

УДК 577.112.6; 616.155.34

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ77649>

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

Д.В. Григорьева¹, И.В. Горудко¹, Е.Н. Графская², И.А. Лацис², А.В. Соколов^{2, 3, 4},
О.М. Панасенко^{2, 5}, В.Н. Лазарев²

¹ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь;

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия;

³ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
Москва, Россия

Как цитировать: Григорьева Д.В., Горудко И.В., Графская Е.Н., Лацис И.А., Соколов А.В., Панасенко О.М., Лазарев В.Н. Влияние новых антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность белков гранул нейтрофилов // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21. № 3. С. 49–62. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ77649>

Поступила: 09.08.2021

Одобрена: 16.08.2021

Принята: 06.09.2021

Обоснование. Серьезной проблемой здравоохранения является резистентность к традиционным антибиотикам микроорганизмов, вызывающих опасные для здоровья человека инфекции. В связи с этим разработка новых эффективных антимикробных препаратов и терапевтических подходов представляется актуальной задачей. Антимикробные пептиды считают перспективной альтернативой традиционным антибиотикам в борьбе с резистентными микроорганизмами.

Цель — изучение влияния новых синтетических антимикробных пептидов медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* на функциональную активность гранулярных белков нейтрофилов — основных эффекторных клеток иммунитета, в том числе в условиях развития окислительного/галогенирующего стресса.

Материалы и методы. Пероксидазную активность миелопероксидазы оценивали по скорости окисления *o*-дианизидина. Амидолитическую активность нейтрофильной эластазы определяли флуоресцентным методом с использованием специфического субстрата MeOSuc-AAPV-AMC. Железосвязывающую активность лактоферрина оценивали спектрофотометрическим методом по изменению поглощения раствора при добавлении соли Fe³⁺. Активность лизоцима определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *M. lysodeikticus*.

Результаты. Нативные антимикробные пептиды 536_1 и 19347_2 ингибировали, а антимикробный пептид 12530 — усиливал пероксидазную активность миелопероксидазы, данная тенденция сохранялась и после модификации указанных пептидов хлорноватистой кислотой (HOCl). В отличие от нативного галогенированный антимикробный пептид 3967_1 усиливал ферментативную активность миелопероксидазы. В присутствии антимикробного пептида 3967_1 амидолитическая активность нейтрофильной эластазы незначительно увеличивалась, в то время как антимикробный пептид 19347_2 ингибировал активность фермента. После модификации HOCl данные соединения сохраняли свою способность регулировать активность нейтрофильной эластазы. Синергетические эффекты (~20 %) против грамположительных бактерий *M. lysodeikticus* выявлены для комбинации лизоцима с антимикробными пептидами 12530 и 3967_1. Ингибирование антимикробной активности лизоцима наблюдалось в присутствии антимикробных пептидов 19347_2 и 536_1, но выраженность данного эффекта снижалась после их модификации под действием HOCl. После модификации HOCl антимикробный пептид 3967_1 усиливал, в то время как 12530, наоборот, приобретал способность ингибировать муколитическую активность лизоцима.

Заключение. Использование препаратов на основе исследуемых антимикробных пептидов медицинской пиявки будет оказывать благоприятное влияние на борьбу организма с возбудителями инфекций не только за счет антимикробного действия самих антимикробных пептидов, но и за счет модуляции данными соединениями биологической активности собственных эндогенных антимикробных белков и пептидов: усиления — в случае необходимости элиминации патогена и ингибирования — для защиты от повреждения собственных тканей организма.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; медицинская пиявка; миелопероксидаза; лизоцим; эластаза; лактоферрин; нейтрофилы; хлорноватистая кислота; галогенирующий стресс.

Список сокращений

АМП — антимикробные пептиды; ЛФ — лактоферрин; МПО — миелопероксидазы; НЭ — нейтрофильная эластаза; ПАМПО — пероксидазная активность миелопероксидазы; HOCl — хлорноватистая кислота.

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

Daria V. Grigorieva¹, Irina V. Gorudko¹, Ekaterina N. Grafskaya², Ivan A. Latsis², Alexey V. Sokolov^{2, 3, 4}, Oleg M. Panasenko^{2, 5}, Vasily N. Lazarev²

¹ Belarusian State University, Minsk, Belarus;

² Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia;

³ Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia;

⁵ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

To cite this article: Grigorieva DV, Gorudko IV, Grafskaya EN, Latsis IA, Sokolov AV, Panasenko OM, Lazarev VN. Influence of new antimicrobial peptides of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* on the functional activity of neutrophil granule proteins. *Medical Academic Journal*. 2021;21(3):49–62. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ77649>

Received: 09.08.2021

Revised: 16.08.2021

Accepted: 06.09.2021

BACKGROUND: Resistance of microorganisms caused dangerous to human health infections to traditional antibiotics is a serious problem for healthcare. In this regard, the development of new effective antimicrobial drugs and therapeutic approaches is an urgent task. Antimicrobial peptides (AMPs) are considered a promising alternative to traditional antibiotic in the fight against resistant microorganisms.

AIM: The aim of this work is to study the effect of new synthesized AMPs of the medicinal leech *Hirudo medicinalis* (including under conditions of development of oxidative/halogenative stress) on the functional activity of neutrophils granular proteins — the main effector cells of the immune system.

MATERIALS AND METHODS: Myeloperoxidase peroxidase activity was assessed by the rate of *o*-dianisidine oxidation. Neutrophil elastase activity was determined by the fluorescence method using a specific substrate MeOSuc-AAPV-AMC. Lactoferrin iron-binding activity was assessed spectrophotometrically by the change in absorption of protein solution after addition of Fe³⁺ salt. Lysozyme activity was determined by the rate of *M. lysodeikticus* bacterial cells lysis.

RESULTS: Native AMPs 536_1 and 19347_2 inhibited and 12530 increased myeloperoxidase peroxidase activity, this tendency persisted after these AMPs modification by hypochlorous acid (HOCl). In contrast to the native AMP halogenated AMP 3967_1 acquired the ability to enhance myeloperoxidase enzymatic activity. In the presence of AMP 3967_1 neutrophil elastase amidolytic activity increased insignificantly, while AMP 19347_2 inhibited neutrophil elastase activity. After HOCl modification these AMPs retained their ability to regulate neutrophil elastase activity. Synergistic effects (~20%) against gram-positive bacteria *M. lysodeikticus* were revealed for combination of lysozyme with AMPs 12530 and 3967_1. Inhibition lysozyme antimicrobial activity was observed in the presence of AMPs 19347_2 and 536_1, however the severity of this effect decreased after AMPs modification by HOCl. After HOCl modification AMP 3967_1 increased, while AMP 12530 on the contrary acquired the ability to inhibit lysozyme mucolytic activity.

CONCLUSIONS: The use of drugs based on studied AMPs of medicinal leech will have a beneficial effect on the body's fight against infectious agents due to the antimicrobial action of AMPs themselves. But in addition studied AMPs are capable to modulate the biological activity of own endogenous antimicrobial proteins and peptides: to enhance it, if it is necessary to eliminate pathogen and to inhibit — if it necessary to protect against damage to the body's own tissues.

Keywords: antimicrobial peptides; medicinal leech; myeloperoxidase; lysozyme; elastase; lactoferrin; neutrophils; hypochlorous acid; halogenative stress.

Обоснование

Антибиотикорезистентность — это серьезная проблема здравоохранения ввиду повышения глобальной доступности антибактериальных препаратов, ненадлежащего их назначения, нарушения дозировок и продолжительности курса при их приеме, а также использования таких препаратов в животноводстве. В связи с этим во всем мире проводятся широкомасштабные исследования по разработке новых нетрадиционных противоинфекционных методов лечения. Антимикробные пептиды (АМП) быстро привлекли внимание исследователей как перспективные кандидаты для создания на их основе препаратов, лишенных ряда недостатков

традиционных антибиотиков [1]. АМП представляют многочисленную и разнообразную группу коротких (от 10 до 50 аминокислотных остатков), амфипатических и, как правило, положительно заряженных молекул, которые продуцируются многими тканями и типами клеток у различных видов беспозвоночных, растений и животных.

Механизмы действия АМП разнообразны: они нарушают целостность плазматической мембраны, ингибируют синтез компонентов клеточной стенки, модифицируют цитоплазматическую мембрану, ингибируя формирование септума/перегородки, запускают процессы автолизиса, связываются с ДНК и подавляют процессы репликации, транскрипции и транс-

ляции, ингибируют активность ряда ферментов, а также проявляют микробицидный эффект за счет регуляции врожденного и приобретенного иммунитета [2]. Благодаря такому широкому спектру биологических активностей АМП представляются перспективными соединениями для разработки на их основе новых антибактериальных, противогрибковых, противовирусных и противораковых терапевтических средств [3, 4].

