

Григорьева Д.В.<sup>1</sup>, Горуко И.В.<sup>1</sup>, Графская Е.Н.<sup>2</sup>, Соколов А.В.<sup>2,3</sup>,  
Панасенко О.М.<sup>2</sup>, Лазарев В.Н.<sup>2</sup>

**Влияние антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на ферментативную активность миелопероксидазы**

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Российская Федерация

<sup>3</sup>ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В связи с быстрыми темпами роста устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам необходимо создание альтернативных терапевтических средств, резистентность к которым у микроорганизмов будет отсутствовать. В основе таких препаратов могут быть антимикробные пептиды (АМП), синтезируемые различными организмами. В организме человека основными клетками, обеспечивающими защиту от инфекционных агентов, являются нейтрофилы. Взаимодействие АМП с основными секреторными гранулярными бел-

ками нейтрофилов может приводить к изменению свойств как АМП, так и нейтрофильных белков. Целью данной работы явилось изучение влияния новых искусственно синтезированных АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на ферментативную активность главного бактерицидного белка нейтрофилов – миелопероксидазы (МПО).

В работе использовали четыре АМП, синтезированные на основе биоинформатического анализ генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*: 536\_1 (Arg-Trp-Arg-Leu-Val-Cys-Phe-Leu-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys-Val), 12530 (Lys-Phe-Lys-Lys-Val-Ile-Trp-Lys-Ser-Phe-Leu), 3967\_1 (Phe-Arg-Ile-Met-Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys) и 19347\_2 (Arg-Pro-Ile-Leu-Ile-Arg-Val-Arg-Arg-Ile-Arg-Val-Ile). 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. МПО выделяли из замороженных лейкоцитов здоровых доноров. Пероксидазную активность МПО ( $ПА_{MPO}$ , 0,5 нМ) оценивали спектрофотометрическим методом по скорости окисления ферментом *o*-дианизидина (*o*-DA, 380 мкМ) после добавления  $H_2O_2$  (50 мкМ).

После предварительной инкубации МПО с АМП 536\_1  $ПА_{MPO}$  изменялась бифазным образом: увеличивалась (в ~1,2 раза) при использовании АМП 536\_1 в концентрациях 0,5-2,5 мкМ и значительно снижалась при концентрациях 20-40 мкМ (например, в присутствии АМП 536\_1 в концентрации, соответствующей  $МИК_{max}$ ,  $ПА_{MPO}$  уменьшалась в ~2 раза). В присутствии АМП 12530 в концентрациях, соответствующих  $МИК_{max}$  и выше,  $ПА_{MPO}$  увеличивалась в ~1,2-1,3 раза, в малых концентрациях (до 45 мкМ включительно) данный АМП не влиял на  $ПА_{MPO}$ . При изучении  $ПА_{MPO}$  в суспензии, содержащей АМП 3967\_1, была замечена тенденция к увеличению каталитической активности фермента, однако она не была статистически достоверной. АМП 19347\_2 в концентрации, соответствующей  $МИК_{max}$  и выше, концентрационно-зависимым образом ингибировал  $ПА_{MPO}$ .

Нами также было изучено, как изменяются эффекты АМП после их модификации хлорноватистой кислотой (НОСl), генерируемой МПО. Так, после модификации 5-кратным мольным избытком НОСl способность АМП 536\_1 модулировать ферментативную активность МПО снижалась (в малых концентрациях модифицированный АМП 536\_1 терял способность усиливать  $ПА_{MPO}$ , а в больших концентрациях его ингибирующее действие уменьшалось в ~2 раза). В присутствии АМП 12530, модифицированного 10-кратным мольным избытком НОСl,

ПА<sub>МПО</sub> увеличивалась значительно (в ~1,4-1,6 раза), чем в присутствии нативного АМП 12530. В присутствии же 0,5-5 мкМ АМП 3967\_1, модифицированного 20-кратным мольным избытком НОС1, ПА<sub>МПО</sub> увеличивалась на 30-40 %. После обработки АМП 19347\_2 20-кратным мольным избытком НОС1 его способность ингибировать ферментативную активность МПО снижалась в ~2 раза.

Из полученных данных можно заключить, что АМП 536\_1 в малых концентрациях (0,5-2,5 мкМ) и АМП 12530 в концентрациях, сопоставимых с МИК<sub>max</sub> (45-200 мкМ), могут проявлять синергический эффект с МПО, усиливая продукцию бактерицидных высокорезакционных соединений. АМП 19347\_2 и АМП 536\_1 в концентрациях, соответствующих МИК<sub>max</sub> и выше, ингибируют ферментативную активность МПО. После модификации НОС1 способность АМП регулировать активность МПО изменяется. Полученные данные необходимо учитывать при разработке на основе АМП противоинфекционных терапевтических средств.

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