

УДК 530.145+539.2+544.187+615.331+615.324+577.181.7+576.314
DOI: 10.56871/3461.2022.99.60.005

ТЕТА-ДЕФЕНЗИНЫ: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЕРОЯТНЫХ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С МЕМБРАНАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

© Юрий Владимирович Дадали¹, Владимир Абдулович Дадали¹, Дмитрий Юрьевич Кормилец²,
Александр Юрьевич Терехов¹, Александр Тимурович Марьянович¹

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова. 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., 47

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Контактная информация: Александр Тимурович Марьянович — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии.
E-mail: atm52@mail.ru

Поступила: 09.11.2021

Одобрена: 17.01.2022

Принята к печати: 14.03.2022

Резюме. Тета-дефензины — единственные циклические пептиды-антибиотики, продуцируемые в организме млекопитающих. Тета-дефензины активны против архей, бактерий, грибов, простейших, некоторых вирусов и даже токсинов, и свойства эти присущи именно циклической форме их молекулы. Выработка дефензинов представляет собой один из механизмов врожденного иммунитета, то есть является частью первой линии обороны макроорганизма. В данной статье мы приводим анализ квантово-химического расчета геометрии, распределения электронной плотности и параметров гидрофобности молекулы тета-дефензина, описываем ее физико-химические свойства и с этих позиций рассматриваем вероятные механизмы ее взаимодействия с мембранами микроорганизмов. Поперечный диаметр молекулы тета-дефензина позволяет ей проникать в поры, образуемые поринами в мембране бактерий. Три дисульфидных мостика придают молекуле тета-дефензина жесткость. Расстояния между этими мостиками таковы, что позволяют проникать сквозь формируемые ими пустоты (α , возможно, и сквозь стенку бактерии, в которую внедрилась молекула тета-дефензина) биогенным ионам как в свободном, так и в гидратированном состоянии, что должно привести к разрушению бактерии. Молекула тета-дефензина обладает весьма высоким дипольным моментом. Это увеличивает интенсивность диполь-дипольного взаимодействия между молекулами тета-дефензина, повышает их сродство друг к другу и может приводить к образованию комплексов этих молекул — по типу цепи или, что менее вероятно, лесенки. Тета-дефензины перспективны в качестве лекарственных антимикробных средств.

Ключевые слова: пептиды-антибиотики; дефензины; клеточные мембраны; микроорганизмы; квантово-химические расчеты.

THETA-DEFENSINS: QUANTUM-CHEMICAL ANALYSIS OF PROBABLE MECHANISMS OF INTERACTION WITH MEMBRANES OF MICROORGANISMS

© Yury V. Dadali¹, Vladimir A. Dadali¹, Dmitry Yu. Kormilets², Alexander Yu. Terekhov¹,
Alexander T. Maryanovich¹

¹ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov. 191015, Saint-Petersburg, ul. Kirochnaya, 41. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevsky pr., 47

² Military Medical Academy named after S.M. Kirov. 194044, Saint-Petersburg, Academician Lebedev str., 6

Contact information: Alexander T. Maryanovich — Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Normal Physiology.
E-mail: atm52@mail.ru

Received: 09.11.2021

Revised: 17.01.2022

Accepted: 14.03.2022



Abstract. Theta-defensins are the only cyclic antibiotic peptides produced in the mammalian body. Theta-defensins are active against archaea, bacteria, fungi, protozoa, some viruses and even toxins, and these properties are inherent to the cyclic form of their molecule. The production of defensins represents one of the mechanisms of innate immunity, i.e. it is part of the first line of defense of the macroorganism. In this article, we present the analysis of quantum-chemical calculation of the geometry, electron density distribution and hydrophobicity parameters of the theta-defensin molecule, describe its physical and chemical properties and from these positions we consider the probable mechanisms of its interaction with the membranes of microorganisms. The transverse diameter of the theta-defensin molecule allows it to penetrate into the pores formed by porins in the bacterial membrane. Three disulfide bridges give the theta-defensin molecule rigidity. The distances between these bridges are such that they allow both free and hydrated biogenic ions to pass through the voids they form (and, possibly, through the bacterial wall into which the theta-defensin molecule has embedded), which should lead to the destruction of the bacteria. The theta-defensin molecule has a very high dipole moment. This increases the intensity of the dipole-dipole interaction between the theta-defensin molecules, increases their affinity to each other and can lead to the formation of complexes of these molecules — In a chain or, less likely, staircase type. Theta-defensins are promising as medicinal antimicrobial agents.