АМП могут быть получены из микроорганизмов, растений и животных. Такие АМП с низкой вероятностью могут вызывать побочные эффекты, в связи с чем природные АМП используют в качестве основы для создания новых синтетических АМП с различного рода модификациями, нацеленными на улучшение их антимикробной активности, стабильности и эффективности, уменьшение токсичности по отношению к собственным клеткам макроорганизма, а также повышение их устойчивости к пищеварительным ферментам [1, 5].

Секрет слюнных желез медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* является гуморальным агентом гирудотерапии — широко применяемого метода лечения многих заболеваний путем приставления пиявок. Гирудотерапия оказывает многофакторное действие, среди которого особо необходимо выделить антимикробные и иммуностимулирующие эффекты, обусловленные в том числе антимикробными белками и пептидами [6, 7]. Ранее биоинформатический анализ генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* позволил нам идентифицировать и синтезировать катионные пептиды, обладающие антимикробными свойствами: Phe-Arg-Ile-Met-Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys (АМП 3967_1), Lys-Phe-Lys-Lys-Val-Ile-Trp-Lys-Ser-Phe-Leu (АМП 12530), Arg-Trp-Arg-Leu-Val-Cys-Phe-Leu-Cys-Arg-Arg-Lys-Lys-Val (АМП 536_1) и Arg-Pro-Ile-Leu-Ile-Arg-Val-Arg-Arg-Ile-Arg-Val-Ile (АМП 19347_2) [8]. Однако необходимо учитывать, что в случае использования АМП в качестве антибактериальных терапевтических средств в очагах инфекции данные соединения неизбежно будут контактировать с нейтрофилами — клетками, в первую очередь мигрирующими из кровяного русла к месту локализации патогена. Нейтрофильные гранулоциты служат важнейшими эффекторными клетками системы врожденного иммунитета и обеспечивают первичную линию защиты организма от инфекционных агентов [9]. Нейтрофильные гранулоциты обладают мощными кислородозависимыми и кислородонезависимыми механизмами, обеспечивающими выполнение микробицидной, цитотоксической и цитолитической функций, инициируя

развитие базисной воспалительной реакции. Цитолитический и цитотоксический потенциал нейтрофилов сконцентрирован в гранулярном аппарате и секреторных везикулах [10, 11]. Необходимо отметить, что секреция содержимого гранул происходит не только во время фагоцитоза в местах воспаления. В плазме крови в норме всегда присутствуют гранулярные белки и пептиды, количество которых может меняться как при физиологических состояниях, так и при некоторых заболеваниях.

При взаимодействии АМП и гранулярных белков нейтрофилов биологические функции данных соединений могут изменяться. Например, в работе [12] было показано, что при связывании собственных АМП нейтрофилов дефенсинов с белками из семейства ингибиторов сериновых протеаз (серпинов) снижается ингибирующее действие последних в отношении протеаз, а также блокируется антимикробная активность дефенсинов. В работе [13] были получены данные, свидетельствующие в пользу предположения о возможности связывания дефенсинов и некоторых других АМП с белками из семейства серпинов, не проявляющими антипротеазной активности [кортикостероид-связывающим глобулином (транскортином) и тироксин-связывающим глобулином] и не модулирующими биологическую активность транскортина. В связи с этим интерес вызывает изучение влияния новых синтезированных АМП медицинской пиявки на биологическую активность основных гранулярных белков нейтрофилов: миелопероксидазы (МПО), нейтрофильной эластазы (НЭ), лактоферрина (ЛФ) и лизоцима.

Необходимо также учитывать, что в очагах воспаления в результате функционирования фермента азурофильных гранул нейтрофилов МПО неизбежно будет нарабатываться хлорноватистая кислота (НОСl), с одной стороны, являющаяся основным антимикробным агентом нейтрофилов, с другой — сохраняющая способность повреждать собственные биологически важные молекулы, в результате чего их основные функции могут измениться. Так, ранее было показано, что модификация НЭ высокими концентрациями НОСl (когда молярное соотношение НОСl/фермент превышало 10–40 раз) приводила к инаktivации фермента [14]. Модифицированный НОСl лизоцим терял способность лизировать бактериальные клетки *Micrococcus lysodeikticus* [15]. Ранее нами было установлено, что после обработки НОСl в молекуле МПО происходит дегградация гема, что ведет к резкому падению каталитической активности фермента [16]. После модификации НОСl железосвязывающая активность

ЛФ снижается [17]. Изменится ли после модификации НОСІ способность исследуемых катионных АМП медицинской пиявки регулировать биологическую активность основных гранулярных белков нейтрофилов — неизвестно.

В связи с вышесказанным **цель** настоящей работы состояла в изучении способности нативных и модифицированных НОСІ новых искусственно синтезированных АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* модулировать биологическую активность основных гранулярных белков нейтрофилов — МПО, НЭ, ЛФ и лизоцима.

Материалы и методы

Реагенты

В работе использовали следующие реактивы: лизоцим, гипохлорит натрия (NaOCl), *M. lysodeikticus* и *o*-дианизидин (*o*-DA) фирмы Sigma-Aldrich (США); MeOSuc-AAPV-АМС фирмы Santa Crus Biotechnology (США); остальные реактивы — фирм «Реахим» (Россия) и «Белмедпрепараты» (Беларусь).

В работе также применяли МПО и НЭ, выделенные из замороженных лейкоцитов здоровых доноров с помощью аффинной хроматографии с использованием гепарин-сефарозы и апротинин-агарозы, гидрофобной хроматографии (фенил-сефароза) и гель-фильтрации (сефакрил S-200 HR), как это было описано ранее [18–20]. Соотношение величин поглощения препарата МПО на длине волны 430 и 280 нм (A_{430}/A_{280}) служило характеристикой чистоты и гомогенности выделенной МПО и обычно составляло не менее 0,85. Препарат НЭ был гомогенен по данным электрофореза и масс-спектрометрии, не содержал примесей катепсина G и протеиназы-3.

В данной работе также применяли рекомбинантный ЛФ человека, выделенный из молока трансгенных коз-продуцентов, выведенных в рамках научно-технической программы Союзного государства «Разработка технологий

и организация опытного производства высокоэффективных и биологически безопасных лекарственных средств нового поколения и пищевых продуктов на основе лактоферрина человека, получаемого из молока животных-продуцентов» («БелРосТрансген-2») [21]. В работе [22] было показано, что рекомбинантный ЛФ по физическим, биохимическим и биологическим характеристикам аналогичен природному ЛФ человека, выделенному из женского молока.

В работе использовали четыре АМП, синтезированных на основе биоинформатического анализа генома медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. Характеристики данных АМП (аминокислотная последовательность, молекулярная масса, заряд, МИК_{max} — максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 % ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* в стандартном тесте) приведены в таблице.

Модификация антимикробных пептидов НОСІ

Раствор NaOCl получали непосредственно перед экспериментом, разбавляя стоковый коммерческий раствор в фосфатно-солевом буфере (ФСБ: 137 мМ NaCl , 2,7 мМ KCl , 8,7 мМ Na_2HPO_4 , 1,5 мМ KH_2PO_4 , pH 7,4). В силу того что рК НОСІ составляет 7,5 и при физиологических значениях pH в исследуемой среде молекулярная форма кислоты (НОСІ) и ее анион (OCl^-) находятся примерно в равных количествах, под НОСІ подразумевается смесь $\text{НОСІ}/\text{OCl}^-$.

Поскольку в состав исследуемых АМП входит различное количество аминокислотных остатков, чувствительных к НОСІ (см. таблицу), для каждого АМП индивидуально подбирали такое молярное соотношение АМП к НОСІ, чтобы все молекулы НОСІ провзаимодействовали с АМП. Отсутствие непрореагировавшей НОСІ

Таблица / Table

Характеристики используемых в работе антимикробных пептидов
Characteristics of AMP used in the work

Код АМП	Аминокислотная последовательность АМП	Длина	Молекулярная масса, Да	Заряд	МИК_{max} , мкМ
3967_1	Phe-Arg-Ile- Met -Arg-Ile-Leu-Arg-Val-Leu-Lys	11	1444,89	+4	10
12530	Lys -Phe- Lys - Lys -Val-Ile- Trp - Lys -Ser-Phe-Leu	11	1423,81	+4	90
536_1	Arg- Trp -Arg-Leu-Val- Cys -Phe-Leu- Cys -Arg-Arg- Lys - Lys -Val	14	1863,36	+6	17
19347_2	Arg-Pro-Ile-Leu-Ile-Arg-Val-Arg-Arg-Ile-Arg-Val-Ile	13	1660,13	+5	77

Примечание. Полужирным отмечены наиболее чувствительные к действию НОСІ аминокислоты.

