов на декстране с последующим градиентным центрифугированием клеток с использованием *Ficoll/Paque* [20]. Моноциты выделяли по протоколу СС-элютриации, как описано в [21].

Культуру макрофагов получали путем семидневного культивирования моноцитов крови (10⁶ кл./мл) в планшетах (*Nunc*, Висбаден, ФРГ) в среде культивирования DMEM (*Biochrom*, Берлин, ФРГ), содержащей 10 % фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (*Roche*), 2 ммоль/л глутамина, 1 ммоль/л пирувата натрия, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, с добавлением 100 нг/мл рекомбинантного макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF) человека (*R&D Systems*, Висбаден, ФРГ). Чистоту зрелых макрофагов по истечении периода культивирования подтверждали проточной цитофлюориметрией после иммуноцитохимической окраски поверхностных маркеров CD1a, CD14, CD83 и CD209, как описано в [22].

Стимулирование макрофагов. Для проведения *in vitro* стимуляции и ингибирования продукции ИЛ-8 дифференцированные макрофаги переносили в 96-луночные планшеты для культуры клеток (*Nunc*) в объеме 0,1 мл на лунку в среде RPMI-160, содержащей 5 % ФБС. Макрофаги (10⁵ кл./мл) культивировали в течение 30 мин в присутствии 100 мкмоль/л PPADS, 300 нмоль/л KN-62 (*Sigma-Aldrich*, Сент-Луис, США) либо без них. Затем клетки стимулировали нейтрофильными дефензинами HNP (30 мкмоль/л) или рекомбинантным TNF α (*PeptoTech*, Роки Хилл, США) в концентрации 5 нг/мл. Культивирование продолжали при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. Клеточные супернатанты собирали и центрифугировали. Уровень продуцируемого ИЛ-8 тестировали методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа UptiBlue (*Interchim*, Монлюсон, Франция) согласно рекомендациям производителя либо стандартным методом исключения трипанового синего.

ИФА. Содержание ИЛ-8 в супернатантах культур стимулированных клеток выявляли с помощью собственного ИФА на основе моноклональных антител (МКА) 4С и биотинилированного МКА 3А, как описано в [23], с ИЛ-8 человека (*PeptoTech*) в качестве стандартного белка. Количество HNP определяли методом «сэндвич»-ИФА, используя анти-HNP антитела, как описано в [24], с нативными очищенными HNP 1–3 (*Hbt*) в качестве стандартных пептидов.

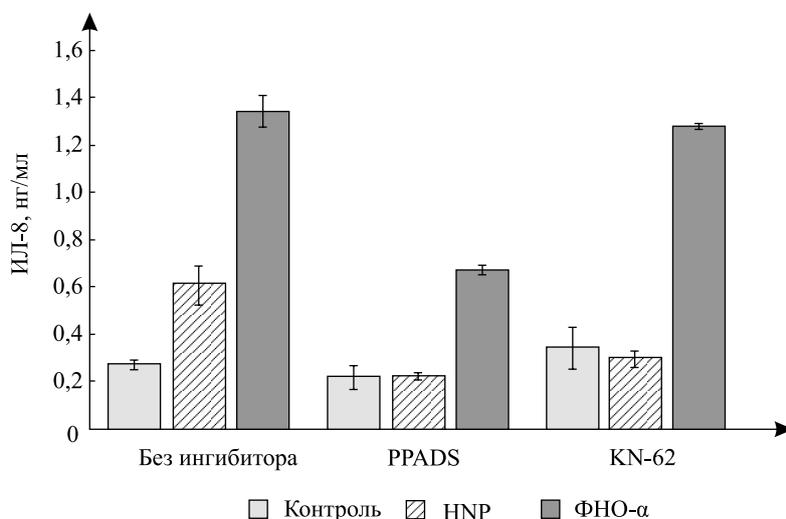
Статистический анализ. Рассчитывали средние значения и стандартные отклонения уровня ИЛ-8 (Mean \pm SE), измеренные трехкратно в супернатантах стимулированных клеток в культурах *in vitro*. Определения повторяли не менее чем в трех независимых экспериментах. Статистический анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента (при $p < 0,05$ различия считали значимыми).