Key words: antibiotic peptides; defensins; cell membranes; microorganisms; quantum chemical analysis.

θ-Дефензины — единственные циклические пептиды-антибиотики, продуцируемые в организме животных (все прочие известные в настоящее время соединения такого рода создаются только микроорганизмами — бактериями и грибами — и только путем нерибосомального синтеза). Выработка дефензинов представляет собой один из механизмов врожденного иммунитета, то есть является частью первой линии обороны макроорганизма [11]. В обстановке назревающего кризиса в антибиотикотерапии дефензины привлекают все больший интерес исследователей.

θ-Дефензины активны против архей, бактерий, грибов, простейших, некоторых вирусов и даже токсинов, и свойства эти присущи именно *циклической* молекуле: если искусственно разорвать одну из связей Gly–Arg, то образуется «открытый» (линейный) θ-дефензин, имеющий в три раза меньшую антимикробную активность, чем его природный циклический аналог [7]. Циклическая форма θ-дефензинов

еще и удлиняет время их жизни, защищая от расщепления протеазами [3].

Схематически циклическая структура θ-дефензина макака-резуса RTD-1 представлена на рисунке 1.

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЫ θ-ДЕФЕНЗИНА

Мы провели квантово-химические расчеты изолированной молекулы RTD-1 с целью оптимизации ее геометрии и оценки ее электронных и энергетических характеристик, а также параметров гидрофобности целой молекулы и ее фрагментов. Для этого был использован пакет прикладных программ Mopac-2016 (Stewart Computational Chemistry — SCC: Colorado Springs, CO, USA, 2016) и выбранная полупирическая параметризация (ParametricMethod 3 — PM 3) на основе метода молекулярных орбиталей (linear combination of atomic orbitals of the Hartree — Fock or self-consistent field — LCAO SCF) с учетом всех валентных электронов молекулы и пренебрежения нулевым дифференциальным перекрытием. Мы определили также величины констант гидрофобности Ганша [4] $\log P$ с помощью стандартного пакета прикладных программ. Оптимизированная геометрия молекулярной структуры RTD-1 показана на рисунке 2.

На рисунке 2 видно, что циклическая молекула RTD-1 имеет сложную несимметричную конфигурацию с выраженной большой осью молекулы и по форме отдаленно напоминает ванну. Условное «дно» такой «ванны» представлено преимущественно гидрофобными фрагментами, в том числе тремя –S–S– связями (структурно не выраженными среди аминокислотных фрагментов). В концевых областях молекулы присутствуют боковые цепи остатков аргинина, которым свойственны большая пространственная мобильность, а также способность (в силу высокой основности) присоединять протон и приобретать положительный заряд даже в нейтральной среде [9].

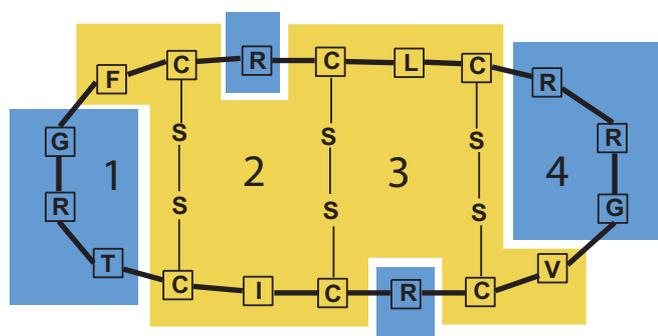


Рис. 1. Строение θ-дефензина макака-резуса RTD-1. Центральный гидрофобный ($\log P = +7,8$) и боковые гидрофильные ($\log P = -3,1$) фрагменты молекулы выделены желтым и голубым цветами соответственно. — S — S — — дисульфидные мостики, разделяющие молекулу на структурные полости, или пустоты, обозначенные на схеме как 1, 2, 3 и 4