оценивали флуоресцентным методом с использованием скополетина, мгновенно окисляющегося в присутствии HOCl . Модификацию АМП проводили при комнатной температуре (23°C) в течение 1,5–2 ч при умеренном перемешивании — один раз в начале и один раз в конце модификации. Мольное соотношение АМП : HOCl для АМП 536_1 составило 1 : 20, 12530 — 1 : 10, 3967_1 — 1 : 10, 19347_2 — 1 : 1.

Амидолитическая активность нейтрофильной эластазы

Активность НЭ оценивали флуоресцентным методом с помощью специфического субстрата MeOSuc-AAPV-AMC [18]. НЭ (50 нМ) в ФСБ, содержащем 1 мМ CaCl_2 и 0,5 мМ MgCl_2 , инкубировали 3 мин при 37°C с различными концентрациями нативных или модифицированных под действием HOCl АМП, после чего добавляли 20 мкМ субстрата MeOSuc-AAPV-AMC и регистрировали кинетику гидролиза субстрата НЭ, сопровождающегося высвобождением флуорофора — аминотетилкумарина, по увеличению интенсивности флуоресценции на длине волны 460 нм (возбуждение — 380 нм). Для количественной характеристики показателя активности НЭ рассчитывали площадь под кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции на 10 мин после добавления НЭ, включающую как максимум величины интенсивности флуоресценции в результате образования флуоресцирующего реагента, так и скорость его образования.

Пероксидазная активность миелопероксидазы

Пероксидазную активность МПО ($\text{PA}_{\text{МПО}}$) оценивали по скорости окисления ферментом *o*-DA [23]. Препарат МПО (0,5 нМ), проинкубированный с различными концентрациями нативных или модифицированных под действием HOCl АМП в течение 5 мин при 23°C , вносили в 0,1 М Na -фосфатный буфер (рН 6,2), содержащий *o*-DA (380 мкМ), после чего к смеси добавляли H_2O_2 (50 мкМ) и регистрировали изменение оптической плотности раствора на длине волны 460 нм при 23°C . Для количественной оценки был вычислен тангенс начального угла наклона зарегистрированных кривых, который характеризовал скорость окисления *o*-DA в присутствии МПО.

Муколитическая активность лизоцима

Активность лизоцима определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *M. lysodeikticus* [24]. Лизоцим (50 мкг/мл) инкубировали с различными концентрациями нативных или

модифицированных под действием HOCl АМП в течение 5 мин при 23°C , добавляли к суспензии бактериальных клеток *M. lysodeikticus* в 0,1 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ буфере (рН 6,2) и при 37°C регистрировали изменение светопропускания полученной суспензии на длине волны 540 нм. Для количественной характеристики активности лизоцима рассчитывали величину изменения светопропускания образцом по сравнению с начальным уровнем светопропускания через 3 мин после добавления к бактериальным клеткам лизоцима.

Железосвязывающая активность лактоферрина

Способность 10 мг/мл препарата ЛФ связывать ионы железа в отсутствие и в присутствии нативных или модифицированных под действием HOCl АМП в различных концентрациях регистрировали спектрофотометрическим методом по изменению поглощения исследуемого раствора на длине волны 465 нм при последовательном добавлении соли Fe^{3+} [$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$] при 23°C и постоянном перемешивании [17]. Для ЛФ в насыщенной железом форме характерно появление дополнительного максимума (по сравнению с апоформой) в области 400–500 нм. Для количественной характеристики железосвязывающей активности ЛФ определяли площадь под кинетической кривой изменения оптической плотности раствора ЛФ после 20 последовательных добавок соли Fe^{3+} [$\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$].

Для реализации всех флуоресцентных методов был использован компьютеризированный спектрофлуориметр CM2203 (СОЛАР, Беларусь), спектрофотометрических методов — компьютеризированный спектрофотометр PB2201 (СОЛАР, Беларусь).

Статистический анализ данных

Статистический анализ результатов был выполнен с помощью пакета программ Origin 7.0. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Для анализа различий между средними значениями использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

МПО (донор: H_2O_2 оксидоредуктаза, К.Ф. 1.11.2.2) относится к семейству гемсодержащих пероксидаз млекопитающих. Основным субстратом МПО — H_2O_2 , продуцируемый *in vivo* при респираторном взрыве нейтрофилов. В присутствии H_2O_2 происходит превращение

МПО в высокореакционное соединение I, которое обладает двумя окислительными эквивалентами и осуществляет последовательное одноэлектронное окисление различных субстратов (нитрита, аскорбата, тирозина и др.) через образование соединения II с возвращением фермента в исходную форму и замыканием так называемого пероксидазного цикла. В отличие от большинства пероксидаз, соединение I МПО способно также осуществлять сразу двухэлектронное окисление галогенидов с образованием гипогалоидных кислот [25, 26].

На рис. 1 представлены результаты оценки пероксидазной активности МПО в присутствии нативных и модифицированных под действием НОСІ АМП медицинской пиявки *Hirudo medicinalis*. Видно, что наибольшее модулирующее действие оказывал АМП 536_1. Так, в присутствии АМП 536_1 PA_{MPO} изменялась бифазным образом: увеличивалась (в ~1,2 раза) в концентрационном диапазоне 0,5–2,5 мкМ и значительно снижалась при концентрациях 20–40 мкМ (например, в присутствии АМП 536_1 в концентрации, соответствующей MIK_{max} , PA_{MPO} уменьшалась в ~2 раза) (рис. 1, а). Менее выраженный ингибирующий эффект на PA_{MPO} оказывал АМП 19347_2: в концентрациях, соответствующих MIK_{max} и выше, данный АМП концентрационно-зависимым образом ингибировал PA_{MPO} (рис. 1, б). Исследование влияния АМП 536_1 и 19347_2 на кинетические параметры PA_{MPO} показали, что данные соединения являются неконкурентными ингибиторами МПО поскольку не влияли на константу Михаэлиса для H_2O_2 (данные не представлены). В присутствии АМП 12530 в концентрациях, соответствующих MIK_{max} и выше, PA_{MPO} увеличивалась в ~1,2–1,3 раза (рис. 1, в), что может быть связано со стабилизацией нативной структуры фермента. АМП 3967_1 во всем исследуемом диапазоне концентраций не влиял на PA_{MPO} (рис. 1, д).

После модификации НОСІ способность АМП 536_1 модулировать ферментативную активность МПО снижалась (в малых концентрациях модифицированный АМП 536_1 терял способность усиливать PA_{MPO} , а в больших концентрациях его ингибирующее действие уменьшалось в ~2 раза) (рис. 1, а). После обработки НОСІ АМП 19347_2 терял способность ингибировать ферментативную активность МПО также в ~2 раза (рис. 1, б). В присутствии АМП 12530, модифицированного НОСІ, PA_{MPO} увеличивалась сильнее (в ~1,4–1,6 раза), чем в присутствии нативного АМП (рис. 1, в). PA_{MPO} в присутствии модифицированного НОСІ АМП 3967_1 увеличивалась: наиболее

значительно (на ~30–40 %) в диапазоне малых (0,5–5 мкМ) концентраций АМП (рис. 1, д).

Из представленных данных можно сделать вывод, что АМП 536_1 и 19347_2 можно считать перспективными соединениями для синтеза на их основе более эффективных фармакологических ингибиторов МПО. Действительно, в ряде случаев для эффективного ингибирования активности МПО достаточно небольшой последовательности аминокислот, состоящей, например, из 10 аминокислотных остатков, как это было показано для фрагмента церулоплазмينا в работе [27]. АМП 12530 усиливает каталитическую активность МПО, тем самым увеличивая продукцию бактерицидных высокореакционных активных форм галогенов, уничтожающих патоген. После модификации НОСІ способность АМП регулировать ферментативную активность МПО изменяется. Полученные данные необходимо учитывать при разработке на основе АМП противомикробных терапевтических средств.

