

Горуко И.В.¹, Григорьева Д.В.¹, Живолковская А.Д.¹, Реут В.Е.¹,
Соколов А.В.^{2,3}, Графская Е.Н.³, Панасенко О.М.³, Лазарев, В.Н.³

Влияние антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на клетки крови человека

¹Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

³ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Российская Федерация

Антимикробные пептиды (АМП), компоненты врожденного иммунитета всех живых организмов, являются перспективными лекарственными средствами нового поколения для борьбы с бактериальными инфекциями. Недавно на основе биоинформатического анализа генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* были идентифицированы и синтезированы катионные пептиды, обладающие антимикробным действием. Важно, чтобы АМП, оказываясь в организме человека, не только проявляли свою бактерицидную активность в отношении патогена, но и были минимально токсичны для эукариотических клеток, особенно клеток крови. Целью данной работы явился сравнительный анализ влияния четырех искусственно синтезированных АМП медицинской пиявки с различной аминокислотной последовательностью, обладающих выраженной антимикробной активностью, на свойства эукариотических клеток: гемолиз эритроцитов, жизнеспособность и морфологию нейтрофилов, а также их способность образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки (НВЛ).

В работе использовали следующие АМП: Phe-Arg-Ile-Met-Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys (3967_1), Lys-Phe-Lys-Lys-Val-Ile-Trp-Lys-Ser-Phe-Leu (12530), Arg-Trp-Arg-Leu-Val-Cys-Phe-Leu-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys-Val (536_1) и Arg-Pro-Ile-Leu-Ile-Arg-Val-Arg-Arg-Ile-Arg-Val-Ile (19347_2). Максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 %-ого ингибирования роста микроорганизмов (МИК_{max}) *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis*, для 536_1 составило 17 мкМ, для 12530 – 90 мкМ, для 3967_1 – 10 мкМ и для 19347_2 – 77 мкМ.

Гемолиз эритроцитов оценивали спектрофотометрически по выходу гемоглобина. Жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии по регистрации пропидиум йодид (PI)-положительных клеток. Образование НВЛ регистрировали в образцах изолированных нейтрофилов методом проточной цитометрии с применением непроницаемого для плазматической мембраны ДНК-

связывающего зонда SYTOX Green. Морфологию нейтрофилов оценивали методом сканирующей электронной микроскопии.

После 30-минутной инкубации клеток с синтезированными АМП медицинской пиявки в концентрациях, соответствующих МИК_{max} , количество PI-положительных нейтрофилов и гемолизированных эритроцитов увеличивалось (незначительно, но достоверно) только после инкубации клеток с АМП 536_1. Остальные АМП не влияли на жизнеспособность нейтрофилов и гемолиз эритроцитов. В качестве положительного контроля – соединения, обладающего цитолитическим действием по отношению к эукариотическим клеткам, использовали мелиттин – полипептид, выделенный из пчелиного яда. Как и ожидалось, мелиттин оказывал сильный цитотоксический эффект, лизируя более 60 % нейтрофилов и все эритроциты в концентрации 10 мкМ.

Для регистрации НВЛ нейтрофилы были проинкубированы с АМП в концентрациях, соответствующих МИК_{max} , в течение 30 мин при 37 °С, после чего образцы инкубировали с SYTOX Green (50 нМ) в течение 5 мин при комнатной температуре. Было установлено, что процент SYTOX Green-положительных событий увеличивался только после инкубирования нейтрофилов с АМП 536_1. Однако все АМП, кроме 3967_1, усиливали образование НВЛ, инициированное стандартным активатором нейтрофилов – 4-форбол-12-миристан-13-ацетатом. В присутствии АМП 536_1 и 12530 значительным образом изменялась морфология нейтрофилов, что выражалось в образовании выростов на поверхности клеток (псевдоподий).

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования синтезированных АМП медицинской пиявки для разработки на их основе противомикробных терапевтических средств.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов БРФФИ (Б20Р-215), РФФИ (20-515-00006) и МД-1901.2020.4.