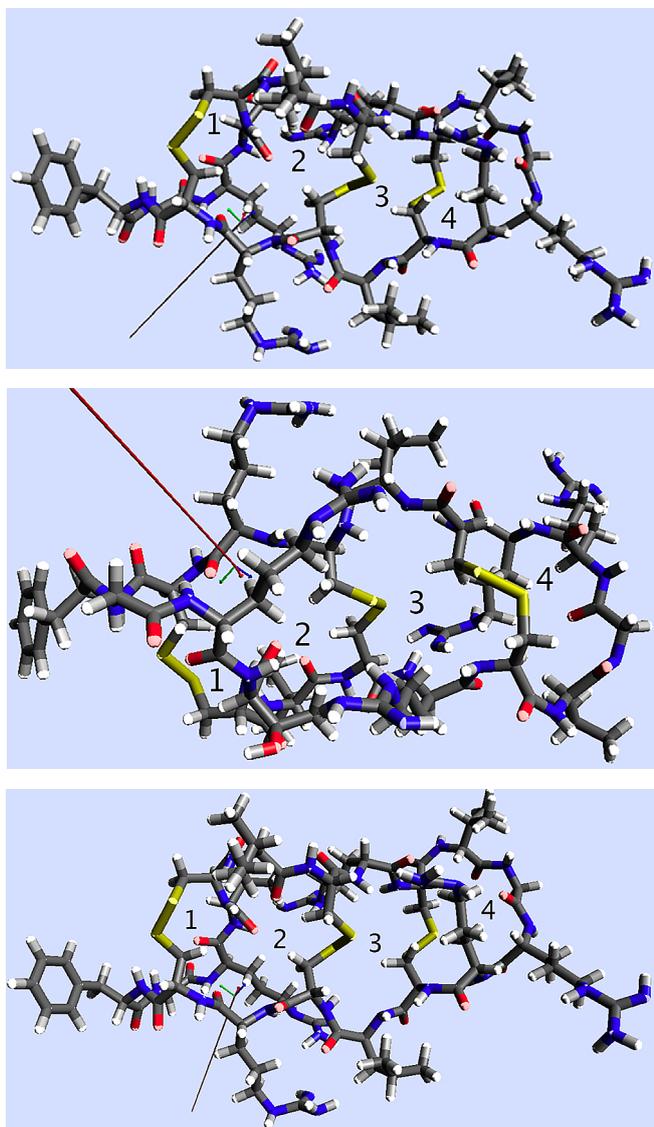


Рис. 2. Оптимизированная геометрия молекулярной структуры RTD-1.

Красная линия — расчетное направление вектора дипольного момента молекулы. Атомы обозначены цветами: черным — углерод, белым — водород, синим — азот, красным — кислород, желтым — сера дисульфидных мостиков цистиновых фрагментов —S—S—. Обозначения пустот, разделенных линиями дисульфидных мостиков, те же, что на рис. 1

В оптимизированной структуре молекулы хорошо выражены все четыре области, показанные на рис. 1 в виде «пустот». Размеры этих пустот представлены схематически на рисунке 3.

Размеры пустот в молекуле RTD-1 достаточно велики, если их сравнить с размерами некоторых биогенных ионов даже в гидратированном состоянии (табл. 1).

Видно, что диаметр гидратированных ионов меньше расчетных размеров пустот молекулы RTD-1. Именно поэтому транспорт катионов и анионов через эти отверстия в полярной молекуле RTD-1 может осуществляться достаточно эффективно в направлении или против силовых линий поля. Это позволяет предположить возможность агрегаций молекул

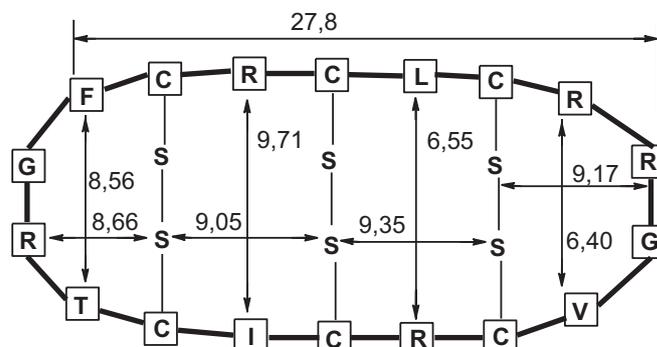


Рис. 3. Схематическое изображение и размеры (Å) оптимизированной структуры и пустот молекулы RTD-1