Затем нами было исследовано влияние АМП на еще один маркерный фермент азурофильных гранул нейтрофилов — НЭ. НЭ относится к группе сериновых протеаз, в активном центре которых содержится классическая консервативная триада из остатков Ser, His и Asp. Эти остатки образуют ансамбль, осуществляющий нуклеофильную атаку на пептидные связи белков, итогом которой является их гидролитическое расщепление. Протеазы данного класса обладают различной субстратной специфичностью. НЭ проявляет специфичность к пептидным связям, образованным Gly, Ala, Val, Leu, Ile, которые содержат гидрофобные радикалы [28]. Следует отметить, что при патологических процессах в зависимости от физико-химических факторов НЭ может выступать и как провоспалительный, и как противовоспалительный агент [29], поэтому поиск способов регуляции ее активности представляется актуальной задачей.

Поскольку исследуемые АМП могут модулировать активность МПО в концентрациях, сопоставимых с MIK_{max} , то для изучения влияния АМП на биологическую активность остальных гранулярных белков нейтрофилов данные соединения были использованы в концентрациях MIK_{max} и в 2 раза больших и в 2 раза меньших MIK_{max} . Как видно из данных, представленных на рис. 2, в присутствии АМП 3967_1 в исследованном диапазоне концентраций ферментативная активность НЭ увеличивалась примерно на 30 % (рис. 2, а и в). АМП 536_1 и 12530 в используемых концентрациях не оказывали достоверного влияния на ферментативную активность НЭ (см. рис. 2, в).

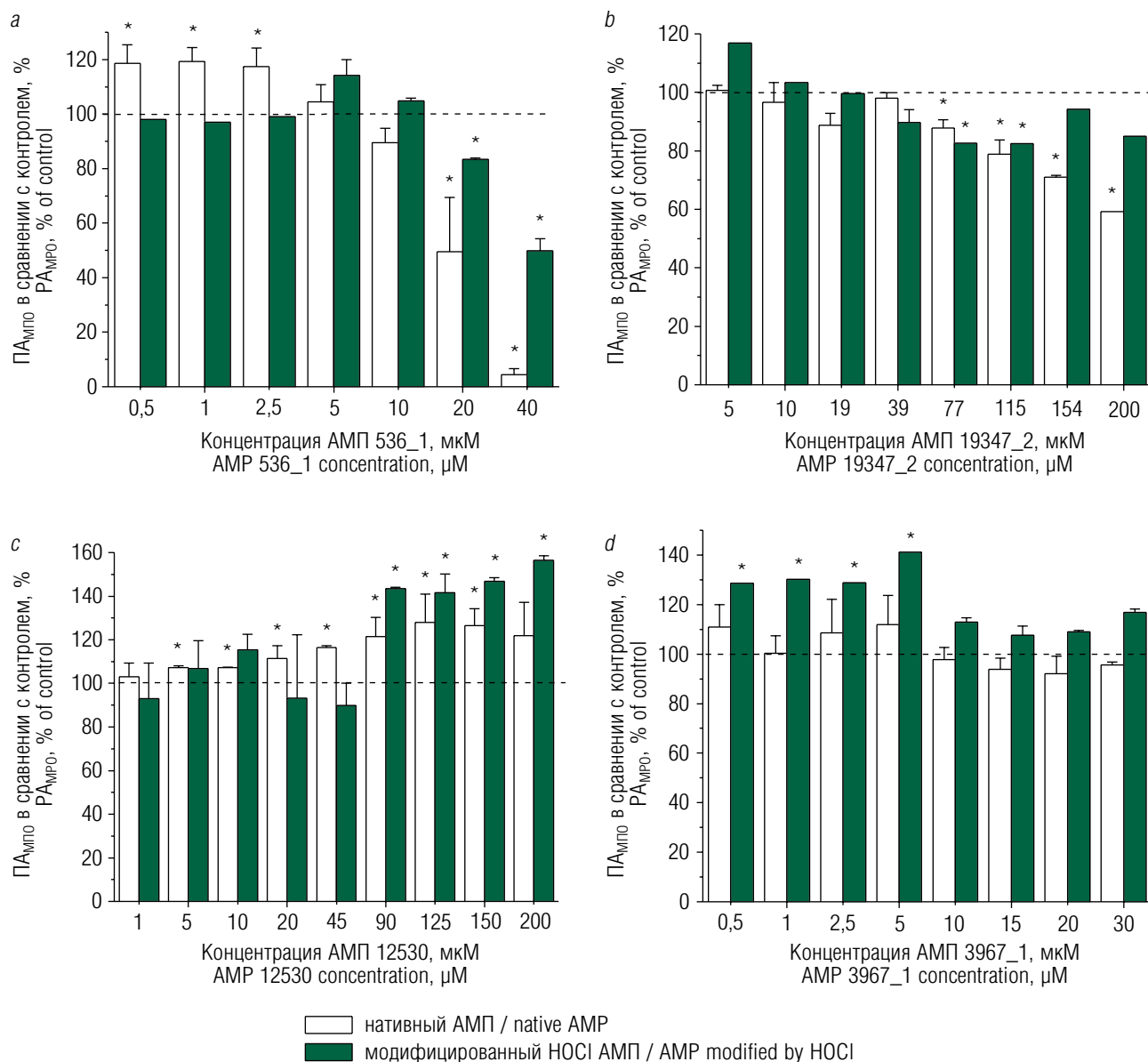


Рис. 1. Влияние нативных и модифицированных хлорноватистой кислотой (НОСІ) антимикробных пептидов (АМП) 536_1 (a), 19347_2 (b) 12530 (c) и 3967_1 (d) в различных концентрациях на пероксидазную активность очищенной миелопероксидазы ($\text{PA}_{\text{МПО}}$) (0,5 нМ), регистрируемую по окислению ферментом хромогенного субстрата *o*-DA (380 мкМ) в присутствии H_2O_2 (50 мкМ). За 100 % принята $\text{PA}_{\text{МПО}}$ в отсутствие АМП. * $p < 0,05$ по сравнению с $\text{PA}_{\text{МПО}}$ в контроле (в отсутствие АМП)

Fig. 1. Effect of native and modified by HOCl AMP 536_1 (a), 19347_2 (b), 12530 (c), and 3967_1 (d) in various concentrations on MPO (0.5 nM) peroxidase activity (PA_{MPO}) which was recorded by the oxidation of chromogenic substrate *o*-DA (380 μM) in the presence of H_2O_2 (50 μM). PA_{MPO} in the absence of AMP is accepted as 100 %. * $p < 0.05$ compared with the PA_{MPO} in the control (in the absence of AMP)

АМП 19347_2 концентрационно-зависимым образом ингибировал способность НЭ расщеплять флуоресцентный субстрат (рис. 2, b и c). Ингибирующий эффект АМП 19347_2 на ферментативную активность НЭ может быть связан с тем, что среди всех применяемых нами АМП в состав АМП 19347_2 входит больше всего (7) алифатических аминокислотных остатков (4 Ile, 1 Leu и 2 Val). Пептидные связи, образованные этими аминокислотами, конкурируя с используемым нами субстратом для регистрации

активности фермента, могут быть мишенями для НЭ. Модифицированные HOCl АМП не оказывали какого-либо отличного от их нативных аналогов действия на амидолитическую активность НЭ (данные не представлены).

ЛФ — катионный железосвязывающий гликопротеин семейства трансферринов. В основном ЛФ содержится в секретах экзокринных желез, дыхательной и репродуктивной систем, грудном молоке, слезах, синовиальной жидкости, слюне, что свидетельствует о важной роли