Результаты исследования и их обсуждение

Нейтрофильные дефензины способны индуцировать синтез ИЛ-8 в культуре моноцитов крови человека, что было показано ранее в [7–11]. Мы предположили, что в культуре макрофагов, дифференцированных *in vitro* из моноцитов в присутствии M-CSF, HNP также вызовут синтез ИЛ-8, причем закономерности и механизмы данного эффекта HNP должны быть общими как для моноцитов, так и для макрофагов. В экспериментах в клеточных культурах макрофагов HNP эффективно индуцировали продукцию ИЛ-8 с тем же профилем индукции. Обнаружена чувствительность синтеза ИЛ-8 к ингибированию фосфорилирования и активации митоген-активированных протеинкиназ (МАР-киназ), экстраклеточной сигнал-регулируемой киназы 1/2 (ERK1/2) и p38 в клетках макрофагов в ответ на HNP (данные не представлены). Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукция ИЛ-8 опосредована активацией клеточных рецепторов, прямо либо косвенно связанных с передачей сигнала через МАР-киназы.

В качестве наиболее вероятного кандидата на роль «HNP-рецептора», опосредующего продукцию ИЛ-8 в клетках моноцитарно-макрофагального ряда, в настоящем исследовании выступал пуринергический рецептор P2X7.

На рисунке показано, что антагонисты рецептора P2X7 – ингибиторы PPADS и KN-62 – эффективно подавляли индукцию ИЛ-8 в ответ на действие HNP (более чем на 50 %; $p < 0,05$) на уровне белка в культуре стимулированных макрофагов.



Влияние антагонистов рецептора P2X7 (PPADS и KN-62) на продукцию ИЛ-8, индуцированную в культуре макрофагов человека (10^5 кл./мл) в присутствии 300 нмоль/л нейтрофильных α -дефензинов HNP 1–3 либо 5 нг/мл ФНО- α (контроль – варианты без внесения стимула)

Effects of P2X7 receptor antagonists PPADS and KN-62 on IL-8 production induced in the presence of 300 nmol/l neutrophil α -defensins HNP1-3 or 5 ng/ml TNF- α in a culture of human macrophages (10^5 cells/ml) (control – variants without stimulation)

Индукция ИЛ-8 в ответ на лиганд рецептора P2X7 (2'-3'-O-(4-бензоил-бензоил)-АТФ) также эффективно подавлялась в присутствии антагонистов (результаты не представлены).

В то же время продукция ИЛ-8 в ответ на ФНО- α в контрольном варианте теста была практически неизменной в присутствии ингибитора KN-62 и снизилась наполовину под действием PPADS.

Наши предварительные данные относительно активации МАР-киназ ERK1/2 и p38 в клетках макрофагов в ответ на HNP и полученные результаты ингибирования у макрофагов индуцированного HNP синтеза ИЛ-8 антагонистами рецептора P2X7 [25; 26] поддерживают гипотезу об участии рецептора P2X7 моноцитов/макрофагов в реализации описанных эффектов HNP.

Показано, что индукторами ИЛ-8 у клеток в целом и у моноцитов и макрофагов в особенности могут быть стрессовые факторы различной природы, к числу которых можно отнести и действие катионных пептидов на мембраны эукариотических клеток. Так, HNP могут выступать деструктивным

стрессовым фактором при неадекватной (чрезмерной или аномально локализованной) продукции дефензинов в тканях либо кровотоке и таким образом запускать патогенные реакции [8–13], одним из механизмов реализации которых служит активация P2X7, с последующими патофизиологическими эффектами.