Таблица 1

Значения (Å) кристаллографических радиусов r_{cr} и диаметров d_{cr} некоторых ионов, а также их радиусов R_H и диаметров D_H в гидратированном состоянии

| Ионы | r_{cr} , Å | d_{cr} , Å | R_H , Å | D_H , Å |
|------------------------------|--------------|--------------|-----------|-----------|
| Li ⁺ | 0,78 | 1,56 | 3,70 | 7,40 |
| Na ⁺ | 0,98 | 1,96 | 3,30 | 6,60 |
| K ⁺ | 1,33 | 2,66 | 2,66 | 5,32 |
| NH ₄ ⁺ | 1,68 | 3,36 | 2,43 | 4,86 |
| Ca ²⁺ | 0,99 | 1,98 | 4,20 | 8,40 |
| Mg ²⁺ | 0,65 | 1,30 | 4,40 | 8,80 |
| Zn ²⁺ | 0,74 | 1,48 | 4,40 | 8,80 |
| Cl ⁻ | 1,81 | 3,62 | 2,28 | 4,56 |

θ-дефензинов, создающих ионные каналы для утечки ионов из микробной клетки. Через эти каналы возможен и перенос молекул воды и даже водных кластеров внутрь микробной клетки, что привело бы к ее набуханию и разрыву клеточной оболочки.

Полученные значения $\log P$ θ-дефензина свидетельствуют о довольно высокой суммарной гидрофильности молекулы ($\log P = -3,11$) и наличии фрагментов как гидрофильных с суммарным значением $\log P = -10,91$ (которые определяют сродство к полярным и заряженным частям мембран бактерий), так и гидрофобных — за счет гидрофобных аминокислот (их в молекуле 40%) (см. рис. 1) с суммарным значением $\log P = +7,8$, благодаря чему возможно связывание молекул RTD-1 и с гидрофобными областями мембран.

Полученные нами данные свидетельствуют об амфифильном характере молекулы θ-дефензина, однако с доминированием гидрофильных свойств. Амфифильный характер этих молекул, ассоциируемый с поверхностной активностью, позволяет предполагать и детергентный механизм деструктурирующего действия дефензинов на поверхностные липидные структуры бактерий и вирусов.

ДИПОЛЬ-ДИПОЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЛЕКУЛ Θ-ДЕФЕНЗИНА

В ходе оптимизации геометрии молекулы RTD-1 мы обнаружили, что дипольный момент молекулы исключительно ве-

лик, а именно — 14,85 D (для сравнения, для молекулы воды этот показатель составляет 1,84 D). (Debye, дебай — единица измерения дипольного момента, численно равного величине $d = q \cdot l$ радиус-вектора d и направленного от центра тяжести отрицательного электрического заряда q к центру тяжести положительного заряда молекулы. $1 D \approx 3,33564095 \cdot 10^{-30}$ Кл·м или $0,20822678 e \cdot \text{Å}$, где e — заряд электрона.) Это — векторная величина, характеризующая асимметрию распределения частичных положительного и отрицательного зарядов в электрически нейтральной молекуле. Направление вектора d указывает на преимущественную локализацию частично положительного заряда во фрагменте, включающем мотив FGRTCI условного «дна» молекулы. Преимущественная локализация частично отрицательного заряда наблюдается ближе к центру молекулы, в области ориентированных «вверх» гидрофобных фрагментов с-S-S-группами. Для наглядности ориентация вектора дипольного момента RTD-1 может быть представлена в трехмерной системе координат: на плоскостях X-Y (рис. 4) и X-Z (рис. 5). В целом он ориентирован в направлении основной оси молекулы, но несколько в сторону мотива RTC и в то же время направлен вниз молекулы от более гидрофобного фрагмента с S-S-группами.

Можно полагать, что большая величина дипольного момента молекулы RTD-1, обуславливающая ее высокую полярность, существенно увеличивает интенсивность диполь-дипольного взаимодействия между молекулами RTD-1, увеличивает их сродство друг к другу и позволяет формирование комплексов этих молекул (рис. 6).

Учитывая ориентацию вектора дипольного момента, можно предположить формирование блоков от центра тяжести частично отрицательных заряженных фрагментов молекулы к частично положительным (по типу лесенки): каждая следующая молекула примыкает к частично отрицательно заряженному фрагменту предыдущей молекулы своим противоположным, т.е. положительно заряженным фрагментом (рис. 7).