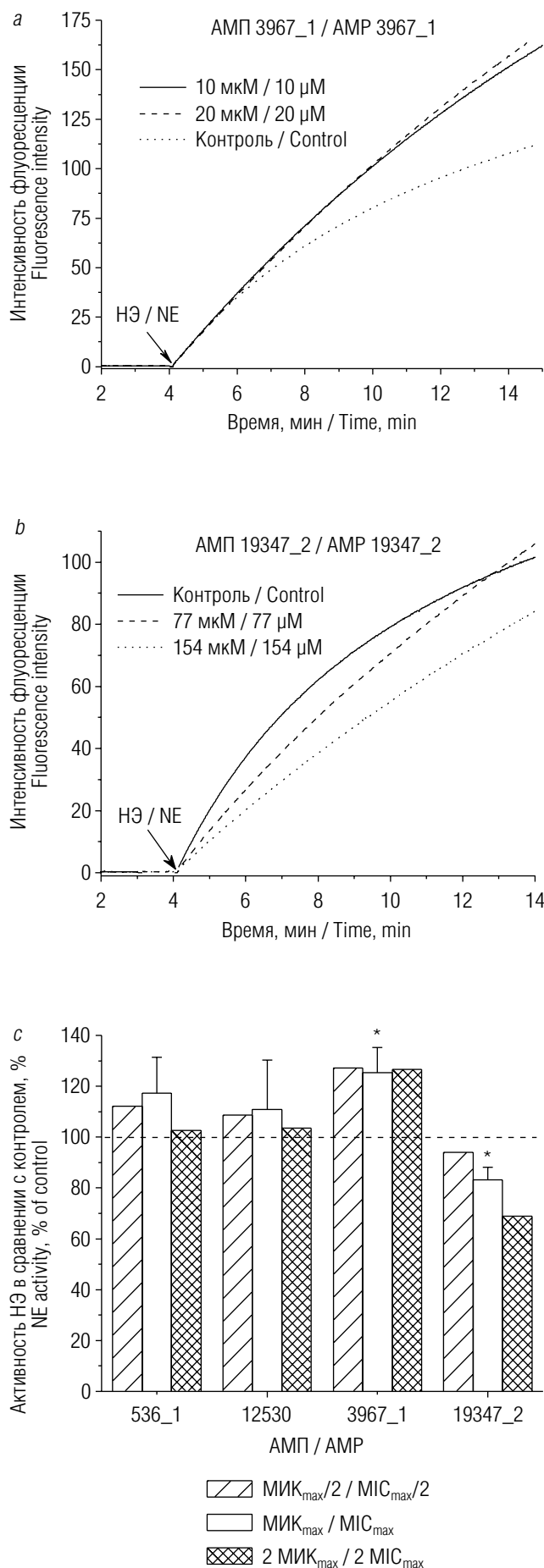


Рис. 2. Влияние антимикробных пептидов (АМП) на ферментативную активность нейтрофильной эластазы (НЭ). Типичные кинетические кривые (а, б) увеличения интенсивности флуоресценции аминотетракумарина, образующегося при расщеплении специфического субстрата MeOSuc-AAPV-АМС (20 мкМ) очищенной НЭ (50 нМ) в отсутствие и в присутствии АМП 3967_1 (а) и 19347_2 (б) в различных концентрациях (указаны на легенде). Момент добавления НЭ отмечен стрелкой. Длина волны возбуждения флуоресценции — 380 нм, регистрации — 460 нм. Зависимость ферментативной активности очищенной НЭ от концентрации АМП (с). За 100 % принята активность НЭ в отсутствие АМП. ММК_{max} — максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 % ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* в стандартном тесте. * $p < 0,05$ по сравнению с активностью НЭ в контроле (в отсутствие АМП)

Fig. 2. Effect of AMP on NE enzymatic activity. Typical kinetic curves (a, b) of an increase in the fluorescence intensity of aminomethylcoumarin formed during the cleavage of a specific substrate MeOSuc-AAPV-AMC (20 μ M) by purified NE (50 nM) in the absence and in the presence of AMP 3967_1 (a) and 19347_2 (b) at various concentrations. AMP concentrations are indicated on the legend to the figure. The arrow indicates the moment of NE addition. Fluorescence intensity was measured at 460 nm, excitation wavelength was 380 nm. Dependence of NE enzymatic activity on AMP concentration (c). NE activity in the absence of AMP is taken as 100%. MIC_{max} — minimal inhibitory concentrations against three bacterial species (*Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* and *Bacillus subtilis*). * $p < 0.05$ compared to NE activity in the control (in the absence of AMP)

ЛФ в неспецифической защите от вторжения патогенных микроорганизмов. Источником ЛФ в плазме крови служат нейтрофилы, в которых данный белок синтезируется в процессе их дифференцировки и созревания, хранится в специфических гранулах, а при воспалении успешно дегранулирует во внеклеточное пространство. ЛФ обладает антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми, иммуномодулирующими, антиоксидантными и другими полезными свойствами [30]. Один из аспектов антимикробного действия ЛФ — это высокое сродство данной молекулы к ионам железа. Структурно молекула ЛФ разделена на две части, называемые N- и C-долями, каждая из которых содержит сайт связывания железа, состоящий из 1 Asp, 1 His и 2 Tyr [31]. Процесс связывания ионов железа является кооперативным — связывание железа в C-доле существенно стабилизирует этот процесс в N-доле.

При изучении влияния АМП на железосвязывающую активность ЛФ было показано, что ни один из исследуемых нами новых синтети-

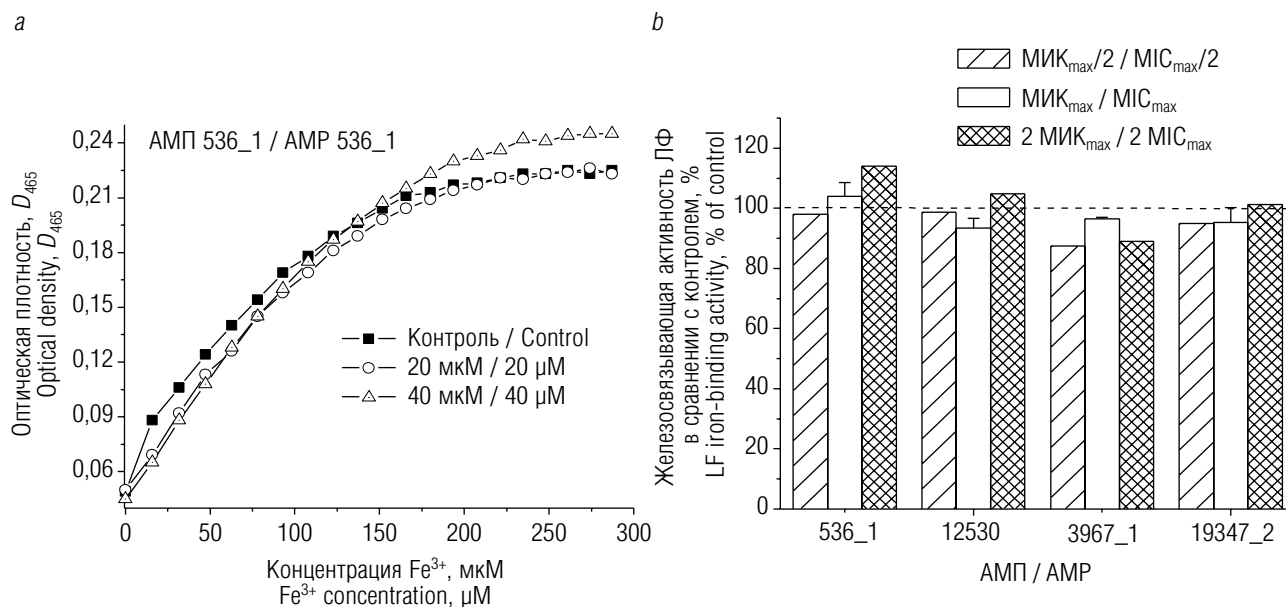


Рис. 3. Влияние антимикробных пептидов (АМП) на железосвязывающую активность лактоферрина (ЛФ): *a* — типичные кинетические кривые изменения оптической плотности раствора ЛФ (10 мг/мл) на длине волны 465 нм, соответствующей пику поглощения насыщенной железом формы ЛФ (холо-ЛФ), в отсутствие и в присутствии АМП 536_1 в различных концентрациях после 20 последовательных добавок соли железа $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}]$ (по 16 мкМ); *b* — влияние АМП 536_1, 12530, 3967_1 и 19347_2 в различных концентрациях на железосвязывающую активность ЛФ. MIC_{max} — максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 % ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* в стандартном тесте. За 100 % принята железосвязывающая активность ЛФ в контроле (в отсутствие АМП)

Fig. 3. Effect of AMP on LF iron-binding activity: *a* — typical kinetic curves of LF solution (10 mg/ml) optical density changes at a wavelength of 465 nm, corresponding to the absorption peak of LF iron-saturated form (holo-LF), in the absence and in the presence of AMP 536_1 at various concentrations after 20 successive additions of iron salt $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}]$ (16 μM each); *b* — effect of AMP 536_1, 12530, 3967_1 and 19347_2 at various concentrations on LF iron-binding activity. MIC_{max} — minimal inhibitory concentrations against three bacterial species (*Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* and *Bacillus subtilis*). LF iron-binding activity in the control (in the absence of AMP) was taken as 100%

ческих АМП медицинской пиявки в используемом диапазоне концентраций ($\text{MIC}_{\text{max}}/2$, MIC_{max} и $2 \text{ MIC}_{\text{max}}$) не оказывал достоверного влияния на способность ЛФ связывать ионы железа (рис. 3). АМП, модифицированные под действием НОСl, также не воздействовали на железосвязывающую активность ЛФ (данные не представлены).