Изучение роли HNP при патологии и механизмов, лежащих в основе их действия на клетки человека, а также поиск мишеней для направленной коррекции связанных с HNP нарушений важны для совершенствования методов диагностики и лечения дефензин-ассоциированных заболеваний человека, патогенез которых связан с местным или системным воспалительным ответом. Способы направленного влияния на патологические реакции, в которые вовлечены HNP, позволяют регулировать их аномальное накопление в опасных для собственных клеток концентрациях либо нейтрализовать их патофизиологическую активность.

Библиографические ссылки

1. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity // *Nat. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 3. P. 710–720.
2. Lehrer R. I. Multispecific myeloid defensins // *Curr. Opin. Hematol.* 2007. Vol. 14. P. 16–21.
3. Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., et al. Defensins: «Simple» antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. Vol. 26, № 3. P. 361–370.
4. Нашкевич Н. Н. Альфа-дефензины – мультифункциональные молекулы нейтрофилов: роль в воспалении и инфекционной патологии человека // *Современные проблемы инфекционной патологии человека* : сб. науч. тр. Вып. 6 / под ред. Л. П. Титова. Минск, 2013. Электрон. текст. дан. С. 221–226.
5. Panyutich A. V., Panyutich E. A., Krapivin V. A., et al. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis // *J. Lab. Clin. Med.* 1993. Vol. 122. P. 202–207.
6. Кудин А. П., Нашкевич Н. Н., Коледа С. Т. и др. Содержание некоторых цитокинов в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции // *Мед. новости.* 2001. № 10. С. 66–68.
7. Акалович С. Т., Нашкевич Н. Н., Астапов А. А. и др. Содержание растворимого рецептора ФНО р55, альфа-дефензинов и ИЛ-877 и ИЛ-872 форм интерлейкина-8 в крови и ликворе детей с генерализованными формами менингококковой инфекции // *Мед. иммунология.* 2005. Т. 7. С. 575–578.
8. Чалый Ю. В., Нашкевич Н. Н., Войтенко Н. Н. Влияние радикалов кислорода, NO, повреждающих цитоскелет агентов, нейтрофильных дефензинов и фактора некроза опухолей- α на экспрессию гена интерлейкина-8 в человеческих клеточных линиях // *Инфекция и иммунитет* : материалы науч.-практ. конф., посвящ. 75-летию БелНИИЭМ (Минск, 9–10 дек. 1999 г.) Минск, 1999. С. 557–558.
9. Chaly Y., Nashkevich N., Voitenok N. Cell stress conditions induce expression of IL-8 in different cell lines // *J. Leuk. Biol. Suppl.* 2000. P. 14.
10. Misuno N. I., Kolesnikova T. S., Lehrer R. I., et al. Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor- α by human blood monocytes *in vitro* // *Biul. Eksp. Biol. Med.* 1992. Vol. 113. P. 524–527.
11. Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S., et al. Neutrophil α -defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells // *Eur. Cytokine Netw.* 2000. Vol. 11. P. 257–266.
12. Chaly Y. V., Kotlinski K. V., Sholukh A. M., et al. The induction of IL-8 in various cells by human alpha-defensins: different mechanisms of IL-8 induction by neutrophil defensins in monocytic and non-monocytic cells // *Abst. of Eighth John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology (Moscow, 10–14 Sept., 2007).* Moscow, 2007. P. 10.
13. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2005. Vol. 288, № 3. P. 508–513.
14. Boniotto M., Jordan W. J., Eskdale J., et al. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, № 4. P. 1433–1441.
15. Elssner A., Duncan M., Gavrillin M., et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release // *J. Immunol.* 2004. Vol. 172, № 8. P. 4987–4994.
16. Burnstock G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.: Biol. Sci.* 2016. Vol. 371, issue 1700. DOI: 10.1098/rstb.2015.0422.
17. Dubyak G. R. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells // *Cell Microbiol.* 2012. Vol. 14, issue 11. P. 1697–1706.
18. North R. A., Michael F. J. P2X Receptors as Drug Targets // *Mol. Pharmacol.* 2013. Vol. 83, issue 4. P. 759–769.
19. Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils // *J. Clin. Invest.* 1985. Vol. 76, issue 4. P. 1427–1435.
20. Doroshenko T., Chaly Y., Savitskiy V., et al. Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 // *Blood.* 2002. Vol. 100, issue 7. P. 2668–2671.
21. Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., et al. Phenotypical and functional characterization of Fey receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity // *Eur. J. Immunol.* 1993. Vol. 23, issue 12. P. 3126–3135.
22. Fricke I., Mitchell D., Petersen F., et al. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells // *FASEB J.* 2004. Vol. 18, № 13. P. 1588–1590.
23. Nashkevich N. N., Akalovich S., Louneva N., et al. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77) // *J. Immunol. Methods.* 2002. Vol. 270. P. 37–51.
24. Panyutich A. V., Voitenok N. N., Lehrer R. I., et al. An enzyme immunoassay for human defensins // *J. Immunol. Methods.* 1991. Vol. 141, issue 2. P. 149–155.