Молекулы RTD-1 либо их блоки могут электростатически взаимодействовать с заряженными гидрофильными структурами клеточных стенок бактерий, а гидрофобные области молекул RTD-1 — с гидрофобными областями бактериальной стенки. Из квантово-химических расчетов следует, что высокоосновная амидиновая группировка аргининовых остатков а в молекуле RTD-1 протонируется в нейтральной среде с делокализацией заряда, что формирует положительно заряженные области — и в отдельных молекулах, и в молекулярных блоках.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ θ -ДЕФЕНЗИНОВ С ОБОЛОЧКАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Мембраны бактерий заряжены отрицательно из-за наличия в их составе анионных липидов — фосфатидилглицеролов (phosphatidylglycerols) и кардиолипина (cardiolipin) [9]. Молекулы θ -дефензина в соответствии с направленностью вектора дипольного момента распознают отрицательно

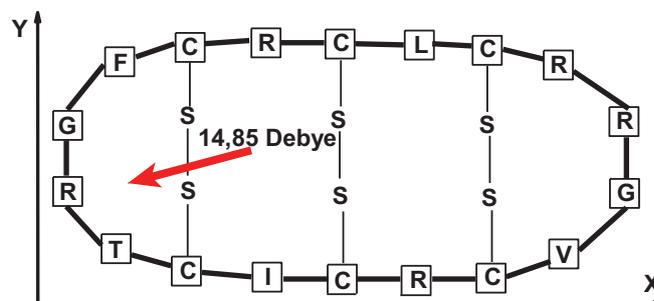


Рис. 4. Приблизительная ориентация дипольного момента в проекции молекулы RTD-1 на плоскость X-Y (схематическое изображение в трехмерной системе координат)

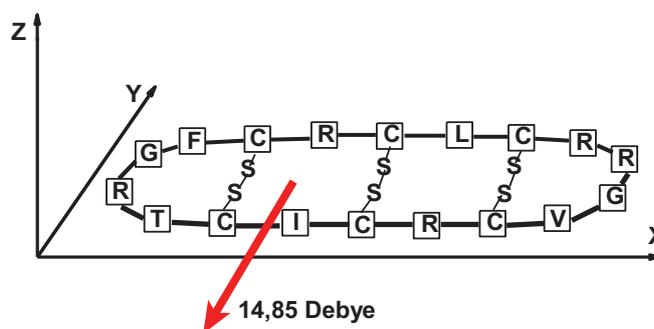


Рис. 5. Приблизительная ориентация дипольного момента в проекции молекулы RTD-1 на плоскость X-Z (схематическое изображение в трехмерной системе координат)

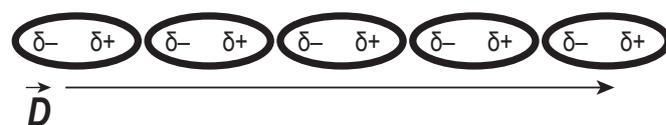


Рис. 6. Схема блоков молекул RTD-1 (по типу цепи) на основе межмолекулярного диполь-дипольного взаимодействия и направление вектора \vec{D} дипольного момента

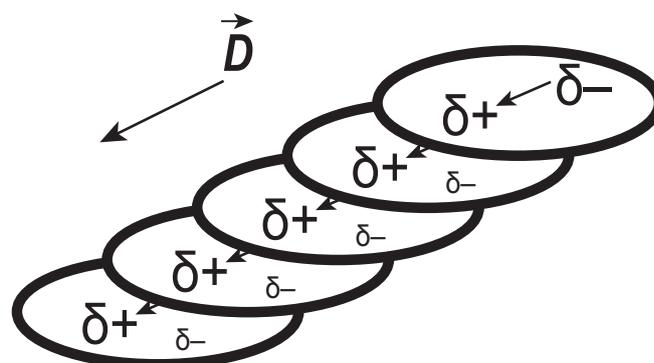


Рис. 7. Схема формирования «лесенки» из молекул-диполей RTD-1

заряженные поверхности микроорганизмов по механизму электростатического или «диполь-дипольного» взаимодействия [7, 9].

У грамположительных бактерий над фосфолипидным бислоем мембраны имеется оболочка, содержащая до 40 молекулярных слоев пептидогликана [8] — гидрофильного

соединения и мишени для многих антибиотиков. Нельзя исключить возможность проникновения θ -дефензинов вглубь мембраны до пептидогликана, а он способен пропускать сквозь себя молекулы массой до 50–60 кДа, то есть значительно более крупные, чем молекулы θ -дефензинов, масса которых составляет примерно 2 кДа.

