

**ВЛИЯНИЕ АНТИМИКРОБНЫХ ПЕПТИДОВ МЕДИЦИНСКОЙ  
ПИЯВКИ *HIRUDO MEDICINALIS* НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ  
АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ**

**Горудко И.В.**

*к. б. н., доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
irinagorudko@gmail.com;*

**Григорьева Д.В.**

*к. б. н., доцент кафедры биофизики физического факультета  
Белорусского государственного университета, г. Минск, Беларусь  
dargr@tut.by;*

**Живолковская А.Д.**

*студент кафедры биофизики физического факультета Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Беларусь  
anzh2204@gmail.com;*

**Реут В.Е.**

*аспирант кафедры биофизики физического факультета Белорусского  
государственного университета, г. Минск, Беларусь  
nika.lutsenko@tut.by;*

**Графская Е.Н.**

*лаборант лаборатории генной инженерии ФГБУ ФНКЦ физико-  
химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия  
grafskayacath@gmail.com*

**Лацис И.А.**

*младший научный сотрудник лаборатории генной инженерии ФГБУ  
ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия  
lacis.ivan@gmail.com;*

**Горбунов Н.П.**

*научный сотрудник отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт  
экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия  
niko\_laygo@mail.ru;*

**Костевич В.А.**

*к. б. н., старший научный сотрудник отдела молекулярной генетики  
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург,  
Россия*

*hfa-2005@yandex.ru;*

**Соколов А.В.**

*д.б.н.,  
заведующий лабораторией  
биохимической генетики отдела молекулярной генетики ФГБНУ  
«Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург, Россия*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*biochemsokolov@gmail.com;*

**Панасенко О.М.**

*д.б.н.,*

*профессор, заведующий отделом биофизики ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия*

*o-panas@mail.ru;*

**Лазарев В.Н.**

*д.б.н., доцент, заведующий отделом клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, г. Москва, Россия*

*lazar0@mail.ru*

*Рассмотрены особенности действия новых антимикробных пептидов (АМП) медицинской пиявки на основные функциональные ответы нейтрофилов. Среди исследуемых АМП RWRVCFLCRRKKV (536\_1) и FRIMRILRVLK (3967\_1) обладали наибольшей способностью активировать респираторный взрыв нейтрофилов и усиливать дегрануляцию нейтрофилов, регистрируемую по экзоцитозу миелопероксидазы и лактоферрина.*

**Ключевые слова:** *антимикробные пептиды; нейтрофилы; респираторный взрыв; дегрануляция*

**INFLUENCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE MEDICINAL  
LEECH *HIRUDO MEDICINALIS* ON NEUTROPHIL FUNCTIONAL  
ACTIVITY**

**Gorudko I.V.**

*PhD in Biology, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*irinagorudko@gmail.com;*

**Grigorieva D.V.**

*PhD in Biology, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*dargr@tut.by;*

**Zhivolkovskaya A.D.**

*Student of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*anzh2204@gmail.com;*

**Reut V.E.**

*Post-graduate student of the Department of Biophysics, Physics Faculty, Belarusian State University, Minsk, Belarus,*

*nika.lutsenko@tut.by;*

**Grafskaia E.N.**

*Laboratory Assistant of the Genetic Engineering Laboratory, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

*grafskayacath@gmail.com;*

**Latsis I.A.**

*Junior Researcher Fellow of the Laboratory of Genetic Engineering, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*latis.ivan@gmail.com*

**Gorbunov N.P.**

*Junior Researcher Fellow of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*niko\_laygo@mail.ru;*

**Kostevich V.A.**

*PhD in Biology, Senior Researcher of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*hfa-2005@yandex.ru;*

**Sokolov A.V.**

*Doctor of Science in Biology, Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia,*  
*biochemsokolov@gmail.com;*

**Panasenko O.M.**

*Doctor of Science in Biology, Professor, Head of the Department of Biophysics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*o-panas@mail.ru;*

**Lazarev V.N.**

*Doctor of Science in Biology, Associate Professor, Head of the Department of Cell Biology, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia,*  
*lazar0@mail.ru*

*The features of the action of new antimicrobial peptides (AMPs) of the medicinal leech on the main functional responses of neutrophils are considered. Among the studied AMPs RWRVCFLCRRKKV (536\_1) and FRIMRILRVLK (3967\_1) had the greatest ability to activate the respiratory burst of neutrophils and enhance neutrophil degranulation, recorded by exocytosis of myeloperoxidase and lactoferrin.*

**Key words:** *antimicrobial peptides; neutrophils; respiratory burst; degranulation*

В последние годы актуальной задачей является синтез пептидов, которые обладают не только антимикробным эффектом, но также способных оказывать иммуномодулирующее действие на клетки крови. Ранее на основе биоинформатического анализа генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* были идентифицированы и синтезированы катионные антимикробные пептиды

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ, Минск, 25 января 2022 г.

(АМП), обладающие антимикробной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, низкой гемолитической активностью и не проявляющие цитотоксического эффекта по отношению к клеткам млекопитающих [1]. Кроме того, ранее нами было показано, что данные АМП способны избирательно модулировать (усиливать или ингибировать) биологическую активность собственных эндогенных антимикробных белков и пептидов (миелопероксидазы, эластазы, лизоцима) [2].