25. Donnelly-Roberts D. L., Namovic M. T., Faltynek C. R., et al. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 308, issue 3. P. 1053–1061.

26. Chen Q., Jin Y., Zhang K., et al. Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1beta release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages // *Innate Immun.* 2014. Vol. 20, issue 3. P. 290–300.

References

1. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2003. Vol. 3. P. 710–720. DOI: 10.1038/nri1180.
2. Lehrer R. I. Multispecific myeloid defensins. *Curr. Opin. Hematol.* 2007. Vol. 14. P. 16–21.
3. Suarez-Carmona M., Hubert P., Delvenne P., et al. Defensins: «Simple» antimicrobial peptides or broad-spectrum molecules? *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. Vol. 26, No. 3. P. 361–370.
4. Nashkevich N. N. [Alfa-defensins as multifunctional molecules of neutrophils: the role in inflammation and in infectious human pathology]. *Actual problems of human infectious pathology* : sb. nauchn. tr. Issue 6 / ed. by L. P. Titov. Minsk, 2013. P. 221–226. DVD-ROM (in Russ.).
5. Panyutich A. V., Panyutich E. A., Krapivin V. A., et al. Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis. *J. Lab. Clin. Med.* 1993. Vol. 122. P. 202–207.
6. Kudin A. P., Nashkevich N. N., Koleda S. T., et al. [Blood and liquor levels of some cytokines by children with generalized forms of meningococcal infection]. *Med. novosti.* 2001. No. 10. P. 66–68 (in Russ.).
7. Akalovich S. T., Nashkevich N. N., Kudin A. P., et al. The levels of soluble receptor of tumor necrosis factor p55, alpha-defensins and IL-877 и IL-872 forms of interleukin-8 in blood and cerebrospinal liquid of children with generalized forms of meningococcal infection. *Med. Immunol.* 2005. Vol. 7. P. 575–578 (in Russ.).
8. Chaly Y. V., Nashkevich N. N., Voitenok N. N. The effect of oxygen radicals, NO, cytoskeletal active compounds, neutrophil defensins and tumor necrosis factor- α on expression of IL-8 gene in human cell lines. *Infection and immunity* : materialy nauchn.-prakt. konf., posvyashchennoi 75-letiyu BelNIIEEM (Minsk, 9–10 Dec., 1999). Minsk, 1999. P. 557–558 (in Russ.).
9. Chaly Y., Nashkevich N., Voitenok N. Cell stress conditions induce expression of IL-8 in different cell lines. *J. Leuk. Biol. Suppl.* 2000. P. 14.
10. Misuno N. I., Kolesnikova T. S., Lehrer R. I., et al. Effects of human defensin HNP-1 on the production of tumor necrosis factor- α by human blood monocytes *in vitro*. *Biul. Eksp. Biol. Med.* 1992. Vol. 113. P. 524–527.
11. Chaly Y. V., Paleolog E. M., Kolesnikova T. S., et al. Neutrophil α -defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur. Cytokine Netw.* 2000. Vol. 11. P. 257–266.
12. Chaly Y. V., Kotlinski K. V., Sholukh A. M., et al. The induction of IL-8 in various cells by human alpha-defensins: different mechanisms of IL-8 induction by neutrophil defensins in monocytic and non-monocytic cells. *Abst. of Eighth John Humphrey Advanced Summer Program in Immunology (Moscow, 10–14 Sept., 2007)*. Moscow, 2007. P. 10.