С пептидогликанами в клеточной стенке грамположительных бактерий прочно связаны тейхоевые и липотейхоевые кислоты, которые представляют собой полианионную структуру с 40–45 отрицательно заряженными фосфатными группами в молекуле, ориентированными наружу. Естественно предположить возможность взаимодействия этих структур с дипольными структурами θ -дефензинов, в том числе и с их блоками. Электростатическое взаимодействие молекул-диполей RTD-1 с заряженными полианионными структурами липотейхоевых кислот термодинамически выгодно. Положительно заряженные фрагменты молекул RTD-1 могут многоцентрово взаимодействовать с отрицательно заряженными, ориентированными наружу «антеннами» на поверхности клеточных стенок грамположительных бактерий, тем самым блокировать их и приводить бактерии к гибели.

Стенка грамотрицательных бактерий состоит из двух мембран — клеточной (внутренней) и наружной. Между ними расположен слой пептидогликана, однако он значительно (почти в 40 раз) более тонкий, чем у грамположительных бактерий. Наружная мембрана связана со слоем пептидогликана при помощи липопротеинов, N-концы которых связаны с жирными кислотами, а C-концы — с пептидогликаном. Во внешней мембране имеются белки-порины [8].

Можно предположить взаимодействие RTD-1 с внутренней отрицательно заряженной частью коровых полисахаридов и полярных головок фосфолипидов на внешней стороне наружной мембраны. Гидрофильные липополисахариды внешней части наружной мембраны не представляют препятствий для проникновения молекул RTD-1 вплоть до заряженного слоя коровых полисахаридов и полярных головок фосфолипидов. Этот слой может быть атакован молекулами-диполями θ -дефензинов, что приведет к блокированию антигенов-липополисахаридов.

Белки-порины образуют в стенке бактерий заполненные водой поры [2, 5, 10], диаметр которых в большинстве случаев составляет 15 Å [6]. Размеры молекулы RTD-1 таковы (рис. 3), что проникновение внутрь бактериальной клетки сквозь поры мембраны более вероятно в том случае, если молекулы RTD-1 объединятся по типу цепи, а не лесенки.

Пассивная диффузия антибиотика в пору может заблокировать прохождение по ней ионных токов и тем самым нарушить жизнедеятельность бактерии [10]. Уместно предположить, что молекула θ -дефензина, имеющая в поперечнике менее 10 Å, способна проникать сквозь такие поры внутрь клетки и там осуществлять свое разрушающее действие. Вариантом является ситуация, когда блоки молекул θ -дефензина, проникая в пору, закупоривают ее и нарушают

естественные функции микроорганизма, например, инфлюкс питательных веществ и/или эффлюкс метаболитов.

Некоторые микроорганизмы, такие как *Listeria monocytogenes* — факультативный патоген, проникают внутрь клеток макроорганизма, затем перфорируют их мембраны и выходят в межклеточное пространство. Дефензины блокируют этот процесс [1].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Геометрию молекулы θ -дефензина можно аппроксимировать как эллипсоид вращения, из полюсов которого выступают положительно заряженные амидиновые группы аргинина, что способствует электростатическому связыванию молекулы с анионной поверхностью оболочки бактерии.

Площадь гидрофильных частей молекулы θ -дефензина лишь немногим превышает площадь гидрофобных частей. Гидрофобные части поверхности молекулы θ -дефензина позволяют ей взаимодействовать с более глубокими (гидрофобными) слоями стенки бактерии.

Поперечный диаметр молекулы θ -дефензина позволяет ей проникать в поры, образуемые белками-порины в мембране бактерий. Три дисульфидных мостика придают молекуле θ -дефензина жесткость. Расстояния между этими мостиками таковы, что позволяют проникать сквозь формируемые ими пустоты (а, возможно, и сквозь стенку бактерии, в которую внедрилась молекула θ -дефензина) биогенным ионам как в свободном, так и в гидратированном состоянии, что должно привести к разрушению бактерии.

Молекула θ -дефензина обладает очень высоким дипольным моментом. Это увеличивает интенсивность диполь-дипольного взаимодействия между молекулами θ -дефензина, повышает их сродство друг к другу и может приводить к образованию комплексов этих молекул — по типу цепи или, что менее вероятно, лесенки.