Затем нами было исследовано влияние АМП на биологическую активность лизоцима, содержащегося в азурофильных, специфических и желатиновых гранулах нейтрофилов. Лизоцим (мурамидаза) представляет собой низкомолекулярный катионный белок, фермент класса гидролаз, разрушающий клеточные стенки бактерий путем гидролиза $\beta(1-4)$ -гликозидной связи между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином пептидогликанов, входящих в состав плазматической мембраны бактерий, тем самым обеспечивая защиту макроорганизма от экзогенной и эндогенной микрофлоры. Пептидогликан при этом связы-

вается с активным центром лизоцима (в форме кармана), содержащим два аминокислотных остатка, являющихся критическими для функционирования фермента: Glu в положении 35 и Asp в положении 52 [32].

Лизоцим лизирует клетки различных бактерий, микрококков, стафилококков, кишечной палочки, сальмонелл, шигелл, актиномицетов, некоторых видов дрожжей и грибов. Стандартным тестом для определения муколитической активности лизоцима является регистрация лизиса бактерий *M. lysodeikticus* [33]. Однако учитывая способность исследуемых АМП медицинской пиявки встраиваться в клеточную стенку бактерий и нарушать ее проницаемость, вначале нами было изучено действие самих АМП на бактерии *M. lysodeikticus*, а затем — совместное действие синтезированных АМП и лизоцима на эти бактерии.

Установлено, что индивидуальная антимикробная активность исследуемых АМП медицинской пиявки в отношении *M. lysodeikticus*

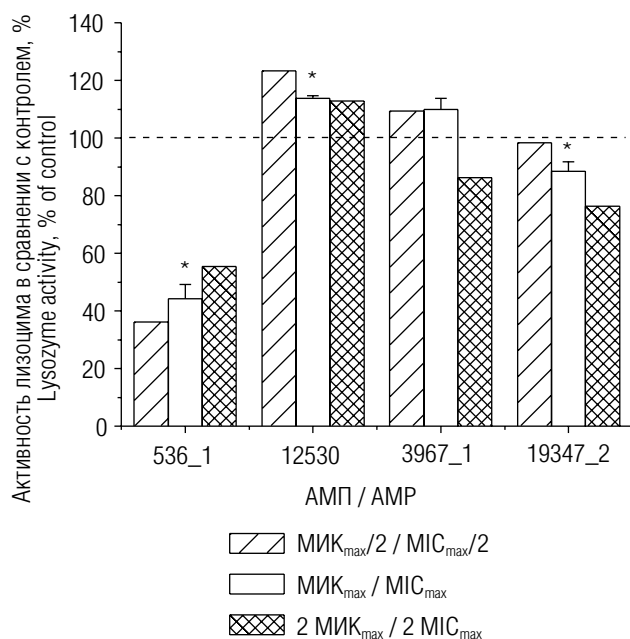


Рис. 4. Влияние антимикробных пептидов (АМП) 536_1, 12530, 3967_1 и 19347_2 в различных концентрациях на способность лизоцима лизировать бактериальные клетки *M. lysodeikticus*. За 100 % принята муколитическая активность лизоцима в контроле (в отсутствие АМП). МИК_{max} — максимальное значение среди минимальных концентраций АМП, необходимых для достижения 100 % ингибирования роста микроорганизмов *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* и *Bacillus subtilis* в стандартном тесте. * $p < 0,05$ по сравнению с активностью лизоцима в контроле (в отсутствие АМП)

Fig. 4. Effect of AMP 536_1, 12530, 3967_1, and 19347_2 at various concentrations on lysozyme ability to lyse *M. lysodeikticus* bacterial cells. Lysozyme mucolytic activity in the control (in the absence of AMP) was taken as 100%. MIC_{max} — minimal inhibitory concentrations against three bacterial species (*Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis* and *Bacillus subtilis*). * $p < 0.05$ compared to lysozyme activity in the control (in the absence of AMP)

была достаточно низкой — добавление всех АМП к *M. lysodeikticus* приводило лишь к небольшому уменьшению светопропускания клеточных суспензий (данные не представлены), что может свидетельствовать о встраивании АМП в мембрану бактерий, нарушении ее проницаемости для ионов и, как следствие, набухания бактериальных клеток.

При изучении сочетанного действия АМП и лизоцима были выявлены синергетические эффекты (~20 %) против грамположительных бактерий *M. lysodeikticus* для комбинации лизоцима с АМП 12530 (во всем исследуемом концентрационном диапазоне АМП), а также АМП 3967_1 в концентрации 10 мкМ и меньше. Ингибирование антимикробной активности происходило при совместном добавлении

лизоцима и АМП 3967_1 в концентрации 15 мкМ и выше, а также АМП 536_1 во всем исследованном концентрационном диапазоне (рис. 4). Сильное ингибирование муколитической активности лизоцима после предварительной инкубации с АМП 536_1 может быть ассоциировано со взаимодействием катонных аминокислотных остатков АМП 536_1 [у данного АМП наибольший положительный заряд (+6) среди всех исследуемых АМП] с отрицательно заряженными аминокислотными остатками активного центра лизоцима, играющими ключевую роль в ферментативном расщеплении пептидогликанов бактериальной стенки. В случае аддитивной комбинации лизоцима с АМП 19347_2 в концентрациях, меньших МИК_{max}, общий эффект равнялся индивидуальному действию лизоцима, при увеличении концентрации АМП 19347_2 антибактериальная активность исследуемой смеси снижалась (рис. 4), что опять же может быть связано с электростатическим взаимодействием отрицательно заряженных Asp и Glu в активном центре фермента с положительно заряженным (+5) АМП 19347_2.

После модификации НОСІ способность АМП 536_1 и 19347_2 ингибировать муколитическую активность лизоцима сохранялась, но эффект был меньше, чем для нативных АМП (данные не представлены), что может быть следствием снижения катионного заряда АМП после обработки НОСІ и уменьшением взаимодействия с анионными аминокислотными остатками, входящими в состав активного центра фермента. Интересно, что после модификации НОСІ способность АМП 3967_1 усиливать литическую активность лизоцима увеличивалась, в то время как АМП 12530 после галогенирующей модификации ингибировал муколитическую активность лизоцима (данные не представлены).

Заключение

На основании полученных данных можно сделать вывод, что использование препаратов на основе исследуемых новых АМП медицинской пиявки открывает потенциальную возможность оказывать положительное влияние в борьбе организма с возбудителями инфекций не только за счет антимикробного действия самих АМП, но и за счет модуляции этими соединениями биологической активности собственных эндогенных антимикробных белков и пептидов: усиления — в случае необходимости элиминации инфекции и ингибирования — для защиты от повреждения собственных тканей организма.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке БРФФИ в рамках проекта № Б20Р-215, РФФИ в рамках проекта № 20-515-00006, а также гранта Президента РФ МД-1901.2020.4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов. Д.В. Григорьева — проведение экспериментов, их описание, обработка результатов; Е.Н. Графская, И.А. Лацис, В.Н. Лазарев — синтез АМП медицинской пиявки; А.В. Соколов — выделение белков из экстракта нейтрофилов; И.В. Горудко, О.М. Панасенко — подбор литературы, обсуждение результатов.