Целью настоящей работы явилось исследование эффектов новых синтезированных АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, которые являются важнейшими эффекторными клетками системы врожденного иммунитета [3] и обеспечивают первичную линию защиты организма от инфекционных агентов.

В работе использовали следующие АМП: FRIMRILRVLK (3967\_1), KFKKVIWKSFL (12530), RWRVCFLCRRKKV (536\_1) и RPIRVRRIRVI (19347\_2). Максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 %-ого ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* (МИК<sub>max</sub>), составило 17 мкМ для 536\_1, 90 мкМ для 12530, 10 мкМ для 3967\_1 и 77 мкМ для 19347\_2.

Жизнеспособность нейтрофилов оценивали методом проточной цитометрии по регистрации пропидиум йодид (PI)-положительных клеток. Изменение мембранного потенциала нейтрофилов регистрировали флуоресцентным методом с применением diO-C3-(5). Респираторный взрыв нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом с применением различных хемосенсоров. Для сравнения результатов, полученных при использовании традиционных хемосенсоров (Амплекс Ред, дигидроэтидин и диацетат 2,7-дихлородигидрофлуоресцеин), также применили предложенные нами новые зонды типа «turn-on»: галлоцианин (GC) [4] и целестиновый синий В(СВ) [5], которые реагируют соответственно с супероксидным анион-радикалом и хлорноватистой кислотой (НОСl) с образованием флуоресцирующих продуктов с максимумом возбуждения/регистрации флуоресценции при 360/490 нм для GC и при 490/580 нм для СВ.

Было установлено, что после инкубации нейтрофилов с исследуемыми АМП медицинской пиявки в концентрациях, соответствующих МИК<sub>max</sub>, количество PI-положительных нейтрофилов практически не изменялось. Внесение в суспензию нейтрофилов синтезированных АМП сопровождалось быстрой гиперполяризацией клеток (в течение 3 мин), сопоставимой с действием валиномицина (калиевый ионофор), что указывает на связывание АМП с плазматической мембраной клеток.

АМП 536\_1 и 3967\_1 дозо-зависимым образом стимулировали респираторный взрыв нейтрофилов. Продукция активных форм кислорода (АФК) при активации клеток АМП ингибировалась в присутствии DPI – ингибитора сборки НАДФН-оксидазы; в среде без кальция; а также в

присутствии генистеина – ингибитора тирозинкиназ. Вышеупомянутые АМП также усиливали агонист-индуцированную дегрануляцию азурофильных и специфических гранул, регистрируемую по секреции во внеклеточную среду миелопероксидазы и лактофerrина соответственно. АМП 12530 и 19347\_2 проявляли менее выраженную способность активировать респираторный взрыв нейтрофилов, однако усиливали агонист-индуцированную продукцию АФК клетками. АМП 536\_1 увеличивал долю жизнеспособных нейтрофилов, в том числе после стимуляции апоптоза фактором некроза опухоли-альфа. Ни один из исследуемых АМП не влиял на секрецию нейтрофилами интерлейкина-8, в том числе после стимуляции клеток фторболовым эфиром.

На основании полученных данных можно заключить, что новые синтетические АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* способны взаимодействовать с мембраной нейтрофилов и активировать респираторный взрыв клеток, что представляется перспективным для разработки на их основе новых лекарственных средств с бифункциональными свойствами.

Работа поддержана грантами БРФФИ (Б20Р-215), РФФИ (20-515-00006) и МД-1901.2020.4.

### Список литературы

1. Grafiskaia, E. N. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens / E. N. Grafiskaia, K. D. Nadezhdin, I. A. Talyzina, N. F. Polina, O. V. Podgorny, E. R. Pavlova, P. V. Bashkirov, D. D. Kharlampieva, P. A. Bobrovsky, I. A. Latsis, V. A. Manuvera, V. V. Babenko, V. M. Trukhan, A. S. Arseniev, D. V. Klinov, V. N. Lazarev // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – Vol. 180. – P. 143–153.
2. Григорьева, Д. В. Влияние новых антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность белков гранул нейтрофилов / Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, Е. Н. Графская, И. А. Лацис, А. В. Соколов, О. М. Панасенко, В. Н. Лазарев // Медицинский академический журнал. – 2021. – Т. 21, № 3. – С. 49–62.
3. Selders, G. S. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration / G. S. Selders, A. E. Fetz, M. Z. Radic, G. L. Bowlin // Regen. Biomater. – 2017. – Vol. 4, № 1. – P. 55–68.
4. Панасенко, О. М. Галлоцианин как флуороген для выявления НАДФН-зависимой продукции супероксидного анион-радикала клетками крови / О. М. Панасенко, В. Е. Реут, И. В. Бородина, Д. С. Матюшкина, В. А. Иванов, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, А. В. Соколов, С. Н. Черенкевич // Биоорганическая химия. – 2021. – Т. 47, № 1. – С. 153–161.
5. Луценко, В. Е. Целестиновый синий В – зонд для регистрации продукции хлорноватистой кислоты и НОС1-модифицированных белков /

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ БИОХИМИИ,  
Минск, 25 января 2022 г.

В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, С. Н. Черенкевич,  
Н. П. Горбунов, В. А. Костевич, О. М. Панасенко, А. В. Соколов // Медицинский  
академический журнал. – 2019. – Т. 19, вып. 2. – С. 63–72.