13. Sakamoto N., Mukae H., Fujii T., et al. Differential effects of alpha- and beta-defensin on cytokine production by cultured human bronchial epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2005. Vol. 288, No. 3. P. 508–513. DOI: 10.1152/ajplung.00076.2004.
14. Boniotto M., Jordan W. J., Eskdale J., et al. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. Vol. 50, No. 4. P. 1433–1441. DOI: 10.1128/AAC.50.4.1433-1441.2006.
15. Elssner A., Duncan M., Gavrilin M., et al. A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J. Immunol.* 2004. Vol. 172, No. 8. P. 4987–4994.
16. Burnstock G. Short- and long-term (trophic) purinergic signalling. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.* 2016. Vol. 371, issue 1700. DOI: 10.1098/rstb.2015.0422.
17. Dubyak G. R. P2X7 receptor regulation of non-classical secretion from immune effector cells. *Cell Microbiol.* 2012. Vol. 14, issue 11. P. 1697–1706. DOI: 10.1111/cmi.12001.
18. North R. A., Michael F. J. P2X Receptors as Drug Targets. *Mol. Pharmacol.* 2013. Vol. 83, issue 4. P. 759–769. DOI: 10.1124/mol.112.083758.
19. Ganz T., Selsted M. E., Szklarek D., et al. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 1985. Vol. 76, issue 4. P. 1427–1435. DOI: 10.1172/JCI112120.
20. Doroshenko T., Chaly Y., Savitskiy V., et al. Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood.* 2002. Vol. 100, issue 7. P. 2668–2671. DOI: 10.1182/blood.100.7.2668.
21. Grage-Griebenow E., Lorenzen D., Fetting R., et al. Phenotypical and functional characterization of Fey receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur. J. Immunol.* 1993. Vol. 23, issue 12. P. 3126–3135. DOI: 10.1002/eji.1830231213.
22. Fricke I., Mitchell D., Petersen F., et al. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* 2004. Vol. 18, No. 13. P. 1588–1590. DOI: 10.1096/fj.03-1435fje.
23. Nashkevich N. N., Akalovich S., Louneva N., et al. A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77). *J. Immunol. Methods.* 2002. Vol. 270. P. 37–51.
24. Panyutich A. V., Voitenok N. N., Lehrer R. I., et al. An enzyme immunoassay for human defensins. *J. Immunol. Methods.* 1991. Vol. 141, issue 2. P. 149–155.
25. Donnelly-Roberts D. L., Namovic M. T., Faltynek C. R., et al. Mitogen-activated protein kinase and caspase signaling pathways are required for P2X7 receptor (P2X7R)-induced pore formation in human THP-1 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 308, issue 3. P. 1053–1061. DOI: 10.1124/jpet.103.059600.
26. Chen Q., Jin Y., Zhang K., et al. Alarmin HNP-1 promotes pyroptosis and IL-1beta release through different roles of NLRP3 inflammasome via P2X7 in LPS-primed macrophages. *Innate Immun.* 2014. Vol. 20, issue 3. P. 290–300. DOI: 10.1177/1753425913490575.

Статья поступила в редколлегию 19.05.2017.

Received by editorial board 19.05.2017.