Список литературы

- Мусин Х.Г. Антимикробные пептиды — потенциальная замена традиционным антибиотикам // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 3. С. 295–308. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308
- Жаркова М.С., Орлов Д.С., Кокряков В.Н., Шамова О.В. Антимикробные пептиды млекопитающих: классификация, биологическая роль, перспективы практического применения // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. 2014. № 1. С. 98–114.
- Lei J., Sun L., Huang S. et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications // Am. J. Transl. Res. 2019. Vol. 11, No. 7. P. 3919–3931.
- Mahlpuu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2016. Vol. 6. P. 194. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194
- Huerta-Cantillo J., Navarro-García F. Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells // Investigaciyn en Discapacidad. 2016. Vol. 5, No. 2. P. 96–115.
- Павлова И.Б., Юдина Т.Г., Баскова И.П. и др. Изучение перспектив использования секрета слюнных клеток медицинской пиявки *Hirudo medicinalis* и препарата «Пиявит» как антимикробных комплексов, не вызывающих резистентности у микроорганизмов // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2–3. С. 252.
- Баскова И.П., Харитонов О.В., Завалова Л.Л. Лизоцимная активность секрета слюнных желез медицинской пиявки видов: *H. verbana*, *H. medicinalis* и *H. orientalis* // Биомедицинская химия. 2011. Т. 57, № 5. С. 511–518. DOI: 10.18097/pbmc20115705511
- Grafskaja E.N., Nadezhdin K.D., Talyzina I.A. et al. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 180. P. 143–153. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.080
- Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С. и др. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология. 2007. Т. 49, № 12. С. 1000–1010.
- Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. и др. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 2 // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 7–18. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18
- Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г.А. и др. Новый взгляд на нейтрофильные гранулоциты: переосмысление старых догм. Часть 1 // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 219–230. DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230
- Panyutich A.V., Hiemstra P.S., van Wetering S., Ganz T. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1995. Vol. 12, No. 3. P. 351–357. DOI: 10.1165/ajrcmb.12.3.7873202
- Шамова О.В., Орлов Д.С., Ямщикова Е.В. и др. Изучение взаимодействия антимикробных пептидов с белками из семейства ингибиторов сериновых протеиназ // Фундаментальные исследования. 2011. № 9–2. С. 344–348.
- Vissers M.C., Winterbourn C.C. Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes // Biochem. J. 1987. Vol. 245, No. 1. P. 277–280. DOI: 10.1042/bj2450277
- Hawkins C.L., Davies M.J. Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological function // Chem. Res. Toxicol. 2005. Vol. 18, No. 10. P. 1600–1610. DOI: 10.1021/tx050207b
- Vakhrusheva T.V., Grigorieva D.V., Gorudko I.V. et al. Enzymatic and bactericidal activity of myeloperoxidase in conditions of halogenative stress // Biochem. Cell. Biol. 2018. Vol. 96, No. 5. P. 580–591. DOI: 10.1139/bcb-2017-0292
- Терехова М.С., Горудко И.В., Григорьева Д.В. и др. Железосвязывающая способность лактоферрина при воспалении // Доклады БГУИР. 2018. № 7(117). С. 80–84.
- Григорьева Д.В., Горудко И.В., Костевич В.А. и др. Экзоцитоз миелопероксидазы при активации нейтрофилов в присутствии гепарина // Биомедицинская химия. 2018. Т. 64, № 1. С. 16–22. DOI: 10.18097/PBMC20186401016
- Sokolov A.V., Ageeva K.V., Kostevich V.A. et al. Study of interaction of ceruloplasmin with serprocidins. *Biochemistry (Mosc)*. 2010. Vol. 75, No. 11. P. 1361–1367. DOI: 10.1134/S0006297910110076
- Sokolov A.V., Kostevich V.A., Zakharova E.T. et al. Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: reciprocal effect on enzymatic properties // Free Radic. Res. 2015. Vol. 49, No. 6. P. 800–811. DOI: 10.3109/10715762.2015.1005615
- Semak I., Budzevich A., Maliushkova E. et al. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin // Transgenic Res. 2019. Vol. 28, No. 5–6. P. 465–478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y
- Лукашевич В.С., Будевич А.И., Семак И.В. и др. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-продуцентов и его физиологические эффекты // Доклады НАН Беларуси. 2016. Т. 60, № 1. С. 72–81.

23. Горудко И.В., Черкалина О.С., Соколов А.В. и др. Новые подходы к определению концентрации и пероксидазной активности миелопероксидазы в плазме крови человека // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 5. С. 629–639. DOI: 10.1134/s1068162009050057
24. Григорьева Д.В., Горудко И.В., Соколов А.В. и др. Миелопероксидаза стимулирует дегрануляцию нейтрофилов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2016. Т. 161, № 4. С. 483–488. DOI: 10.1007/s10517-016-3446-7
25. Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(13):1466–1489. DOI: 10.1134/S0006297913130075
26. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. Галогенирующий стресс и его биомаркеры // Вестник Российской академии медицинских наук. 2010. № 1. С. 27–39.
27. Golenkina E.A., Livenskiy A.D., Viryasova G.M. et al. Ceruloplasmin-derived peptide is the strongest regulator of oxidative stress and leukotriene synthesis in neutrophils // *Biochem. Cell. Biol.* 2017. Vol. 95, No. 3. P. 445–449. DOI: 10.1139/bcb-2016-0180
28. Jugniot N., Voisin P., Bentaher A., Mellet P. Neutrophil elastase activity imaging: recent approaches in the design and applications of activity-based probes and substrate-based probes // *Contrast Media Mol. Imaging*. 2019. Vol. 2019. P. 7417192. DOI: 10.1155/2019/7417192
29. Парамонова Н.С., Гурина Л.Н., Волкова О.А. и др. Состояние эластаза-ингибиторной системы у детей в норме и при отдельных патологических состояниях. Гродно, 2017.
30. Kell D.B., Heyden E.L., Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria // *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. P. 1221. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01221
31. Борзенкова Н.В., Балабушевич Н.Г., Ларионова Н.И. Лактоферрин: физико-химические свойства, биологические функции, системы доставки, лекарственные препараты и биологически активные добавки (обзор) // *Биофармацевтический журнал*. 2010. Т. 2, № 3. С. 3–19.
32. Калюжин О.В. Антибактериальные, противогрибковые, противовирусные и иммуномодулирующие эффекты лизоцима: от механизмов к фармакологическому применению [Электронный ресурс]. Эффективная фармакотерапия. Педиатрия. № 1. 2018. Режим доступа: https://umedp.ru/articles/antibakterialnye_protivogribkovye_protivovirusnye_i_immunomoduliruyushchie_effekty_lizotsima_ot_mekh.html. Дата обращения: 22.08.2021.
33. Гончарова А.И., Земко В.Ю., Окулич В.К. Определение лизоцима с использованием пептидогликана из клеточной стенки культуры *Micrococcus lysodeikticus* // *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2018. № 1. С. 48–55.
2. Zharkova MS, Orlov DS, Kokryakov VN, Shamova OV. Mammalian antimicrobial peptides: classification, biological role, perspectives of practical use. *Biological Communications*. 2014;(1):98–114. (In Russ.)
3. Lei J, Sun L, Huang S, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res*. 2019;11(7):3919–3931.
4. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: an emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016;6:194. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00194
5. Huerta-Cantillo J, Navarro-García F. Properties and design of antimicrobial peptides as potential tools against pathogens and malignant cells. *Investigaciyn en Discapacidad*. 2016;5(2):96–115.
6. Pavlova IB, Yudina TG, Baskova IP, et al. Studying of prospects of use of the secret of salivary cages of the medical bloodsucker of *Hirudo medicinalis* and preparation “Piyavit” as the antimicrobic complexes which aren’t causing resistance in microorganisms. *Modern Problems of Science and Education*. 2015;(2–3):252. (In Russ.)
7. Baskova IP, Kharitonova OV, Zavalova LL. Lysozyme activity of the salivary gland secretion of the medicinal leeches *H. verana*, *H. medicinalis*, and *H. orientalis*. *Biomed Khim*. 2011;57(5):511–518. (In Russ.) DOI: 10.18097/pbmc20115705511
8. Grafskaia EN, Nadezhdin KD, Talyzina IA, et al. Medicinal leech antimicrobial peptides lacking toxicity represent a promising alternative strategy to combat antibiotic-resistant pathogens. *Eur J Med Chem*. 2019;180:143–153. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.06.080
9. Shamova OV, Sakuta GA, Orlov DS, et al. Effects of antimicrobial peptides of neutrophils on tumor and normal cells in culture. *Tsitologiya*. 2007;49(12):1000–1010. (In Russ.)
10. Nesterova IV, Kolesnikova NV, Chudilova GA, et al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 2. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(1):7–18. (In Russ.) DOI: 10.15789/2220-7619-2018-1-7-18
11. Nesterova IV, Kolesnikova NV, Chudilova GA, et al. The new look at neutrophilic granulocytes: rethinking old dogmas. Part 1. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2017;7(3):219–230. (In Russ.) DOI: 10.15789/2220-7619-2017-3-219-230
12. Panyutich AV, Hiemstra PS, van Wetering S, Ganz T. Human neutrophil defensin and serpins form complexes and inactivate each other. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995;12(3):351–357. DOI: 10.1165/ajrcmb.12.3.7873202
13. Shamova OV, Orlov DS, Yamschikova EV, et al. Investigation of the interaction of antimicrobial peptides with proteins of serine protease inhibitors family. *Fundamental Research*. 2011;9:344–348. (In Russ.)
14. Vissers MC, Winterbourn CC. Myeloperoxidase-dependent oxidative inactivation of neutrophil neutral proteinases and microbicidal enzymes. *Biochem J*. 1987;245(1):277–280. DOI: 10.1042/bj2450277
15. Hawkins CL, Davies MJ. Inactivation of protease inhibitors and lysozyme by hypochlorous acid: role of side-chain oxidation and protein unfolding in loss of biological activity.