θ -Дефензины перспективны для изучения и применения в качестве лечебных антимикробных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnett E., Lehrer R.I., Pratikhya P. et al. Defensins Enable Macrophages to Inhibit the Intracellular Proliferation of *Listeria Monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 2011; 13(4): 635–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01563.x.
2. Ceccarelli M., Ruggerone P. Physical Insights into Permeation of and Resistance to Antibiotics in Bacteria. *Curr Drug Targets.* 2008; 9: 779–88. DOI: 10.2174/138945008785747770.
3. Conibear A.C., Chaousis S., Durek T. et al. Approaches to the Stabilization of Bioactive Epitopes by Grafting and Peptide Cyclization. *Biopolymers.* 2016; 106(1): 89–100. DOI: 10.1002/bip.22767.
4. Connolly M.Y. How Medicinal Chemists Learned About Log P. *J Comput Aided Mol Des.* 2018; 32(8): 809–19. DOI: 10.1007/s10822-018-0127-9.



5. Delcour A.H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1794: 808–16. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
6. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M. et al. Microbe-host Interactions: Structure and Role of Gram-negative Bacterial Porins. *Curr Protein Pept Sci*. 2012; 13(8): 843–54. DOI: 10.2174/138920312804871120.
7. Kormilets D.Y., Polyakovskiy A.D., Dadali V.A., Maryanovich A.T. Antibiotic Peptides. *J Evol Biochem Physiol*. 2019; 55(4): 269–76. DOI: 10.1134/S0022093019040021.
8. Madigan M.T., Martinko J.M. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall. 2006.
9. Wang G., Mishra B., Epan R.F., Epan R.M. High-Quality 3D Structures Shine Light on Antibacterial, Anti-Biofilm and Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 and its Fragments. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838: 2160–72. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.016.
10. Winterhalter M., Ceccarelli M. Physical Methods to Quantify Small Antibiotic Molecules Uptake into Gram-Negative Bacteria. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 95(Pt A): 63–7. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.006.
11. Xu D., Lu W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol*. 2020; 11: 764. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00764.
2. Ceccarelli M., Ruggerone P. Physical Insights into Permeation of and Resistance to Antibiotics in Bacteria. *Curr Drug Targets*. 2008; 9: 779–88. DOI: 10.2174/138945008785747770.
3. Conibear A.C., Chaousis S., Durek T. et al. Approaches to the Stabilization of Bioactive Epitopes by Grafting and Peptide Cyclization. *Biopolymers*. 2016; 106(1): 89–100. DOI: 10.1002/bip.22767.
4. Connolly M.Y. How Medicinal Chemists Learned About Log P. *J Comput Aided Mol Des*. 2018; 32(8): 809–19. DOI: 10.1007/s10822-018-0127-9.
5. Delcour A.H. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1794: 808–16. DOI: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
6. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M. et al. Microbe-host Interactions: Structure and Role of Gram-negative Bacterial Porins. *Curr Protein Pept Sci*. 2012; 13(8): 843–54. DOI: 10.2174/138920312804871120.
7. Kormilets D.Y., Polyakovskiy A.D., Dadali V.A., Maryanovich A.T. Antibiotic Peptides. *J Evol Biochem Physiol*. 2019; 55(4): 269–76. DOI: 10.1134/S0022093019040021.
8. Madigan M.T., Martinko J.M. *Brock Biology of Microorganisms* (11th ed.). Pearson Prentice Hall. 2006.
9. Wang G., Mishra B., Epan R.F., Epan R.M. High-Quality 3D Structures Shine Light on Antibacterial, Anti-Biofilm and Antiviral Activities of Human Cathelicidin LL-37 and its Fragments. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1838: 2160–72. DOI: 10.1016/j.bbamem.2014.01.016.
10. Winterhalter M., Ceccarelli M. Physical Methods to Quantify Small Antibiotic Molecules Uptake into Gram-Negative Bacteria. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 95(Pt A): 63–7. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.006.
11. Xu D., Lu W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol*. 2020; 11: 764. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00764.

REFERENCES

1. Arnett E., Lehrer R.I., Pratikha P. et al. Defensins Enable Macrophages to Inhibit the Intracellular Proliferation of *Listeria Monocytogenes*. *Cell Microbiol*. 2011; 13(4): 635–51. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2010.01563.x.
10. Winterhalter M., Ceccarelli M. Physical Methods to Quantify Small Antibiotic Molecules Uptake into Gram-Negative Bacteria. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015; 95(Pt A): 63–7. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.05.006.
11. Xu D., Lu W. Defensins: A Double-Edged Sword in Host Immunity. *Front Immunol*. 2020; 11: 764. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00764.