References

1. Musin KG. Antimicrobial peptides — a potential replacement for traditional antibiotics. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(3):295–308. (In Russ.) DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-295-308

- cal function. *Chem Res Toxicol*. 2005;18(10):1600–1610. DOI: 10.1021/tx050207b
16. Vakhrusheva TV, Grigorieva DV, Gorudko IV, et al. Enzymatic and bactericidal activity of myeloperoxidase in conditions of halogenative stress. *Biochem Cell Biol*. 2018;96(5):580–591. DOI: 10.1139/bcb-2017-0292
 17. Terekhova MS, Gorudko IV, Grigorieva DV, et al. Iron-binding property of lactoferrin in the case of inflammation. *Doklady BGUIR*. 2018;(7(117)):80–84. (In Russ.)
 18. Grigorieva DV, Gorudko IV, Kostevich VA, et al. Exocytosis of myeloperoxidase from activated neutrophils in the presence of heparin. *Biomed Khim*. 2018;64(1):16–22. (In Russ.) DOI: 10.18097/PBMC20186401016
 19. Sokolov AV, Ageeva KV, Kostevich VA, et al. Study of interaction of ceruloplasmin with serprocidins. *Biochemistry (Mosc)*. 2010;75(11):1361–1367. DOI: 10.1134/S0006297910110076
 20. Sokolov AV, Kostevich VA, Zakharova ET, et al. Interaction of ceruloplasmin with eosinophil peroxidase as compared to its interplay with myeloperoxidase: reciprocal effect on enzymatic properties. *Free Radic Res*. 2015;49(6):800–811. DOI: 10.3109/10715762.2015.1005615
 21. Semak I, Budzevich A, Maliushkova E, et al. Development of dairy herd of transgenic goats as biofactory for large-scale production of biologically active recombinant human lactoferrin. *Transgenic Res*. 2019;28(5–6):465–478. DOI: 10.1007/s11248-019-00165-y
 22. Lukashevich VS, Budzevich AI, Semak IV, et al. Production of recombinant human lactoferrin from the milk of goat producers and its physiological effects. *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2016;60(1):72–81. (In Russ.)
 23. Gorudko IV, Cherkalina OS, Sokolov AV, et al. New approaches to the measurement of the concentration and peroxidase activity of myeloperoxidase in human blood plasma. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2009;35(5):566–575. DOI: 10.1134/s1068162009050057
 24. Grigorieva DV, Gorudko IV, Sokolov AV, et al. Myeloperoxidase stimulates neutrophil degranulation. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;161(4):495–500. DOI: 10.1007/s10517-016-3446-7
 25. Panasenko OM, Gorudko IV, Sokolov AV. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(13):1466–1489. DOI: 10.1134/S0006297913130075
 26. Panasenko OM, Sergienko VI. Halogenizing stress and its biomarkers. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2010;(1):27–39. (In Russ.)
 27. Golenkina EA, Livenskiy AD, Viryasova GM, et al. Ceruloplasmin-derived peptide is the strongest regulator of oxidative stress and leukotriene synthesis in neutrophils. *Biochem Cell Biol*. 2017;95(3):445–449. DOI: 10.1139/bcb-2016-0180
 28. Jugniot N, Voisin P, Bentaher A, Mellet P. Neutrophil elastase activity imaging: recent approaches in the design and applications of activity-based probes and substrate-based probes. *Contrast Media Mol Imaging*. 2019;2019:7417192. DOI: 10.1155/2019/7417192
 29. Paramonova NS, Gurina LN, Volkova OA, et al. Sostoyanie elastaza-ingibitornoy sistemy u detey v norme i pri otdel'nykh patologicheskikh sostoyaniyakh. Grodno; 2017. (In Russ.)
 30. Kell DB, Heyden EL, Pretorius E. The biology of lactoferrin, an iron-binding protein that can help defend against viruses and bacteria. *Front Immunol*. 2020;11:1221. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01221
 31. Borzenkova NV, Balabushevich NG, Larionova NI. Lactoferrin: physical and chemical properties, biological functions, delivery systems, pharmaceutical and nutraceutical preparations (review). *Russian Journal of Biopharmaceuticals*. 2010;2(3):3–19. (In Russ.)
 32. Kalyuzhin OV. Antibacterial, antifungal, antiviral and immunomodulatory effects of lysozyme: from mechanisms to pharmacological application [Internet]. Effective pharmacotherapy. Pediatrics. No. 1. 2018. Available from: https://umedp.ru/articles/antibakterialnye_protivogribkovye_protivovirusnye_i_immunomoduliruyushchie_effekty_lizotsima_ot_mekh.html. Accessed: 22.08.2021.
 33. Goncharova AI, Ziamko VY, Okulich VK. Lysozyme activity determination using peptidoglycan from the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. *Immunopathology, Allergology, Infectology*. 2018;(1):48–55. (In Russ.)

Информация об авторах / Information about the authors

Дарья Владимировна Григорьева — канд. биол. наук, доцент кафедры биофизики физического факультета. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0210-5474>; eLibrary SPIN: 2479-7785; e-mail: dargr@tut.by

Ирина Владимировна Горудко — канд. биол. наук, доцент, доцент кафедры биофизики физического факультета. Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-470X>; eLibrary SPIN: 8968-3125; e-mail: irinagorudko@gmail.com

Daria V. Grigorieva — PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty. Belarusian State University, Minsk, Belarus. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0210-5474>; eLibrary SPIN: 2479-7785; e-mail: dargr@tut.by

Irina V. Gorudko — PhD (Biology), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Biophysics, Physics Faculty. Belarusian State University, Minsk, Belarus. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4737-470X>; eLibrary SPIN: 8968-3125; e-mail: irinagorudko@gmail.com

Информация об авторах / Information about the authors

Екатерина Николаевна Графская — лаборант лаборатории геномной инженерии. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8957-6142>; eLibrary SPIN: 1821-2746; e-mail: grafskayacath@gmail.com

Иван Алексеевич Лацис — мл. научн. сотр. лаборатории геномной инженерии. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8292-0737>; eLibrary SPIN: 6775-1702; e-mail: lacis.ivan@gmail.com

Алексей Викторович Соколов — д-р биол. наук, заведующий лабораторией биохимической генетики отдела молекулярной генетики. ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник отдела биофизики. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва, Россия; профессор кафедры фундаментальных проблем медицины и медицинских технологий. ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>; eLibrary SPIN: 7427-7395; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Олег Михайлович Панасенко — д-р биол. наук, профессор, заведующий отделом биофизики. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва, Россия; старший научный сотрудник отдела медицинской физики. ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5245-2285>; eLibrary SPIN: 3035-6808; e-mail: o-panas@mail.ru

Василий Николаевич Лазарев — д-р биол. наук, доцент, заведующий отделом клеточной биологии. ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины» ФМБА, Москва, Россия. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0042-966X>; eLibrary SPIN: 1578-8932; e-mail: lazar0@mail.ru

Ekaterina N. Grafskaya — Laboratory Assistant, Genetic Engineering Laboratory. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8957-6142>; eLibrary SPIN: 1821-2746; e-mail: grafskayacath@gmail.com

Ivan A. Latsis — Junior Researcher Fellow, Laboratory of Genetic Engineering. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8292-0737>; eLibrary SPIN: 6775-1702; e-mail: lacis.ivan@gmail.com

Alexey V. Sokolov — Dr. Sci. (Biology), Head of the Laboratory of Biochemical Genetics of the Department of Molecular Genetics. Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia; Senior Researcher of Department of Biophysics. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; Professor of the Department of Fundamental Problems of Medicine and Medical Technology. Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9033-0537>; eLibrary SPIN: 7427-7395; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

Oleg M. Panasencko — Dr. Sci. (Biology), Professor, Head of Department of Biophysics. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia; Senior Researcher of Department of Medical Physics. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5245-2285>; eLibrary SPIN: 3035-6808; e-mail: o-panas@mail.ru

Vasily N. Lazarev — Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Head of Department of Cell Biology. Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0042-966X>; eLibrary SPIN: 1578-8932; e-mail: lazar0@mail.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Дарья Владимировна Григорьева / *Daria V. Grigorieva*
E-mail: dargr@tut.by